

MEDICINSKI FAKULTET  
UNIVERZITET U BEOGRADU

Aleksandra M. Barać

**EVALUACIJA METODE INDUKCIJE  
SINONAZALNOG SEKRETA ZA  
DOKAZIVANJE GLJIVICA U SINUSIMA  
U FIZIOLOŠKIM I PATOLOŠKIM  
STANJIMA KOD PACIJENATA SA  
HRONIČNIM RINOSINUZITISIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Aleksandra M. Barać

**EVALUATION OF METHODS FOR  
INDUCTION OF SINONASAL  
SECRETIONS FOR THE DETECTION OF  
FUNGI IN THE PHYSIOLOGICAL AND  
PATHOLOGICAL CONDITIONS IN  
PATIENTS WITH CHRONIC  
RHINOSINUSITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

## **PODACI O MENTORU, KOMENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE**

### **MENTOR:**

Doktor medicinskih nauka, redovni profesor, dr Valentina Arsić Arsenijević  
specijalista mikrobiologije sa parazitologijom, subspecijalista mikologije  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

### **KOMENTOR:**

Doktor medicinskih nauka, vanredni profesor, dr Vesna Tomić Spirić  
specijalista interne medicine, subspecijalista alergologije i kliničke imunologije  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

### **ČLANOVI KOMISIJE:**

Doktor medicinskih nauka, redovni profesor, dr Dragana Janić  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Doktor medicinskih nauka, redovni profesor, dr Predrag Minić  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Doktor medicinskih nauka, docent, dr Sandra Đurđević Pekić  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Doktor medicinskih nauka, redovni profesor, dr Zoran Rakočević  
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Doktor medicinskih nauka, redovni profesor, dr Suzana Otašević  
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

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

*Zahvaljujem se,*

*Prof. dr Valentini Arsić Arsenijević, mom mentoru i učitelju mikologije, na pomoći i podršci u celokupnom radu, korisnim sugestijama i smernicama koje su mi pomogli da ostvarim ovu studiju.*

*Prof. dr Vesni Tomić Spirić, mom komentoru, na izuzetnoj pomoći i razumevanju tokom izrade studije, korisnim kliničkim sugestijama, dragocenim konsultacijam i prijateljskoj podršci.*

*Prof. Oliveri Stanojlović i Prof. Draganu Đuriću, na podršci u celokupnom radu, korisnim sugestijama i smernicama koji su mi pomogli da ostvarim ovu studiju.*

*Dragoj kolegini i drugarici Marini Pekmezović, molekularnom biologu, na izuzetnoj naučnoj pomoći, prijateljskoj podršci i savetima tokom celokupne izrade Doktorske disertacije.*

*Mom dragom suprugu i porodici, na izuzetnoj podršci tokom izrade studije, a posebno na beskrajnoj ljubavi i razumevanju koje je bilo ključno da istrajem.*

*Svima koji su pomogli u ostvarivanju ove studije.*

## APSTRAKT

Gljive su poslednjih decenija postale jedan od vodećih uzročnika bolesti kod ljudi. Obzirom na opšteprisutnost u vazduhu i životnom prostoru (*indoor* i *outdoor*), gljive su česti izazivači gljivičnih oboljenja gornjih i donjih partija respiratornog trakta (RT) gde dovode do hroničnih oboljenja. Gljive prisutne u prašini i vazduhu bolesničkih soba, klima uređajima, vodovodnim cevima i vlažnim zidovima kupatila, predstavljaju važan rezervoar infekcije. Lako se šire putem vazduha i imaju sposobnost da prodru do najnižih delova donjih partija RT, ili da se zadrže u sinusnim šupljinama. Gljivične spore dimenzija 10 do 100  $\mu\text{m}$  bivaju zaustavljene u sinusima, nosnom kavumu, farinksu i larinksu i na ovim mestima stvaraju depozite. U RT vladaju tamni, topli i vlažni uslovi koji predstavljaju idealne uslove za razmnožavanje plesni u plućima. Najčešći "*outdoor*" izolati gljiva su vrste roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium*, dok su najčešći "*indoor*" izolati gljiva vrste roda *Stachybotris*, *Fusarium* i *Rhodotorula*. Izloženost ljudi "*indoor*" i "*outdoor*" gljivičnim sporama u vazduhu je neizbežna, a inhalacija spora gljiva je jedan od „okidača“ za nastanak imunopatoloških procesa u RT, koji može biti u vidu alergijske reakcije ili infekcije. Gljive koje uzrokuju oboljenja ljudi se mogu podeliti na dve kategorije prema patogenom potencijalu: oportunističke i striktno patogene. Najčešći izazivači gljivičnih infekcija (GI) RT su oportunističke plesni.

Brzo i tačno dokazivanje prisustva gljiva u donjim i gornjim partijama RT je veoma važno zbog pravovremene primene terapije, skraćanja trajanja bolesti, snižavanja procenta nastanka komplikacija i sprečavanja razvoja invazivnih GI (IGI). Dijagnoza GI RT zavisi od brojnih faktora kao što su stručnost kliničara da pravovremeno posumnja na GI, pravilno odabran i uzorkovan klinički materijal, vreme potrebno od uzorkovanja do rezultata i senzitivnosti ( $S_n$ ) i specifičnosti ( $S_p$ ) postojećih dijagnostičkih testova. Kultivacija kliničkih uzoraka iz gornjih i donjih partija RT predstavlja "zlatni standard" za dijagnozu GI. Senzitivnost mikoloških metoda za detekciju gljiva varira od vrste i kvaliteta uzorka, prethodne obrade uzorka i iskustva i veština laboranta i lekara. Prednost kultivacije je mogućnost izolacije, identifikacije uzročnika GI i izrada testa osetljivosti gljiva na antimikotike. Iako se gljive mogu izolovati iz nazalnog sekreta zdravih ljudi, njihovo prisustvo u nazalnom sekretu ne predstavlja uvek dijagnostički kriterijum za dijagnozu GI u gornjim partijama RT. Standardna mikrobiološka analiza

kliničkih uzoraka gornjih partija RT u cilju detekcije gljiva i bakterija podrazumeva: (i) uzimanje brisa sluznice nosa kojim se uzorkuje nazalni sekret sa sluzokože nosa, (ii) zasejavanje ovog kliničkog materijala na hranljive mikrobiološke podloge i (iii) makroskopska i mikroskopska identifikacija izolovanog mikroorganizma. Bris, kao nesenzitivna i nespecifična metoda za detekciju gljiva u sinusima, sa niskom pozitivnom i negativnom prediktivnom vrednošću (PPV/NPV), ali ujedno konvencionalna "standardna metoda", je vodeći problem u dijagnostici GI sinusa. Nizak procenat detekcije gljiva u brisu u cilju dijagnostike GI sinusa je pokazao lošu korelaciju sa kliničkim i radiološkim nalazima pacijenata sa sumnjom na gljivični rinosinuzitis (GRS). Kako je pokazano da je bris nerelevantna metoda za detekciju gljiva u gornjim partijama RT, od velikog kliničkog značaja je razvijanje novih metoda za detekciju gljiva u sinusima. Dijagnostičke metode koje se primenjuju za uzorkovanje i obradu kliničkog materijala iz donjih partija RT kod pacijenata sa sumnjom na prisustvo gljiva u plućima, predstavljaju odličan model za formiranje i evaluaciju dijagnostičkih metoda za detekciju gljiva u gornjim partijama RT. Po modelu indukcije sputuma, mucin i/ili sinonazalni sekret koji oblaže sinusne šupljine može biti indukovano primenom mukolitičke supstance (7% NaCl). Hipertonični NaCl smanjuje viskoznost purulentnog mukusa, povećava aktivnost cilija gornjih partija RT, brzinu kretanja mukusa kroz sinuse i olakšava izbacivanje sadržaja. Na sličan način kao što se vrši izbacivanje i uzorkovanje indukovano sputuma, može biti izvršena metoda indukcije sinonazalnog sekreta uz lavažu (ISNS\_L) izbacivanjem i kolekcijom direktno na hranljivu podlogu čime se smanjuje mogućnost kontaminacije plesnima iz vazduha. Takođe, po modelu bronhoskopije, gde se pod sterilnim uslovima aspirira/uzorkuje sadržaj iz bronhija, ISNS iz sinusa može biti aspiriran (ISNS\_A).

Obzirom da imaju filamentoznu građu, gljive se na mukozi sinusa "ugrade" u mucin ili tkivo nazalnih polipa (NP), čime je njihovo ekstrahovanje otežano, a izolacija gljiva iz takvog sadržaja onemogućena. Postojeći protokoli za obradu BAL-a i sputuma, mogu biti modifikovani i primenjeni na mucin i ISNS iz sinusa. Primena novih protokola za pravljenje jednoćelijske suspenzije od tkiva NP bi značajno mogli da povećaju Sn/Sp standardnih *culture* metoda za detekciju i izolaciju gljiva.

Korišćenje jednostavnih, jeftinih i reproducibilnih dijagnostičkih modela za detekciju gljiva u donjim partijama RT za formiranje novih dijagnostičkih modela za

uzorkovanje kliničkog materijala iz gornjih delova RT i detekciju gljiva, može imati značajne implikacije na utvrđivanje značaja prisustva gljiva u sinusima u fiziološkim i patološkim uslovima, a time pravovremenu dijagnozu GRS i sprečavanje razvoja alergijskih reakcija na prisustvo plesni ili IGI. Novija istraživanja bi trebalo da se fokusiraju na razvoj i standardizaciju novih i pouzdanih metoda za indukciju, uzorkovanje, i obradu ISNS\_L i ISNS\_A iz sinusa kod pacijenata sa sumnjom na GI u gornjim partijama RT, a u cilju rane i pravovremene dijagnoze.

Osnovni cilj istraživanja je evaluacija novo-formiranih metoda za: (i) ISNS uz lavažu i aspiraciju sekreta, (ii) obradu NP do jednočelijske suspenzije i (iii) interpretacija nalaza gljiva u fiziološkim i patološkim stanjima kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom (HRS). U periodu od 01.02.2012. do 01.08.2014. urađena je hibridna studija, kombinacija: (i) kliničkog eksperimenta i (ii) studije serije slučajeva. Planirano je da se evaluacija metode ISNS izvrši na svim studijskim pacijentima, međutim zbog opsežnosti NP i indikovanog FESS-a kod određenog broja pacijenata, metodološki su podeljeni u dve grupe. Studija je izvedena na grupi operisanih pacijenata sa HRS (grupa FESS) i grupi neoperisanih pacijenata (grupa HRS). Grupu FESS su činili pacijenti koji su bili operisani putem FESS-a zbog prisustva NP i to pacijenti koji su prvi put imali operaciju (pFESS grupa) i pacijenti koji su prethodno imali bar jednu operaciju sinusa (reFESS grupa). Grupu HRS su činili: (i) pacijenti kod kojih nije izvršen pretretman (PT) i toaleta nosnog kavuma pre primenjenih metoda uzorkovanja; (ii) pacijenti kod kojih je izvršen PT i toaleta nosnog kavuma pre primenjenih metoda uzorkovanja i (iii) pacijenti koji su prošli samo prvu kliničko-epidemiološku fazu studije, bez druge faze koju su činile mikološke i radiološke analize.

Primenom i evaluacijom kliničkih i alergološko-rinoloških kriterijuma je izvršena selekcija HRS pacijenata i određena težina HRS, a na osnovu kriterijuma „dokazane“ gljive u sinusima i izvršene regresione analize je izdvojeno 10 kriterijuma koji vrše predikciju GRS ( $GRS_{index2}$ ). Za svaki kriterijum je oformljen sistem bodovanja za definisanje „major“ ( $GRS_{index2}$ ) i „minor“ kriterijuma ( $GRS_{index1}$ ). Pokazane su sledeće prevalencije za Republiku Srbiju: HRS (13.8%), NP (4.2%), FRS (2.8%), alergijski GRS/AGRS (1.5%), nealergijski GRS (1.3%) i invazivni GRS (0%) kod grupe HRS pacijenata.

Optimizovan je protokol za uzorkovanje i obradu: (i) tkiva - metoda jednoćelijske suspenzije NP i (ii) sekreta/mucina - ISNS\_A, ISNS\_L i ISNS\_komb (ISNS\_A i ISNS\_L istovremeno). Visok procenat nalaza gljiva je utvrđen primenom metode za obradu jednoćelijske suspenzije do NP kod reFESS pacijenata (42.1%), ISNS\_L sa PT kod neoperisanih pacijenata (24.5%) i jednoćelijske suspenzije NP kod pFESS pacijenata (23.2%), a nizak kod neoperisanih pacijenata primenom ISNS\_A sa PT (10%) i kod neoperisanih pacijenata primenom brisa nosnog kavuma sa PT (5.3%).

U odnosu na 10 izdvojenih kriterijuma koji vrše predikciju GRS ( $GRS_{index}$ ) i rezultata metoda ISNS (prisustvo gljiva u sinusima) izvršena je evaluacija ISNS metoda. Najviše vrednosti Sp/Sn su pokazane za ISNS\_komb metod kada je primenjen PT (89%; 96%), a najviše PPV/NPV su pokazane za ISNS\_komb metod (94%; 93%) i ISNS\_L metod (93%; 87%) kada je primenjen PT. Predloženi protokol za obradu ISNS omogućava ekstrakciju gljiva iz mukopurulentnog sekreta kod pacijenata sa GRS i time bolju detekciju i izolaciju gljiva. Predloženi protokol za obradu tkiva NP do jednoćelijske suspenzije povećava verovatnoću izolacije gljiva iz NP. Izvršena je klasifikacija nalaza gljiva u sinusima na fiziološki nalaz (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološki nalaz, a na osnovu: (i) pozitivnih nalaza gljiva u sinusima primenom metode brisa nosnog kavuma, ISNS\_L, ISNS\_A i/ili ISNS\_komb i (ii) definisanog  $GRS_{index2}$ : (i) fiziološko stanje (kolonizacija/mikrobiom): jedan pozitivan nalaz gljiva u brisu nosnog kavuma; (ii) patološko stanje: jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima primenom metoda jednoćelijske suspenzije ili ISNS\_A ili ISNS\_komb ili dva uzastopna pozitivna nalaza gljiva u sinusima ISNS\_L metodom. Kod operisanih pacijenata sa NP, primenom jednoćelijske suspenzije, dokazano je 13 izolata: *Aspergillus flavus* (8/13), *A. niger* (4/13) i *Alternaria* (1/13), a kod neoperisanih HRS pacijenata, primenom ISNS\_komb metode, dokazano je 57 izolata iz 6 rodova. Utvrđene vrste gljiva se nisu razlikovale u fiziološkim i patološkim stanjima, osim za *A. fumigatus* koji je značajno dominirao kod pacijenata sa AGRS.

**Ključne reči:** Gljive, fungalni rinosinuzitis, hronični rinosinuzitis, nazalna polipoza, metode, indukcija sinonazalnog sekreta, aspiracija, lavaža, jednoćelijska suspenzija

**Naučna oblast:** Mikrobiologija

**Uža naučna oblast:** Mikologija

**UDK broj:** 4600/16



## ABSTRACT

In recent decades fungi become one of the leading causes of disease in humans. Given fungi are widespread in the air and in the living space (indoor and outdoor), fungi are commonly cause fungal infections (FI) of the upper and lower respiratory tract (RT) which lead to chronic infection. Fungi are present in dust and air of hospital rooms, air conditioning and damp walls bathrooms, represent an important reservoir of infection. It is easily spread through the air and have the ability to penetrate to the lowest parts of the RT, or to be kept in the sinus cavities. Spore sized 10 to 100 microns are stopped in the sinuses, nasal cavity, pharynx and larynx and in these places create deposits. The RT ruled dark, warm and moist conditions that are ideal for the propagation of fungi in the lungs. The most common outdoor isolates of fungi are *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium*, whereas the most common indoor isolates are *Stachybotris*, *Fusarium* and *Rhodotorula*. Human exposure to indoor and outdoor fungal spores in the air is inevitable and the inhalation of fungal spores is one of the "trigger" for the development of immunopathological processes in the RT, which can be in the form of allergic reactions or infection. Fungi that cause diseases in humans can be divided into two categories according to the pathogenic potential: opportunistic and strict pathogens. The most frequent causes of FI of RT are opportunistic molds.

Detection of fungi in RT is crucial for timely initiation of therapy and positive outcome. Diagnosis of FI in RT depends on numerous factors such as the expertise of clinicians to make timely suspects FI, properly selected and sampled clinical material, the time required from sampling to results and sensitivity (Sn) and specificity (Sp) of existing diagnostic tests. Cultivation of clinical samples from the upper and lower parts of the RT is the "gold standard" for diagnosis of FI. Sn of mycological methods for the detection of fungus varies with the type and quality of the sample, the pretreatment of the sample and the experience and skills of laboratory technicians and doctors. The advantage of cultivation is isolation and identification of antigen and possibility for testing of antifungal susceptibility.

Quickly and accurately confirm the presence of the fungus in the lower and upper parts of RT is very important for timely application of the therapy, shortening the duration of illness, lowering the percentage of complications and prevent the development of invasive FI (IFI). Although the fungus can be isolated from nasal secretions of healthy

people, their presence in nasal secretions is not always diagnostic criteria for the diagnosis of FI. Standard microbiological analysis of clinical samples of upper parts of RT for detection of fungi and bacteria include: (i) taking a swab of nasal mucosa, (ii) cultivation on nutrient media and (iii) macroscopic and microscopic identification of the isolated microorganisms. Smear as insensitive and nonspecific methods for the detection of fungi in the sinuses, with a low positive predictive value (PPV), but also conventional "standard method", is the leading problem in diagnosis of FI of sinuses. The low percentage of detection of fungi in swab showed poor correlation with clinical and radiological findings of patients with suspected fungal rhinosinusitis (FRS). The development of new methods for detection of fungi in the sinuses is of great clinical importance. Diagnostic methods used for sampling and processing of clinical material from the lower parts of RT in patients with suspected presence of fungi in the lungs, represent an excellent model for the formation of diagnostic methods for the detection of fungi in the upper parts of RT. According to the model of induction of sputum, mucin and/or sinonasal secretion that coats the sinus cavity can be induced by using mucolytic substances (7% NaCl). Hypertonic NaCl reduces the viscosity of purulent mucus, increases the activity of the cilia of upper parts of the RT, the speed of movement of mucus through the sinuses and facilitates ejection content. In a similar manner, ejecting and induced of sinonasal secret can be performed by lavage (ISNS\_L) and collection directly into the nutrient medium which reduces possibility of contamination by mold from the air. Also, the model of bronchoscopy, where is aspirated/sampled the contents of the bronchi under sterile conditions, ISNS from the sinuses can be aspirated (ISNS\_A).

Fungi on the mucosa of the sinuses are incorporated in mucin or tissue of nasal polyps (NP), which makes their extraction difficult and the isolation of fungi from such content is disabled. Existing protocols for the treatment of BAL and sputum can be modified and applied to the mucin and ISNS from the sinuses. The application of new protocols for making single-cell suspensions (SSS) of tissue NP could significantly increase the Sn/Sp of standard culture method for the detection and isolation of fungi.

Using simple, inexpensive and reproducible diagnostic model for the detection of fungi in the lower sections of RT for may have important implications for determining the significance of the presence of the fungus in the sinuses in physiological and

pathological conditions, as well as for timely diagnosis of FRS and prevention and development of allergies or IFI. Recent research should focus on the development and standardization of new and reliable methods for induction, sampling, and processing of ISNS\_L and ISNS\_A from the sinuses of patients with suspected FI in the upper parts of RT, with the aim of early and timely diagnosis.

The main objective of the research was to evaluate the newly formed methods for: (i) ISNS with lavage and aspiration of secretions, (ii) processing of NP to SSS and (ii) interpretation of the findings of fungi in physiological and pathological conditions in patients with chronic rhinosinusitis (CRS).

In the period from 01.02.2012 to 01.08.2014 hybrid study was carried out, the combination of: (i) clinical experiment and (ii) a case-series. It is planned that the evaluation methods ISNS performed in all study patients, however, due to the extensive process of NP or induced FESS a certain number of patients, methodological were divided into two groups. The study was performed on a group of treated patients with CRS (FESS group) and a group of conservatively treated patients (group CRS). FESS group consisted of patients who were operated by FESS because of the presence of NP. CRS group consisted of: (i) patients who did not performed pretreatment (PT) of nasal cavum before sampling method is applied; (ii) patients who have undergone PT and toilets of nasal cavum before the sampling method is applied and (iii) patients who finished only the first phase of clinical and epidemiological studies, without second phase consisting of mycological and radiological analysis.

Implementation and evaluation of clinical and allergy-rhinologic criteria selected HCRS patients and specific CRS scoring system has been created, based on the criteria of "proven" fungi in the sinuses and the regression analysis which revealed 10 criteria important for prediction of FRS ( $FRS_{index}$ ). Scoring system consists of "major" ( $FRS_{index2}$ ) and "minor" criteria ( $FRS_{index1}$ ).

It is shown next prevalence: CRS (13.8%), NP (4.2%), FRS (2.8%), AFRS (1.5%), non-allergic FRS (1.3%) and invasive FRS 0% in the group of CRS patients.

Next protocol for sampling and processing are optimized: (i) tissue - method SSS and (ii) secretion/mucin - ISNS\_A, ISNS\_L and ISNS\_comb (ISNS\_A and ISNS\_L simultaneously). A high percentage of finding of the fungi is determined by using SSS in reFESS patients (42.1%), ISNS\_L with PT in conservatively treated patients (24.5%),

SSS in pFESS patients (23.2%) and low by using ISNS\_A in conservatively treated patients with PT (10%) and by swab with PT (5.3%) in conservatively treated patients. Performed new ISNS methods were evaluated by comparison of 10 criteria that perform prediction of FRS ( $FRS_{index}$ ) and the results of the methods of ISNS (presence of fungi in the sinuses). The highest values of Sp/Sn are shown in ISNS\_comb method with PT (89%; 96%) as well as highest value of PPV/NPV are shown for ISNS\_comb method (94%; 93%) and ISNS\_L method (93%; 87%) with PT. The proposed protocol for ISNS allows the extraction of fungi from muco-purulent secretion in patients with FRS for improved detection and isolation of fungi. The proposed protocol for the treatment of NP tissue to SSS increases the likelihood of isolation of fungi from the NP. The classification of the findings of the fungi in the sinuses is done on: (i) physiological findings (colonization/microbiome of sinuses) based on one positive finding of fungi in the sinuses by swab and (ii) pathological findings based on one positive finding of fungi in the sinuses using SSS or ISNS\_A or ISNS\_comb or two consecutive positive findings of fungi in the sinuses by ISNS\_L method. In patients with NP 13 isolates of *Aspergillus flavus* (8/13), *A. niger* (4/13) and *Alternaria* (1/13) are isolated by using of SSS. In CRS patients treated conservatively, 57 isolates from 6 genera are isolated by using of ISNS\_comb method. Identified fungal species did not differ in physiological and pathological conditions, except for *A. fumigatus*, which is significantly dominated in patients with allergic fungal rhinosinusitis (AFRS).

**Keywords:** Fungi, fungal rhinosinusitis, chronic rhinosinusitis, nasal polyps, methods, induction of sinonasal secretion, aspiration, lavage, single-cell suspension.

**Scientific field:** Microbiology

**Scientific area:** Mycology

**UDK number:** 4600/16

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	17
1.1. Medicinski značajne gljive .....	18
1.1.1. Podela gljiva - <i>Indoor</i> i <i>outdoor</i> gljive u vazduhu .....	18
1.1.2. Najčešće oportunističke i striktno patogene gljive uzročnici respiratornih infekcija.....	20
1.1.3. Podela gljiva prema patogenom potencijalu za ljude.....	24
1.2. Metode za dokazivanje prisustva gljiva u respiratornom traktu .....	25
1.2.1. Mikološke i patohistološke metode za detekciju gljiva .....	27
1.2.2. Imunološke i molekularne metode za detekciju gljiva.....	31
1.2.3. Dokazivanje prisustva gljiva u respiratornom traktu - reprezentativnost uzoraka i razvoj novih metoda .....	32
1.3. Gljive i respiratorni trakt .....	36
1.3.1. Fiziološko prisustvo gljiva u respiratornom traktu .....	38
1.3.2. Prisustvo gljiva u respiratornom traktu i alergija .....	38
1.3.3. Prisustvo gljiva u respiratornom traktu i infekcija.....	39
1.3.4. Prisustvo gljiva u respiratornom traktu kod visokorizičnih pacijenata i invazivna fungalna (gljivična) infekcija.....	40
1.3.5. Gljivični rinosinuzitis (GRS) .....	41
1.3.6. Metode vizuelizacije sinusa .....	43
1.4. Naučni doprinos disertacije .....	44
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	46
3. MATERIJAL I METODE .....	48
3.1. Mesto i period održavanja.....	49
3.2.1. Inkluzioni kriterijumi .....	50
3.2.2. Ekskluzioni kriterijumi.....	50
3.2.3. Operisani pacijenti (grupa FESS).....	51
3.2.4. Neoperisani pacijenti (grupa HRS) .....	52
3.3. Metodologija studije .....	55
3.3.1. Uzorak vazduha.....	57
3.4. Podloge, reagensi i aparatura .....	57
3.4.1. „Trostruki“ set podloga za uzorkovanje i izolaciju gljiva i bakterija.....	57

3.5. Rastvori za indukciju sinonazalnog sekreta.....	58
3.5.1. Hipertonični fiziološki rastvor .....	58
3.5.2. Sputasol.....	58
3.6. Aparatura za uzorkovanje i obradu uzoraka ISNS.....	59
3.6.1. Ultrazvučna kada.....	59
3.6.2. Mukus ekstraktor.....	59
3.6.3. PARI-SINUS inhalator.....	60
3.6.4. Aspirator.....	60
3.7. Laboratorijske dijagnostičke procedure.....	61
3.7.1. Kožne probe ( <i>Skin prick test</i> ).....	61
3.7.2. Ukupna IgE At u serumu.....	62
3.7.3. Specifična anti-gljivična IgE At.....	62
3.7.3. Eozinofili (Eo) u perifernoj krvi.....	63
3.8. Kliničke dijagnostičke procedure .....	63
3.8.1. Rinoskopski pregled.....	63
3.8.2. Kompjuterizovana tomografija (CT).....	63
3.9. Dizajn metoda uzorkovanja .....	64
3.9.1. Funkcionalna endoskopska hirurgija sinusa (FESS).....	65
3.9.2. Bris nosnog kavuma .....	66
3.9.3. Lavaža indukovnog sinonazalnog sekreta (ISNS_L) .....	67
3.9.4. Aspiracija indukovnog sinonazalnog sekreta (ISNS_A).....	67
3.9.5. Uzorkovanje vazduha iz životnog/radnog prostora pacijenata .....	68
3.10. Uzorci.....	69
3.10.1. Obrada uzoraka .....	69
3.10.2. Izolacija i identifikacija gljiva i bakterija.....	73
3.11. Instrumenti merenja .....	74
3.12. Statistička analiza podataka .....	78
4. REZULTATI .....	80
4.1. Sociodemografske karakteristike i grupe HRS pacijenata.....	81
4.1.1. Sociodemografske i kliničke karakteristike operisanih pacijenata .....	81
4.1.2. Sociodemografske i kliničke karakteristike neoperisanih pacijenata.....	81
4.1.3. Karakteristike grupa operisanih HRS (FESS) pacijenata i nalaz gljiva.....	82

4.1.4. Karakteristike grupa neoperisanih HRS pacijenata i nalaz gljiva .....	83
4.1.5. Povezanost sociodemografskih i kliničkih karakteristika operisanih HRS (FESS) pacijenata i nalaza gljiva .....	84
4.1.6. Povezanost i sociodemografske karakteristike neoperisanih HRS pacijenata i nalaza gljiva.....	84
4.1.6.1. Sociodemografske karakteristike grupa $HRS_{PT+}$ i $HRS_{PT-}$ .....	85
4.1.6.2. Sociodemografske karakteristike grupe HRS u odnosu na učešće pacijenata u ispitivanju.....	86
4.2. Prikaz mikrobiološkog nalaza po uzorku iz sinusa pacijenata sa HRS korišćenjem metoda jednoćelijske suspenzije, ISNS i bris nosnog kavuma.....	87
4.2.1. Prikaz sinusa sa pozitivnim nalazom gljiva u jednoćelijskoj suspenziji NP.	87
4.2.2. Prikaz sinusa sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS_A bez pretretmana (PT) grupe $HRS_{F+/PT-}$ .....	88
4.2.3. Prikaz sinusa sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS_A, ISNS_L i brisu nosnog kavuma sa PT grupe $HRS_{F+/PT+}$ .....	90
4.2.4. Procenat pozitivnosti gljiva u odnosu na metodu i/ili kombinaciju metoda .	92
4.2.5. Procenat pozitivnosti bakterija u odnosu na metodu i/ili kombinaciju metoda .....	95
4.2.6. Prikaz izolata gljiva i bakterija u odnosu na grupu pacijenata sa GRS.....	96
4.2.7. Distribucija vrsta i rodova gljiva u uzorku vazduha iz životnog prostora pacijenata sa HRS.....	97
4.3. Kliničke karakteristike pacijenata sa HRS i određivanje težine bolesti .....	99
4.3.1. Kliničke karakteristike pacijenata sa HRS i određivanje težine bolesti.....	99
4.3.2. Alergološke karakteristike pacijenata sa HRS .....	100
4.3.3. Utvrđivanje povezanosti kliničkih i alergoloških karakteristika HRS pacijenata sa nalazom gljiva.....	102
4.3.3. Multivarijantna regresiona analiza kliničkih i alergoloških kriterijuma za predikciju GRS.....	107
4.3.4. Definisane kriterijuma, indeks sistema i algoritma za kliničku predikciju GRS .....	113
4.3.4.1. Indeks sistem za kriterijume za kliničku predikciju GRS.....	113
4.3.5. Definisane algoritma za kliničku predikciju GRS .....	114

4.3.6. Softver za predikciju GRS i praćenje pacijenata sa HRS (e-SINONAZAL-LabNet).....	116
4.4. Evaluacija metode za ISNS u cilju detekcije gljiva .....	117
4.4.1. Prevalencija FESS-a kod HRS+NP pacijenata .....	117
4.4.2. Prevalencija HRS i GRS u odnosu na opštu populaciju .....	117
4.4.3. Performanse i ispitivanje tačnosti metode za obradu tkiva NP do jednoćelijske suspenzije u cilju detekcije gljiva kod operisanih pacijenata.....	118
4.4.4. Performanse i ispitivanje tačnosti metode ISNS u cilju detekcije gljiva kod neoperisanih pacijenata .....	118
4.4.5. Primena metode za ISNS i detekcija gljiva i interpretacija u fiziološkim i patološkim stanjima.....	122
5. DISKUSIJA .....	123
6. ZAKLJUČCI .....	150
7. LITERATURA .....	153
8. PRILOZI.....	171
9. BIOGRAFIJA.....	182



## SPISAK SKRAĆENICA

<b>ABPA</b> , alergijska bronhopulmonarna aspergiloza	<b>HRS<sub>PT+</sub></b> , HRS pacijenti sa PT
<b>AGRS</b> , alergijski gljivični rinosinuzitis	<b>HRS<sub>PT+/F-</sub></b> , HRS pacijenti sa PT i negativnim nalazom gljiva
<b>AI</b> , intolerancija na aspirin	<b>HRS<sub>PT+/F+</sub></b> , HRS pacijenti sa PT i pozitivnim nalazom gljiva
<b>At</b> , antitelo	<b>IA</b> , inhalatorni alergeni
<b>BAL</b> , bronhoalveolarni lavat	<b>IgE</b> , imunoglobulin E
<b>BLF</b> , blankofor	<b>IGI</b> , invazivna gljivična infekcija
<b>BSN</b> , bris sluznice nosa	<b>ISNS</b> , indukcija sinonazalnog sekreta
<b>CDA</b> , hrom agar	<b>ISNS<sub>A</sub></b> , ISNS i aspiracija
<b>CT</b> , kompjuterizovana tomografija	<b>ISNS<sub>komb</sub></b> , ISNS <sub>A</sub> i 2x ISNS <sub>L</sub>
<b>Dg</b> , dijagnoza	<b>ISNS<sub>L</sub></b> , ISNS i lavaža
<b>DMP</b> , direktni mikroskopski preparat	<b>KA</b> , krvni agar
<b>DTM</b> , dermato-test medium	<b>KOH</b> , kalijum hidroksid
<b>EIA</b> , <i>enzyme immunoassay</i>	<b>LCB</b> , <i>Lacto phenol cotton blue</i> boja
<b>ELISA</b> , <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	<b>MR</b> , magnetna rezonanca
<b>Eo</b> , eozinofili	negativnim nalazom gljiva
<b>FESS</b> , funkcionalna endoskopija sinusa	<b>NP</b> , nazalni polipi
<b>FESS<sub>F-</sub></b> , operisani pacijenti sa negativnim nalazom gljiva	<b>NPV</b> , negativna prediktivna vrednost
<b>FESS<sub>F+</sub></b> , operisani pacijenti sa pozitivnim nalazom gljiva	<b>PCR</b> , <i>polymerase chain reaction</i>
<b>F</b> , gljive/fungi	<b>PDA</b> , potato dekstroni agar
<b>GI</b> , gljivična infekcija	<b>CA</b> , Czapek agar
<b>GRS</b> , gljivični rinosinuzitis = FRS, fungalni rinosinuzitis	<b>pFESS</b> , prvi FESS
<b>GRS<sub>index</sub></b> , kriterijumi za predikciju GRS	<b>PH</b> , patohistologija
<b>H&amp;E</b> , hematoksin eozin bojenje	pozitivnim nalazom gljiva
<b>HRS</b> , hronični rinosinuzitis	<b>PPV</b> , pozitivna prediktivna vrednost
<b>HRS<sub>F-</sub></b> , HRS pacijenti bez pozitivnog nalaza gljiva (sa i bez PT)	<b>PT</b> , pretretman
<b>HRS<sub>F+</sub></b> , HRS pacijenti sa pozitivnim nalazom gljiva (sa i bez PT)	<b>reFESS</b> , više od 1 prethodni FESS
<b>HRS<sub>PT-</sub></b> , HRS pacijenti bez PT	<b>RT</b> , respiratorni trakt
<b>HRS<sub>PT-/F-</sub></b> , HRS pacijenti bez PT i sa	<b>Rtg</b> , rendgen
<b>HRS<sub>PT-/F+</sub></b> , HRS pacijenti bez PT i sa	<b>SDA</b> , Saburo dekstrozni agar
	<b>sIgE At</b> , specifična IgE At
	<b>SPT</b> , kožne probe ( <i>skin prick test</i> )
	<b>UZ</b> , ultrazvuk
	<b>VAS</b> , vizuelno analogna skala
	<b>VRP</b> , visoko rizični pacijenti

## **1. UVOD**

## 1.1. Medicinski značajne gljive

Gljive su ubikvitarni eukariotski mikroorganizmi koji opstaju i kao saprofiti i kao invazivni mikroorganizmi u tkivima ljudi i biljaka. Poslednjih decenija, gljive su postale jedan od vodećih uzročnika bolesti kod ljudi (Portnoy i sar., 1993; Ebbens i sar., 2007). Obzirom na opšteprisutnost rezervoara gljiva u vazduhu i životnom prostoru (*indoor* i *outdoor*), gljive su česti izazivači gljivičnih oboljenja gornjih i donjih partija respiratornog trakta (RT), a zbog svoje specifične građe i neefikasnosti humanog imunološkog odgovora, za razliku od bakterija i virusa, često dovode do hroničnih infekcija RT. Do skoro, najčešćim uzročnicima oboljenja gornjih i donjih puteva RT smatrane su bakterije i virusi (Bosch i sar., 2013). Međutim, poslednje dve decenije, kako su se razvijale metode za uzorkovanje i izolaciju gljiva, a samim tim sproveden i sve veći broj istraživanja, gljivama se daje sve veći značaj u oboljenjima gornjih i donjih partija RT, posebno u alergijskim i imunokompromitovanim stanjima (Ebbens i sar., 2007).

### 1.1.1. Podela gljiva - *Indoor* i *outdoor* gljive u vazduhu

Kod imunokompromitovanih pacijenata, gljive prisutne u prašini i vazduhu bolesničkih soba, klima uređajima, vodovodnim cevima i vlažnim zidovima kupatila ili suvom cveću i hrani, predstavljaju važan rezervoar infekcije (tabela 1) (Pana i sar., 2014).

**Tabela 1. Podela *indoor* gljiva prema nivou vlage materijala koji nastanjuju**

A) Veoma vlažna sredina	Rod/vrsta
<p>Kupatila</p> <p>Vodovodne cevi</p> <p>Vlažni zidovi</p> <p>Kuvano povrće</p>	<p><i>Alternaria alternata</i></p> <p><i>Aspergillus fumigatus</i></p> <p><i>Epicoccum</i> spp.</p> <p><i>Exophiala</i> spp.</p> <p><i>Fusarium moniliforme</i></p> <p><i>Mucor plumbeus</i></p> <p><i>Phoma herbarum</i></p> <p><i>Phialophora</i> spp.</p> <p><i>Rhizopus</i> spp.</p> <p><i>Stachybotrys chartarum</i> (<i>S. atra</i>)</p> <p><i>Trichoderma</i> spp.</p> <p><i>Ulocladium consortiale</i></p> <p><i>Rhodotorula</i> spp.</p> <p><i>Sporobolomyces</i> spp.</p>
B) Umereno vlažna/suva sredina	Rod/vrsta
<p>Zemlja</p> <p>Nameštaj</p> <p>Kućno cveće</p>	<p><i>Aspergillus flavus</i></p> <p><i>Aspergillus versicolor</i></p> <p><i>Cladosporium cladosporioides</i></p> <p><i>Cladosporium herbarum</i></p> <p><i>Cladosporium sphaerospermum</i></p> <p><i>Mucor circinelloides</i></p> <p><i>Rhizopus oryzae</i></p>
C) Prašina i vazduh	Rod/vrsta
<p>Građevinski materijali</p> <p>Klime</p> <p>Suve biljke</p>	<p><i>Alternaria citri</i></p> <p><i>Aspergillus (Eurotium) amstelodami</i></p> <p><i>Aspergillus candidus</i></p> <p><i>Aspergillus (Eurotium) glaucus</i></p> <p><i>Aspergillus niger</i></p> <p><i>Aspergillus penicillioides</i></p> <p><i>Aspergillus (Eurotium) repens</i></p> <p><i>Aspergillus restrictus</i></p> <p><i>Aspergillus versicolor</i></p> <p><i>Paecilomyces variotii</i></p> <p><i>Penicillium aurantiogriseum</i></p> <p><i>Penicillium brevicompactum</i></p> <p><i>Penicillium chrysogenum</i></p> <p><i>Penicillium commune</i></p> <p><i>Penicillium expansum</i></p> <p><i>Penicillium griseofulvum</i></p> <p><i>Fusarium</i> spp.</p>

Preuzeto i modifikovano: WHO guidelines for indoor air quality: dampness and molds. 2009 WHO, Copenhagen, Denmark

### 1.1.2. Najčešće oportunističke i striktno patogene gljive uzročnici respiratornih infekcija

Gljive predstavljaju taksonomsko carstvo sastavljeno od eukariotskih organizama. Imaju širok morfološki diverzitet veličine od jednoćelijskih do višećelijskih. Postoje u formi mikrogljiva (vidljive samo mikroskopski) i u formi makrogljiva. Identifikovano je oko 69.000 rodova, 1.5 milion vrsta (Ryan KJ i Ray CG, 2004; Bernstein i sar., 2012) i preko 100 različitih sojeva kod pojedinih vrsta (San-Blas i Calderone, 2008). Morfološki se dele na kvasnice i plesni, a medicinski značajne plesni se nalaze u 3 razdela (Phylum):

- (i) Zygomycotina,
- (ii) Ascomycotina i
- (iii) Basidiomycotina.

Filamentozne plesni su najčešće saprofitni ili simbiotski mikroorganizmi, ali postoje vrste koje su striktno ili oportunistički patogeni i one su od najvećeg značaja za humanu medicinu (Park i sar., 2004; San-Blas i Calderone, 2008) (tabela 2).

**Tabela 2. Najčešće oportunističke i striktno patogene gljive uzročnici infekcija RT**

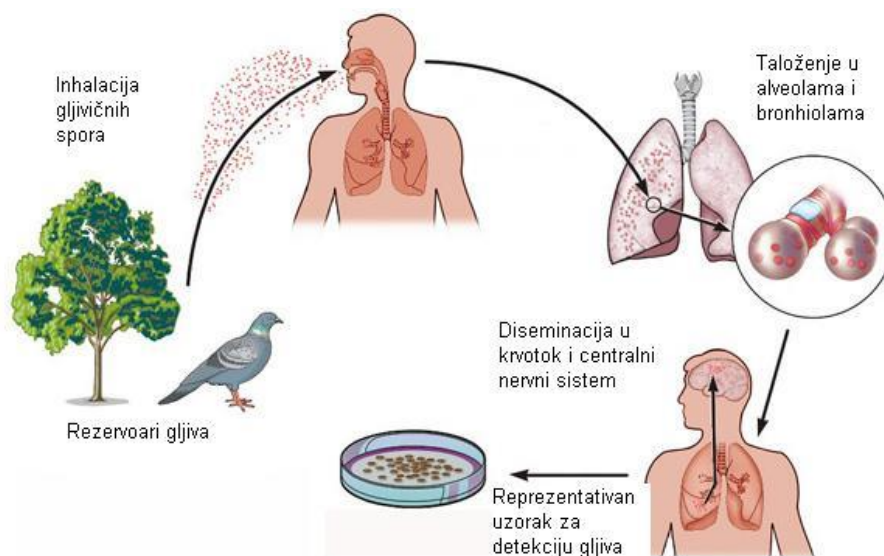
KOSMOPOLITSKE VRSTE*			ENDEMSKE VRSTE**
A) HIJALINE PLESNI	B) TAMNE PLESNI (BLACK MOLDS)	C) KVASNICE	D) BIFAZNE GLJIVE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Pneumocystis</i> spp.	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium</i> sp.		<i>Coccidioides immitis</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>cladosporioides</i> sp.		
<i>Chrysosporium zonati</i>	<i>Curvularia geniculata</i>		
<i>Fusarium solani</i>	<i>Curvularia lunata</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>		
<i>Schizophyllum commune</i>			
<i>Absidia corymbifera</i>			
<i>Mucor</i> spp.			
<i>Rhizopus oryzae</i>			

\*Oportunističke vrste; \*\*Striktno patogene vrste. Reference: Ryan KJ i Ray CG, 2004; San-Blas i Calderone, 2008

Ciklus razmnožavanja pojedinih gljiva ima dve faze: seksualni i aseksualni. Gljive koje se reprodukuju seksualnim putem se nazivaju "*fungi perfecti*" i one su telemorfne. Reprodukcijska gljiva rezultuje formiranjem seksualnih *spora* (San-Blas i Calderone, 2008). Gljive koje se

razmnožavaju isključivo aseksualno su klasifikovane kao "*fungi imperfecti*" (San-Blas i Calderone, 2008; Bernstein i sar., 2012). Gljive koje se razmnožavaju aseksualno su anamorfne i ovaj proces rezultuje produkcijom *konidija*.

Širenje gljiva se vrši putem seksualnih spora i aseksualnih konidija. U zavisnosti od vrste variraju u veličini (2-70  $\mu\text{m}$ ), obliku (sferne, koke, lanci), a njihov fenotip može biti korišćen za diferencijaciju vrsta (Park i sar., 2004). Zbog svoje veličine, specifične građe i ubikvitarnosti u prirodi, lako se šire putem vazduha i imaju sposobnost da prodru do najnižih delova donjih partija RT, ili da se zadrže u sinusnim šupljinama. Gljive koje imaju male spore/konidije imaju sposobnost da inhalacijom budu unešene do najudaljenijih segmenata donjih partija RT (alveola i bronhiola). Većina spora/konidija se zadržava na nivou bronhija ili nosa/sinusa zahvaljujući trepljastim epitelnim ćelijama (slika 1).



**Slika 1. Inhalacija gljivičnih spora iz životnog okruženja**

\*Preuzeto i modifikovano sa: <http://medicalmycology.fa.com>

Veličina gljivičnih spora varira u zavisnosti od vrste, a od veličine spora zavisi primarno mesto kolonizacije RT gljivama. Partikule dijametra do 10  $\mu\text{m}$  prolaze gornje partije RT i zaustavljaju se u gornjim delovima pluća, najčešće u bronhijama, dok najsitnije čestice (5-1  $\mu\text{m}$ ) prodiru do najnižih partija pluća, do bronhiola i alveola (Park i sar., 2004). U RT vladaju tamni, topli i vlažni uslovi koji predstavljaju idealne uslove za razmnožavanje plesni u plućima (tabela 3) (Nygaard i sar., 2004; Denning i sar., 2014; Nielsen i sar., 2014).

**Tabela 3. Geografska distribucija gljiva uzročnika oboljenja pluća**

Rod i vrste	Geografska distribucija	Reference
<b>A) HIJALINE PLESNI*</b>		
<i>Aspergillus flavus</i>	Velika Britanija	Denning i sar., 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Škotska	Warris A, 2014
<i>Aspergillus nidulans</i>	Kalifornija, SAD	He i sar., 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Indija Tanzanija	Ali i sar., 2013 Pohl i sar., 2013
<i>Chrysosporium zonati</i>	Utah, SAD Nigerija	Lanspa i Hatton, 2014 Ekkena i sar., 2007
<i>Fusarium oxysporum</i>	Italija	Tortorano i sar., 2014
<i>Fusarium solani</i>	Texas, SAD	Terasaki i sar., 2014
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Danska	Nielsen i sar., 2014
	Japan	Oshikata i sar., 2013
	Austrija	Geltner i sar., 2013
<i>Mucor</i> spp.	Brazil	Neto i sar., 2014
<i>Rhizopus microspores</i>	Massachusetts, SAD	Tsyrukunou i sar., 2014
<i>Rhizopus oryzae</i>	Koreja Srbija	Kim i sar., 2014 Vidović i sar., 2013
<b>B) TAMNE PLESNI (BLACK MOLDS)*</b>		
<i>Bipolaris spicifera</i>	Japan	Kobayashi i sar., 2008
<i>Alternaria alternata</i>	Indija	Shashikala i sar., 2013
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Finska	Leino i sar., 2013
	Tajvan	Chen i sar., 2014
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Malezija	Satyavani i sar., 2010
<b>C) KVASNICE*</b>		
<i>Cryptococcus</i> spp.	Minesota, SAD	Kaplan i sar., 2015
	Južna Afrika	Grahner i sar., 2014
<i>Pneumocystis</i> spp.	Singapur	Chew i sar., 2015
<b>D) BIFAZNE GLJIVE**</b>		
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Centralna i zapadna Afrika	Raselli, 2013
	Latinska Amerika	González-González i sar., 2014
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	SAD	Bariola i sar., 2011
	Južna Afrika	Youssef i sar., 2013
<i>Coccidioides immitis</i>	Arizona, SAD	Leake i sar., 2000
	Kalifornija, SAD	Baron i sar., 1996

\* Oportunističke i kosmopolitske vrste; \*\* Striktno patogene i endemske vrste

Manje spore, ali i spore dimenzija 10 do 100 µm bivaju zaustavljene u sinusima, nosnom kavumu, farinksu i larinksu i na ovim mestima stvaraju depozite (tabela 4) (Chang i sar., 2013; Shin i sar., 2007; Knutsen i sar., 2012).

**Tabela 4. Geografska distribucija gljiva uzročnika oboljenja sinusa**

Rod i vrste	Geografska distribucija	Reference
<b>A) HIJALINE PLESNI*</b>		
<i>Aspergillus flavus</i>	Velika Britanija	Denning i sar., 2014
	Škotska	Warris A, 2014
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Tajvan	Chi i sar., 2014
	Indija	Upadhyay i sar., 2014
<i>Aspergillus niger</i>	Tunis	Shahed i sar., 2014
	Kina	Yan i sar., 2014
	Hjuston, SAD	Porter i sar., 2014
<i>Fusarium oxysporum</i>	Velika Britanija	Stammlberger, 2000
<i>Fusarium solani</i>	Poljska	Twaruzek i sar., 2014
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Indija	Jain i sar., 2014
<i>Penicillium marneffeii</i>	Kalifornija, SAD	Murr i sar., 2012
	Iran	Hashemia i sar., 2012
<i>Absidia corymbifera</i>	Francuska	Bellanger i sar., 2010
	Indija	Mouhammed i sar., 2004
	Brazil	Severo i sar., 2002
<i>Mucor spp.</i>	Brazil	Neto i sar., 2014
	Indija	Kini i sar., 2012
	Koreja	Cho i sar., 2014
	Australija	Lazar i sar., 2014
	Belgija	Dusart i sar., 2013
	Oregon, SAD	Monroe i sar., 2013
<i>Rhizopus microspores</i>	Francuska	Penicaud i sar., 2013
<i>Rhizopus oryzae</i>	Indija	Abilkassem i sar., 2013
	Srbija	Pekic i sar., 2010
<b>B) TAMNE PLESNI (BLACK MOLDS)*</b>		
<i>Stachybotris chartarum (atra)</i>	Kanada	Bitnun i Nosal, 2000
<i>Culvularia lunata</i>	Misuri, SAD	Knutsen i sar., 2012
<i>Alternaria alternata</i>	Koreja	Chang i sar., 2013
	Kanada	Maloney i sar., 2010
	Srbija	Pesic i sar., 2015
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Koreja	Shin i sar., 2007
	Španija	Resano i sar., 1997
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Francuska	Sattler i sar., 2014

\* Oportunističke i kosmopolitske vrste

Brojni autori su se u svojim studijama bavili determinacijom vrsta "indoor" i "outdoor" gljiva i njihovih elemenata, u cilju određivanja koncentracije spora u vazduhu (Al-Suwaine i sar., 1999; Kurup i sar., 2000). Prevalencija gljivičnih spora u vazduhu zavisi od geografske lokalizacije, praćeno razlikama u sezonskim, temperaturnim, prostornim i meteorološkim karakteristikama (Mitakakis i McGee, 2000; Bergamini i sar., 2004). Iako sezonsko variranje koncentracija gljivičnih spora u vazduhu nije drastično kao variranje koncentracije alergena polena trava i korova, ipak je najviša koncentracija zabeležena u



prolećnim i letnjim mesecima. Prosečna koncentracija gljivičnih spora u vazduhu po jednom m<sup>3</sup> se kreće oko 101-105. Najčešći "outdoor" izolati gljiva su vrste roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium*, dok su najčešći "indoor" izolati gljiva vrste roda *Stachybotris*, *Fusarium* i *Rhodotorula* (Kurup i sar., 2000; De Hoog, 2000). Takođe, značajni rezervoari gljiva u životnom okruženju/bolnicama su vlažne prostorije i zidovi, klima uređaji, vodovodne cevi, kupatila i suvog cveća i biljaka (tabela 1A). Ovi uslovi predstavljaju idealna staništa za pojedine vrste gljiva. Najubikvitarnije gljive pripadaju trećoj grupi koju čine gljive najčešće izolovane iz vazduha, građevinskog materijala i klima uređaja, kao što su vrste rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (tabela 1C i tabela 2). Koncentracija kućnih "indoor" gljivičnih alergena je oko pet puta niža od "outdoor" koncentracije spora gljiva, mada ovaj odnos varira u zavisnosti od prisustva visoke vlage pre svega u prostorijama, ali i napolju (Salo i sar., 2005). Indoor koncentracija i tip gljivičnih spora zavisi od prisustva vlage, tepiha, kućnih ljubimaca i starog drvenog nameštaja (Salo i sar., 2005). Outdoor gljivične spore takođe mogu biti nađene u zatvorenom prostoru, a njihova koncentracija zavisi od ventilacije i zagađenja spoljašnjeg vazduha koji ulazi u prostoriju prilikom provetravanja. Izloženost ljudi "indoor" i "outdoor" gljivičnim sporama u vazduhu je neizbežna, a inhalacija spora gljiva je jedan od „okidača“ za nastanak imunopatoloških procesa u RT, koji može biti u vidu alergijske reakcije individue (imunokompetentna, Th2 osoba) ili u vidu infekcije (imunokompromitovana osoba) (Gots i sar., 2003).

### 1.1.3. Podela gljiva prema patogenom potencijalu za ljude

Gljive koje uzrokuju oboljenja ljudi se mogu podeliti na dve kategorije prema patogenom potencijalu (tabela 2): oportunističke i striktno patogene.

1. **Oportunističke gljive** široko rasprostranjene u prirodi, koje mogu da izazovu bolesti RT kod imunokompromitovanih pacijenata, i alergije kod imunokompetentnih osoba. Ovoj grupi pripada veliki broj **hijalinih** i **tamnih plesni** koje rastu na ~28°C, ali i pojedine kvasnice. Poseban rod gljiva, koji ima sposobnost da izaziva infekcije RT najčešće imunokompromitovanih osoba, predstavlja *Pneumocystis* sp., koja je klasifikovana kao gljiva nalik kvasnici odnosno "yeast-like" (De Hoog, 2000). Od oko 70.000 vrsta gljiva samo neki rodovi hijalinih i tamnih plesni, kvasnica i "yeast-like" gljiva uzrokuju često oboljenja ljudi (tabela 2).

2. **Striktne patogene gljive** koje predstavljaju **bifazne ili dimorfne gljive**, imaju dve faze rasta - jednu na 28°C kao plesni i drugu na 37°C kao kvasnice. U ovu grupu spadaju rodovi *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Coccidioides*. One su endemske za područje Amerike, Afrike i Azije i najčešće dovode do infekcija pluća kod imunokompromitovanih pacijenata, ali i imunokompetentnih osoba (tabela 2) (Kaplan i sar., 2015).

Najčešći izazivači gljivičnih infekcija RT su oportunističke plesni. Ovoj grupi pripada veliki broj filamentoznih gljiva (tabela 2), čije se spore i konidije nalaze široko rasprostranjene u vazduhu i inhalacijom dovode do kolonizacije sluznice RT. Kolonizacija sluznice RT može da vodi ka razvoju hipersenzitivnosti na prisustvo gljivičnih alergena kod imunokompetentnih Th2 osoba, ili do razvoja infekcije kod osoba sa imunokompromitovanim statusom. Broj osoba kod kojih su gljive značajan uzrok morbiditeta i/ili mortaliteta je u stalnom porastu (Mendoza i sar., 2014) zbog čega je važna njihova detekcija i eliminacija.

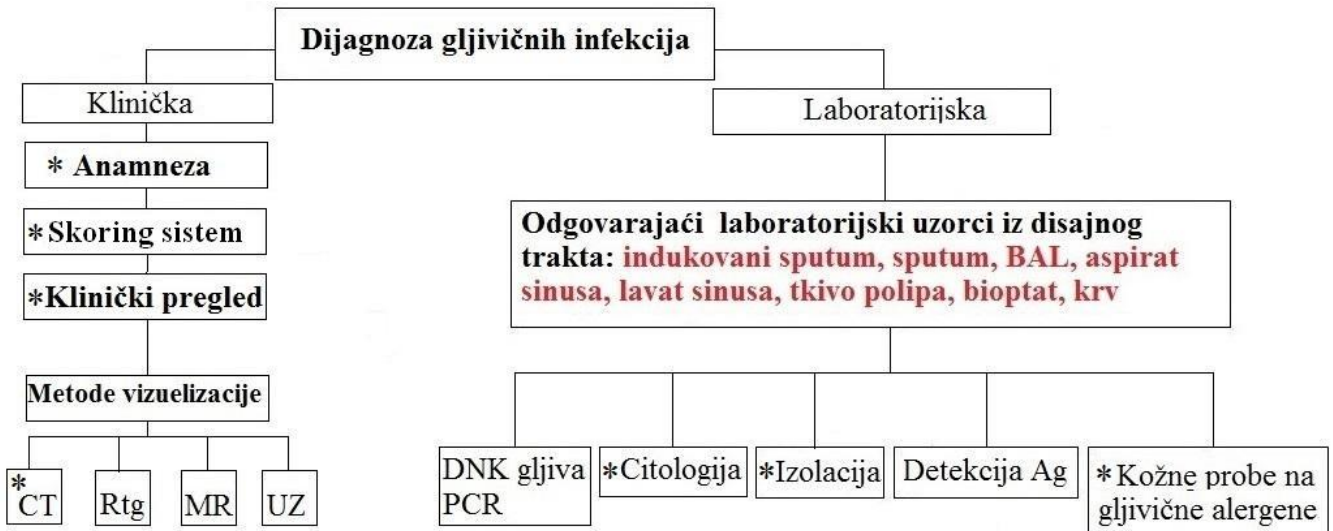
## 1.2. Metode za dokazivanje prisustva gljiva u respiratornom traktu

Detekcija gljiva u RT je ključna za pravovremeno započinjanje terapije i pozitivan ishod lečenja. Dijagnoza gljivičnih infekcija (GI) RT zavisi od brojnih faktora kao što su stručnost kliničara da pravovremeno posumnja na GI, pravilno odabran i uzorkovan klinički materijal, vreme potrebno od uzorkovanja do rezultata i senzitivnosti (Sn) i specifičnosti (Sp) postojećih dijagnostičkih testova (Steinbach i sar., 2003). Dijagnostičke metode za detekciju gljiva su u stalnom razvoju, međutim, sve češća primena imunosupresivnih lekova u terapiji pacijenata sa malignitetima, veći broj dijagnostikovanih slučajeva AIDS-a, kao i neselektivna primena antibiotika širokog spektra, doveli su do porasta incidencije GI, posebno oportunističkih (Douglas i sar., 2015).

Dijagnoza GI u RT je još uvek izazov, obzirom na nisku Sn/Sp brisa. Posledica toga je odloženo započinjanje lečenja ili odsustvo dijagnoze GI. Brzina dijagnostičkih procedura, ali i visoka pozitivna i negativna prediktivna vrednost, ključne su odrednice tačne i pravovremene dijagnoze GI RT (Barnes i sar., 2008).

Dijagnoza GI RT podrazumeva kliničku i laboratorijsku dijagnostiku (grafikon 1). Klinička dijagnostika obuhvata klinički pregled i metode vizuelizacije, od kojih je kompjuterizovana tomografija (CT) od posebnog značaja.

Laboratorijska dijagnoza GI obuhvata uzorkovanje reprezentativnog kliničkog materijala, pravilnu obradu uzorka i primenu odgovarajuće metode (standardnih mikoloških, imunoloških i/ili molekularnih metoda) (tabela 5).



**Grafikon 1. Dijagnoza gljivičnih infekcija gornjih i donjih partija RT**

\* Metode koje su korišćene u ovom radu

Za pravovremenu dijagnozu GI veoma je važno kako kliničko tako i laboratorijsko iskustvo lekara i medicinskog osoblja. Standardna dijagnoza GI gornjih i donjih partija RT se oslanja primarno na mikološke i patohistološke metode za detekciju gljiva koje podrazumevaju citologiju i izolaciju gljiva (tabela 5). Paralelno sa razvojem sve većeg broja novo-identifikovanih gljivičnih vrsta od značaja za humanu patologiju, razvijale su se i nove, imunološke i molekularne metode za identifikaciju i detekciju gljiva koje su svojim mogućnostima i brzinom prevazišle standardne mikološke metode. Međutim, ove, “*non culture*” metode imaju mali značaj u standardnoj dijagnostici GI u donjim i gornjim partijama RT, obzirom na ubikvitarnost gljiva i mogućnost kontaminacije, ali i visoku cenu analize i probleme koji prate standardizaciju medicinskih metoda za detekciju gljiva.

**Tabela 5. Dijagnostičke metode za dokazivanje prisustva gljiva u kliničkom materijalu iz RT**

Dokazivanje prisustva gljiva u kliničkom materijalu	
Vrste metoda	Vrsta analize
Citologija	<b>DMP</b>  Nativni KOH FR Bojeni LCB Fluorescencija BLF
	<b>PH</b> <i>Gomori methenamin silver</i> <i>Grocott methenamin silver</i> <i>Fontana-Masson</i> H&E
Izolacija gljiva	<b>Kultura</b>  SDA PDA CDA CA GACA
<b>Imunologija</b> Detekcija Ag gljiva	Latex aglutinacija
	ELISA
	EIA
	Imunodifuzija
Detekcija anti-gljivičnih At	ELISA
	Imunodifuzija
	Intradermalni test
<b>Molekularna</b> Detekcija DNK gljiva	
	PCR

### 1.2.1. Mikološke i patohistološke metode za detekciju gljiva

Kultura, direktni mikroskopski preparat (DMP) i patohistološke analize (PH) su najčešće korišćene metode za detekciju gljiva u kliničkom materijalu. Korišćenje mikoloških podloga kao i posebnih bojenja za PH i DMP omogućavaju vizuelizaciju i detekciju svih gljiva, kao i njihovu kultivaciju (osim *Rhinosporidium seeberi* i *Pneumocystis* spp. koji se ne kultivišu) (Pal i sar., 2014). Senzitivnost mikoloških metoda za detekciju gljiva varira od vrste i kvaliteta uzorka, prethodne obrade uzorka i iskustva i veština laboranta i lekara. Kultivacija kliničkih uzoraka iz gornjih i donjih partija RT predstavlja "zlatni standard" za

dijagnozu GI (Hsin i sar., 2008). Prednost kultivacije je mogućnost izolacije i identifikacije uzročnika GI. Izolacija patogena na kulturi omogućava izradu testa osetljivosti gljiva na antimikotike (AM). Međutim, korišćenje kultivacije za dijagnozu GI RT ima značajne limitacije. Kultivacija je dijagnostički metod koji zahteva vreme, pa od uzorkovanja do izdavanja finalnog rezultata može da prođe nekoliko dana do nedelja, obzirom na specifičan način i tempo razmnožavanja filamentoznih plesni. Često, pri sumnji na diseminovanu GI gljivom roda *Aspergillus*, hemokultura ostane negativna sve do kasne faze infekcije, što je pokazano u preko od 50% slučajeva (Fraser i sar., 1992; Ostrosky-Zeichner i Pappas, 2006; Ostrosky-Zeichner, 2012), ali i pozitivan nalaz često može biti posledica kontaminacije (Kontoyiannis i sar., 2000). Sa druge strane specifično za GI RT, uzorci indukovano sputuma ili aspirata sinusa u preko 80% slučajeva pokazuju pozitivan nalaz ukoliko zaista postoji infekcija (Deepe, 2010). Kod gljiva koje ne spadaju u grupu oportunističkih, metod kultivacije pokazuje mnogo višu pozitivnu prediktivnu vrednost (PPV), o čemu govore podaci o oko 86% pozitivnih sputuma i 92% BAL-a kod pacijenata sa sumnjom na plućnu blastomikozu (Chapman i Sullivan, 2010). Sa druge strane nepravilan rad u laboratoriji sa kliničkim materijalom iz pluća i sinusa predstavlja biološku opasnost, a posebnu ukoliko su u uzorku prisute retke endemske gljive kao što je npr. *Blastomyces* sp. pa rad sa ovom vrstom materijala zahteva najviši nivo ekspertize laboratorijskog osoblja i korišćenje zaštitne opreme (Seitz i sar., 2015).

#### 1.2.1.1. Citologija

Od najvećeg značaja za detekciju gljiva su: (i) pravilan odabir kliničkog uzorka, (ii) pravilna obrada kliničkog uzorka i (iii) primena odgovarajućih metoda - citologije i/ili izolacije (Kozel i sar., 2014; Frickmann i sar., 2015; Warhurst i sar., 2015).

DMP predstavlja najbrži način za detekciju gljiva, što je omogućeno olakšanom vizuelizacijom putem "obeležavanja" ili bojenja gljiva specifičnim bojama koje se vezuju za ćelijski zid gljiva i imunofluorescentnim obeleživačima gljivičnih struktura (Aslanzadeh, 2002). Klinički materijal sa sumnjom na prisustvo gljiva se posmatra na svetlosnom mikroskopu na uveličanju od 10x i 40x, bojen ili nativan direktan, ili bojen ili nativan indirektan nakon porasta na kulturi (Kozel i sar., 2014). Takođe, korišćenjem fluorescentnih

boja kao što je Blankofor (BLF) ili Calcifluor white, gljive se vizuelizuju i lako detektuju na fluorescentnom mikroskopu (Posteraro i sar. 2013).

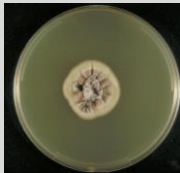

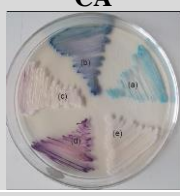
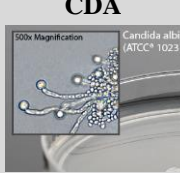

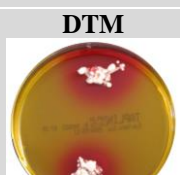
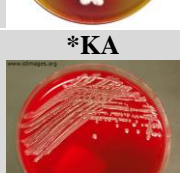
Međutim, s obzirom na specifičnu filamentoznu građu gljiva koje, one se inkorporiraju u mucin koji ispunjava sinuse i bez primene posebnih metoda za njihovu obradu i ekstrakciju, DMP neće detektovati njihovo prisustvo jer boja neće biti u mogućnosti da se veže za gljive. Takođe, mana DMP je i nemogućnost determinacije vrste, što omogućava jedino kultivacija (Warhurst i sar., 2015).

### **1.2.1.2. Kultivacija**

Mikološki, podloge se dele na: opšte, specijalne i diferencijalne. Postoji preko 30 različitih vrsta, a razlikuju se u zavisnosti od vrste i morfologije gljiva za čiju se izolaciju koriste. Gljive su ubikvitarni mikroorganizmi i rastu na najvećem broju materija organskog porekla. Idealni uslovi za rast gljiva su organske materije sa visokim procentom peptona i šećera (dekstroza) (Brand i sar., 2010; Nevalainen i sar., 2014). Saburoad dekstrozni agar (SDA) sa 4% glukoze ispunjava sve uslove neophodne za rast gljiva i predstavlja osnovnu podlogu za kultivaciju gljiva u medicinskoj mikologiji. SDA ima kiseli pH (5.6) koji inhibira rast većine bakterija, međutim vrlo često, bakterije iz kliničkih uzoraka predstavljaju propratni nalaz na SDA (Nevalainen i sar., 2014). Takođe, pojedine plesni mogu dati porast na bakteriološkim podlogama kao što je krvni agar (KA) sa 5-7% dodatka goveđe ili ovčije krvi. Specijalna podloga za rast plesni je Potato dekstrozni agar (PDA) koja omogućava produkciju spora i pigmenata (Brand i sar., 2010). Pregled najčešće korišćenih opštih, posebnih i diferencijalnih podloga u mikologije dat je u tabeli 6.

Za izolaciju mikroorganizama iz uzoraka iz gornjih i donjih partija RT treba koristiti više različitih podloga, obzirom da mnogući uzorčnici infekcije mogu biti plesni, kvasnice ili bakterije (Bailey i Scott, 2014). Brojne studije su potvrdile prednost metode kultivacije kao najznačajnije u dijagnostici GI gornjih partija RT (tabela 7).

**Tabela 6. Standardne podloge za izolaciju gljiva**

Vrsta podloge	Kategorija podloge	Posebne karakteristike	Izolacija uzročnika	Primena u mikologiji
<b>*SDA</b> 	Opšta mikološka	Uslovi za rast većine plesni i kvasnica (4% glukoza)	Plesni, kvasnice i određene bakterije	Izolacija Kultivacija Cuvanje sojeva
<b>*PDA</b> 	Specijalna	Sporulacija i produkcija pigmenata	Plesni	Izolacija Kultivacija Identifikacija Cuvanje sojeva
<b>CA</b> 	Diferencijalna	Diferencijacija vrsta	<i>Candida</i> spp.	Izolacija Kultivacija Identifikacija
<b>CDA</b> 	Specijalna	Produkcija hlamidospora	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	Izolacija Kultivacija Identifikacija
<b>GACA</b> 	Specijalna	Razlikovanje <i>C. neoformans</i> od <i>Candida</i> spp.; Produkcija kapsule <i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	Izolacija Kultivacija Identifikacija
<b>DTM</b> 	Specijalna	Selektivna za dermatofite (promena boje podloge)	Grupa dermatofita	Izolacija Kultivacija Identifikacija
<b>*KA</b> 	Opšta bakteriološka	Uslovi za rast većine bakterija; 5-7% goveđe ili ovčije krvi	Bakterije, određene plesni i kvasnice	Izolacija Kultivacija

Referenca: Johnson A.J. BD Diagnostics. 2<sup>nd</sup> Edition. Manual od Microbiological Culture Media, 2009. BDC, Maryland USA. \*Podloge koje su korišćene u ovoj studiji

**Tabela 7. Zastupljenost gljiva u kliničkim uzorcima iz gornjih partija RT pacijenata sa HRS korišćenjem tri metode za detekciju gljiva**

Studija	Zemlja	Uzorak	Vrsta mukolitika	Izolacija (%)	Citologija	
					DMP (%)	PH (%)
<b>Twaruyek i sar., 2014</b>	Poljska	ISNS_L maksilarnih sinusa	Hipertoničan fiziološki rastvor	67	/	/
<b>Challa i sar., 2014</b>	Indija	ISNS_L maksilarnih sinusa	Hipertoničan fiziološki rastvor	60.8	/	40
<b>Buzina i sar., 2003</b>	Austrija	ISNS_L maksilarnih sinusa	Hipertoničan fiziološki rastvor	91.3	/	76.4
<b>Gao i sar., 2007</b>	Kina	ISNS_L maksilarnih sinusa	Dithiotreitol	44	/	78
<b>Polzelhl i sar., 2005</b>	Nemačka	ISNS_L maksilarnih sinusa	Izotoničan fiziološki rastvor	44	/	/
<b>Kennedy i sar., 2005</b>	SAD	ISNS_A maksilarnih sinusa	/	45.5	/	35.1
<b>* Barać i sar., 2015</b>	Srbija	Tkivo NP	/	23.2	1.8	/
<b>Braun i sar., 2003</b>	Austrija	Tkivo NP	/	91.3	/	75.5
<b>Buzina i sar., 2003</b>	Austrija	Tkivo NP	/	84	4.3	70.2

\* Podaci dobijeni u ovom doktoratu

### 1.2.2. Imunološke i molekularne metode za detekciju gljiva

Različite imunološke i molekularne metode se koriste za detekciju gljiva u kliničkom materijalu ili za ispitivanje odgovora domaćina na prisustvo gljiva (tabela 5). Najčešće se koriste brzi i pouzdani serološki imunološki testovi kao što su ELISA, EIA, imunodifuzija i latex aglutinacija, koji su jednostavni i komercijalni (Lass-Flörl C, 2007). U današnje vreme, razvoj molekularnih metoda kao što su PCR ili DNK probe je omogućio bržu, senzitivniju i specifičniju dijagnostiku GI (Lass-Flörl C, 2007). Međutim, mana ovih dijagnostičkih metoda jeste laka mogućnost kontaminacije uzoraka i nedostatak standardizacije PCR, pa se one za dijagnozu GI gornjih partija RT retko koriste. Prikaz učestalosti primene mikoloških,



patohistoloških, imunoloških i molekularnih metoda za dokazivanje prisustva gljiva u gornjim partijama RT dat je u tabeli 8.

**Tabela 8. Prikaz učestalosti primene pojedinačnih metoda za dokazivanje prisustva gljiva u gornjim partijama RT**

Mikrobiološke i PH metode	* Učestalost primene metoda za detekciju gljiva u sinusima (broj radova o pojedinačnoj metodi/ukupan broj metodoloških radova)
<b>Klasične</b>	
Izolacija/Kultura PDA SDA CA CDA	44% (559/1270)
Citologija/PH Gomori methenamin silver Grocott methenamin silver Fontana-Masson H&E	64.5% (820/1270)
Citologija/DMP Blankofor Lactophenol cotton blue KOH FR	7% (81/1270)
<b>Imunološke metode za detekciju At/Ag gljiva</b>	
ELISA Imunodifuzija Intradermalni test Latex aglutinacija EIA	4% (55/1270)
<b>Molekularne</b>	
PCR Detekcija DNK gljiva	10% (124/1270)

\* Izvor: Pubmed (po 27.03.2015; ključne reči: metode, gljive, sinusi, detekcija)





### 1.2.3. Dokazivanje prisustva gljiva u RT - reprezentativnost uzoraka i razvoj novih metoda

Brzo i tačno dokazivanje prisustva gljiva u donjim i gornjim partijama RT je veoma važno zbog pravovremene primene terapije, skraćanja trajanja bolesti, snižavanja procenta nastanka komplikacija i sprečavanja razvoja invazivnih gljivičnih infekcija (IGI). Siguran dokaz za prisustvo gljiva u RT je detekcija gljivičnih elemenata u BAL-u, aspiratu, indukovanom sekretu sinusa ili tkivu mukoze sinusa i nazalnih polipa (NP), primenom patohistoloških i/ili mikoloških metoda (Frickmann i sar., 2015). Iako se gljive mogu

izolovati iz nazalnog sekreta zdravih ljudi, njihovo prisustvo u nazalnom sekretu ne predstavlja uvek dijagnostički kriterijum za dijagnozu GI u gornjim partijama RT (Chakrabarti i sar., 2009). Standardna mikrobiološka analiza kliničkih uzoraka gornjih partija RT u cilju detekcije gljiva i bakterija podrazumeva: (i) uzimanje brisa sluznice nosa (BSN) kojim se uzorkuje nazalni sekret sa sluzokože nosa, (ii) zasejavanje ovog kliničkog materijala na hranljivim podlogama i (iii) makroskopska i mikroskopska identifikacija izolovanog mikroorganizma (Lopez-Diaz i sar., 1997; Rogers i sar., 2003).

Bris, kao nesenzitivna i nespecifična metoda za detekciju gljiva u sinusima, sa niskom pozitivnom prediktivnom vrednošću (PPV), ali ujedno konvencionalna "standardna metoda", je vodeći problem u dijagnostici GI sinusa (Adoga i sar., 2010). Uzorci uzeti standardnim, pamučnim brisom, koji predstavlja najčešći metod uzorkovanja, nisu reprezentativni obzirom da ova vrsta brisa ima mogućnost uzorkovanja samo sadržaja sa površine sluznice nosnog kavuma, što je bez dijagnostičkog značaja. Analogno ovoj proceduri, bilo bi uzimanje brisa grla u cilju dokazivanja prisustva gljiva u plućima, što nije klinički i dijagnostički značajno (Chovanec i sar., 2014). Nizak procenat detekcije gljiva u BSN u cilju dijagnostike GI sinusa je pokazao lošu korelaciju sa kliničkim i radiološkim nalazima pacijenata sa sumnjom na gljivični rinosinuzitis (GRS) (Lund, 1997; Rogers i sar., 2003; Adoga i sar., 2010). Takođe, dosadašnja istraživanja su pokazala nizak procenat izolovanih sojeva gljiva, te se smatra da broj dokazanih GRS ovom metodom predstavlja samo vrh ledenog brega (Rogers i sar., 2003; Soler i sar., 2008). Kako je pokazano da je BSN nerelevantna metoda za detekciju gljiva u gornjim partijama RT, patohistološki preparati često lošeg kvaliteta zbog lošeg uzorka, rinoskopski i CT znaci nespecifični, od velikog kliničkog značaja je razvijanje novih metoda za detekciju gljiva u sinusima ili primena postojećih metoda za uzorkovanje kliničkog materijala iz drugih regija i za dijagnostiku drugih patoloških stanja (Adoga i sar., 2010). Tako, na primer, korišćenje briseva sa četkicom za *scraping* ili brisa sa gustim četkastim pokrovom od najlonskog ili silikonskog materijala, koji su do sada korišćeni za uzorkovanje cervikalnog brisa za Papa-Nikolau test ili pri sumnji na genitalnu infekciju bakterijom roda *Chlamydia*, mogu biti od velikog značaja za dobijanje reprezentativnog uzorka bogatog ćelijama i/ili mucinom iz gornjih partija RT (tabela 9).

**Tabela 9. Vrste brisa koje se koriste za mikrobiološku laboratorijsku dijagnostiku**

Vrsta brisa	Tehničke karakteristike	Reprezentativnost uzorka/mane	Primena u medicini	Primena za detekciju gljiva u sinusima (literatura)
<p><b>Pamučni</b></p> 	Drveni/plastični bris sa pamučnim krajem	Niska apsorptivna moć, Nizak Dg značaj	Promene na koži, noktima, jeziku i bukalnoj sluznici	<b>Sulaiman i sar. 2014</b>
<p><b>Sa četkicom</b></p> 	Plastični bris sa silikonskom četkicom za skreping	Kvalitetan klinički materijal (skreping) Visok Dg značaj	Bris za Papa-Nikolaou, detekciju hlamidija i gonoreje, cervikalni, analni i kornealni bris	/
<p><b>* Sa četkastim vlaknima</b></p> 	Tanak plastični/metalni bris sa najlonskim četkastim pokrovom	Visoka apsorptivna moć Visok Dg značaj	Nazofaringealni Perinazalni Uretralni Vaginalni Bris usne duplje	<b>Nys i sar. 2010</b>
<p><b>Transportni</b></p> 	Plastični bris sa epruvetom sa transportnom podlogom	Transport mikroorganizama koji zahtevaju posebne uslove Visok Dg značaj	Tečni medijum za transport virusa, aerobni i anareobni uslovi za transport bakterija	/

\* Bris korišćen u ovoj studiji

Dijagnostičke metode koje se primenjuju za uzorkovanje i obradu kliničkog materijala iz donjih partija RT kod pacijenata sa sumnjom na prisustvo gljiva u plućima, predstavljaju odličan model za formiranje i evaluaciju dijagnostičkih metoda za detekciju gljiva u gornjim

partijama RT (Dickson i sar., 2014). Po modelu indukcije sputuma, mucin i/ili sinonazalni sekret koji oblaže sinusne šupljine može biti indukovano primenom mukolitičke supstance kao što je 7% hipertonični fiziološki rastvor (NaCl). Hipertonični NaCl smanjuje viskoznost nepurulentnog i purulentnog mukusa, povećava aktivnost cilija gornjih partija RT, brzinu kretanja mukusa kroz sinuse i nosni kavum i olakšava izbacivanje sadržaja (Ponikau i sar., 1999; Buzina i sar., 2009). Na sličan način kao što se vrši izbacivanje i uzorkovanje indukovano sputuma, može biti izvršena metoda indukcije sinonazalnog sekreta uz lavažu (ISNS\_L) izbacivanjem i kolekcijom direktno na hranljivu podlogu čime se smanjuje mogućnost kontaminacije plesnima iz vazduha. Takođe, po modelu bronhoskopije, gde se pod sterilnim uslovima aspirira/uzorkuje sadržaj iz bronhija, ISNS iz sinusa može biti aspiriran (ISNS\_A) pod sterilnim uslovima i sačuvan za mikološku obradu i analizu (Dickson i sar., 2014).

Obzirom da imaju filamentoznu građu, gljive se na mukozi sinusa "ugrade" u mucin ili tkivo NP, čime je njihovo ekstrahovanje otežano, a izolacija gljiva iz takvog sadržaja onemogućena (Hsin i sar., 2008). Kako je sastav mucina u sinusima veoma sličan BAL-u i sputumu u plućima, postojeći protokoli za obradu BAL-a i sputuma, mogu biti modifikovani i primenjeni na mucin i ISNS iz sinusa (Dickson i sar., 2014). Primena novih protokola za pravljenje jednoćelijske suspenzije od tkiva NP bi mogli značajno da povećaju Sn/Sp standardnih *culture* metoda za detekciju i izolaciju gljiva.

Korišćenje jednostavnih, jeftinih i reproducibilnih dijagnostičkih modela za detekciju gljiva u donjim partijama RT za formiranje novih dijagnostičkih modela za uzorkovanje kliničkog materijala iz gornjih delova RT i detekciju gljiva, može imati značajne implikacije na utvrđivanje značaja prisustva gljiva u sinusima u fiziološkim i patološkim uslovima, a time pravovremenu dijagnozu GRS i sprečavanje razvoja alergije ili IGI (Hsin i sar., 2008). Novija istraživanja bi trebalo da se fokusiraju na razvoj i standardizaciju novih i pouzdanih metoda za indukciju, uzorkovanje, i obradu ISNS\_L i ISNS\_A iz sinusa kod pacijenata sa sumnjom na GI u gornjim partijama RT, a u cilju rane i pravovremene dijagnoze.

### 1.3. Gljive i respiratorni trakt (RT)

Infekcije RT se dele na akutne i hronične. Akutne infekcije gornjih i donjih partija RT su najčešće prouzrokovane prisustvom bakterija i virusa, a hronične helmintima, gljivama ili bakterijama (npr. *Mycobacterium* spp.) (slika 2).

Uzroci hroničnih parenhimatoznih oboljenja RT (pluća) mogu biti infektivne (gljive, paraziti, bakterije) i neinfektivne prirode (sarkoidoza, karcinomi, kolagenoza, fibroza) (tabela 10). Uzroci hroničnih parenhimatoznih oboljenja RT (sinusa) mogu biti infektivne (gljive, bakterije) i neinfektivne prirode (tumori, ciste, NP) (tabela 10).

Hronične infekcije RT traju dugo, njihovo lečenje je skupo, diferencijalna dijagnoza teška, a terapija često bez efekta. Komplikacije hroničnih infekcija RT su česte, posebno kod pacijenata sa imunosupresijom (leukemije, karcinomi, transplantacije organa) i mogu biti fatalne. Razvoj agresivnih formi hroničnih gljivičnih infekcija RT povećavaju troškove bolničkog lečenja i stopu mortaliteta (Denning i sar., 2014).

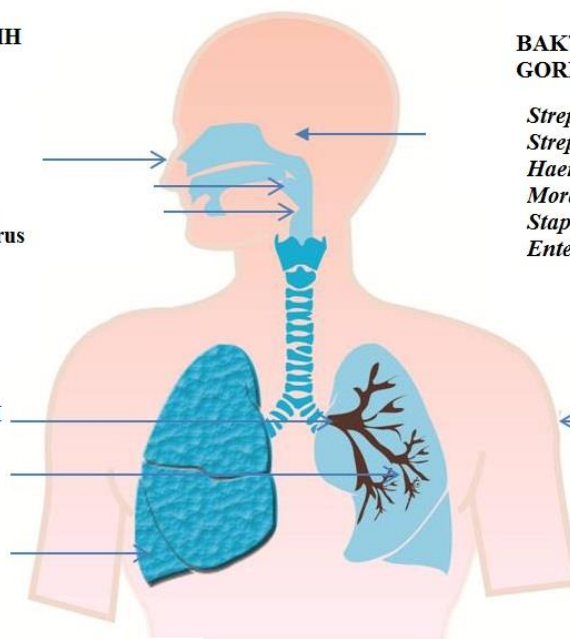
**Tabela 10. Najčešći uzroci hroničnih parenhimatoznih oboljenja RT**

Pluća		Sinusi	
Infektivni	Neinfektivni	Infektivni	Neinfektivni
Gljive Helminti Bakterije ( <i>Mycobacterium</i> spp.)	Sarkoidoza Kolagenoza Fibroza	Gljive Bakterije ( <i>S. aureus</i> )	Tumori Ciste NP Destrukcije koštanog tkiva

Reference: Denning i sar., 2014; Hopkins i sar., 2013

#### VIRUSI - INFEKCIJE GORNJIH DISAJNIH PUTEVA

Rhinovirus  
Coronavirus  
Parainfluenca virus  
Influenca virus  
Respiratorni sincicijalni virus  
Herpesvirus  
Adenovirus  
Coxsackie virus



#### BAKTERIJE - INFEKCIJE GORNJIH DISAJNIH PUTEVA

*Streptococcus pneumoniae*  
*Streptococcus piogenes*  
*Haemophilus influenzae*  
*Moraxella catarrhalis*  
*Staphylococcus aureus*  
*Enterobacteriaceae spp*

#### VIRUSI - INFEKCIJE DONJIH DISAJNIH PUTEVA

Influenca virus  
Parainfluenca virus  
Adenovirus  
Bocavirus  
Metapneumovirus  
Respiratorni sincicijalni virus

#### BAKTERIJE - INFEKCIJE DONJIH DISAJNIH PUTEVA

*Streptococcus pneumoniae*  
*Streptococcus piogenes*  
*Haemophilus influenzae*  
*Moraxella catarrhalis*  
*Staphylococcus aureus*  
*Enterobacteriaceae spp*  
*Mycoplasma pneumoniae*  
*Chlamidia pneumoniae*  
*Legionella pneumophila*  
*Mycobacterium tuberculosis*

**Slika 2. Bakterije i virusi najčešći izazivači akutnih oboljenja RT**

Preuzeto i modifikovano sa <http://zeroinfections.blogspot.com/2012/08/respiratory-tract-infections.html>

Prisustvo gljiva u gornjim partijama RT može biti *fiziološko* (kolonizacija) i *patološko* (infekcija ili alergija). Kolonizacija sluznice nosa i sinusa gljivama i bakterijama predstavlja normalan mikrobiom ove regije, a prisustvo spora i konidija gljiva može da ukaže na udahnute gljivične elemente iz vazduha, bez patoloških promena. Prisustvo gljiva u sinusima može predstavljati i patološko stanje, u slučaju da su gljive svojim prisutvom na sluznici dovele do razvoja infekcije ili izazvale alergijsku reakciju. Bolesti nastaju usled prolongiranog kontakta gljiva sa sluznicom RT predisponiranih osoba sa alergijskom konstitucijom (Bergamini i sar., 2004). Jedno od patoloških stanja izazvanog prisustvom gljiva u sinusima je GRS. GRS predstavlja zapaljenje sluznice paranazalnih sinusa i sluznice nosnog kavuma uzrokovano prisustvom gljiva.

Za lečenje GRS u SAD godišnje potroši 5.8 milijardi dolara (Lund, 1997), simptomi GRS su intenzivni, a kvalitet života i radna sposobnost pacijenata sa ovim oboljenjem je značajno smanjena (Wensing i sar., 2001).

### 1.3.1. Fiziološko prisustvo gljiva u respiratornom traktu

Kolonizacija predstavlja fiziološko prisustvo gljiva na sluznici RT koje čine normalan mikrobiom donjih i/ili gornjih partija RT bez pokretanja imunopatološkog odgovora (Pana i sar., 2014).

### 1.3.2. Prisustvo gljiva u respiratornom traktu i alergija

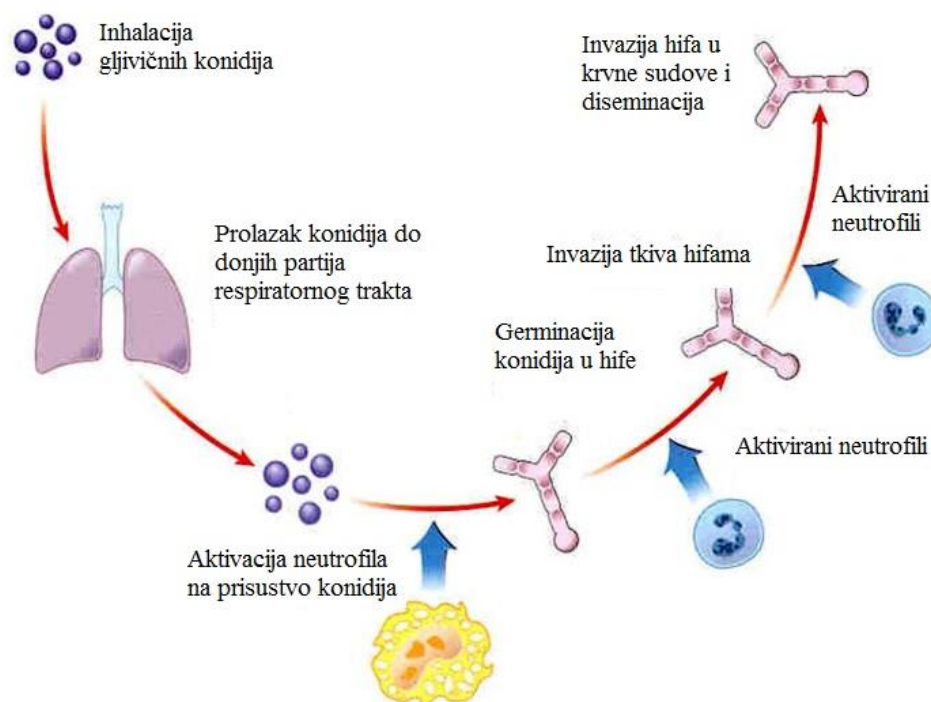
Kod predisponiranih osoba kolonizacija mukoze pluća i sinusa gljivama dovodi do razvoja alergije (Tokunaga i sar., 2015) i predstavlja ozbiljan problem. Danas, 25% populacije pati od nekog oblika alergije RT: (i) donji RT (astma, alergijska bronhopulmonalna aspergiloza/ABPA) ili (ii) gornji RT (hronični rinosinuzitis/HRS, hronični rinosinuzitis sa nazalnom polipozom/HRS+NP, alergijski gljivični rinosinuzitis/AGRS) (Edmondson i sar., 2005; Tokunaga i sar., 2015). Gljive kao alergeni dovode do hipersenzitivnosti regije sa kojom su došle u kontakt, a to je sluzokoža RT. Veličina udahnutih spora gljiva određuje da li će biti zadržane u gornjim ili donjim partijama RT. Oko 80 rodova gljiva može da uzrokuje alergije RT (Edmondson i sar., 2005; Nierman i sar., 2005; Schwienbacher i sar., 2005), a smatra se da su 25-30% alergijskih astmi pokrenute gljivičnim alergenima (Kurup i sar., 2002; Vijay i Kurup, 2004). Vijabilnost gljivičnih spora nije neophodna za razvoj alergijske reakcije, pa i nevijabilne spore i hife imaju sposobnost da izazovu hipersenzitivnu reakciju.

Plesni su potentni alergeni, jer poseduju brojne proteine, glikoproteine i ugljene hidrate koji imaju sposobnost da stimulišu imunski sistem i da se specifično vezuju za IgE At koja značajno produkuje kod predisponiranih osoba kao odgovor na prisustvo određene vrste gljiva (Esch i sar., 2004). Kompleksna biologija gljiva je usporila istraživanja i standardizaciju testova za ispitivanje hipersenzitivnosti na gljivične alergene u odnosu na istraživanja vezana za druge inhalatorne alergene. Kao rezultat toga, ne postoje dijagnostičke metode i protokoli koji bi odredili značaj konstantne inhalacije spora gljiva iz vazduha životnog prostora. Postojeće dijagnostičke metode su fokusirane na mali broj vrsta gljiva. Zbog toga, određivanje hipersenzitivnosti na gljivične alergene na osnovu *in vivo* i/ili *in vitro* testova nije potpuno. Zbog toga je potrebna primena mikrobioloških metoda u cilju izolacije i

identifikacije gljiva prisutnih u vazduhu i na sluznici sinusa/nosa pacijenta, kao i merenje koncentracije eozinofila (Eo), specifičnih i ukupnih IgE At (Tokunaga i sar., 2015).

### 1.3.3. Prisustvo gljiva u respiratornom traktu i infekcija

Imunokompromitovano stanje pacijenta je najčešća osnova za razvoj gljivičnih infekcija gornjih i donjih partija RT (Vijay i Kurup, 2004). Kada spore gljiva jednom dodju u unutrašnjost alveola, one mogu slobodno da se kreću između susednih alveola i prostora između ćelija. Ovaj prodor kroz alveole pokreće imunski sistem da odgovori produkcijom neutrofila koji imaju odbrambenu ulogu. Neutrofil ubijaju gljive i proizvode citokine, a pokretanuta zapaljenska reakcija dovodi do eliminacije gljiva (Vijay i Kurup, 2004). Međutim, kod osoba u neutropeniji, ova aktivnost izostaje, pa se gljive nesmetano razmnožavaju i vrše invaziju parenhima pluća ili sinusa, prodiru u cirkulaciju i uzrokuju IGI (slika 3) (Rieber i sar., 2015).



**Slika 3. Uloga neutrofila u razvoju invazivne gljivične infekcije - od inhalacije do diseminacije spora**

\* Preuzeto i modifikovano sa <http://www.sbs.utexas.edu/mycology/bio329/images/Aspergillosis/Neutrophil.jpg>



#### **1.3.4. Prisustvo gljiva u respiratornom traktu kod visokorizičnih pacijenata (VRP) i invazivna gljivična infekcija (IGI)**

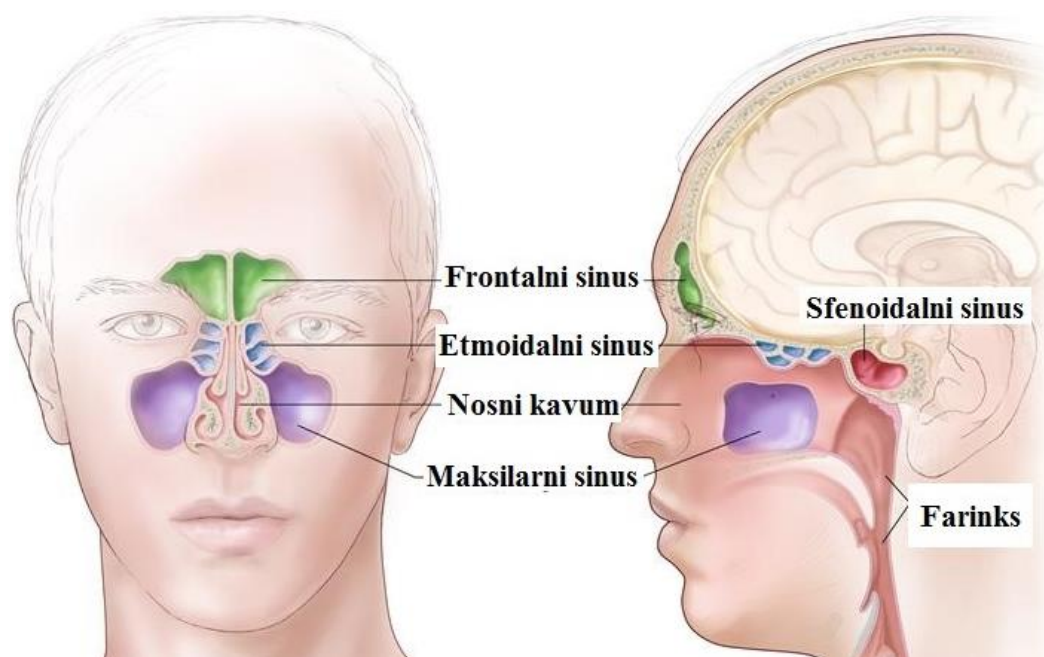
Hronične i nelečene gljivične infekcije RT predstavljaju rizik za razvoj IGI. Kod visokorizičnih pacijenata (VRP) smrtni ishod od IGI je 20-40% kod pojedinih vrsta gljiva pa do 90% kod reda Mucorales (Due i sar., 2006; Lestner i sar., 2015). IGI se razvija najčešće kod pacijenata sa neutropenijom, leukemijom, transplantiranim solidnim organima, primarnim ili sekundarnim imunodeficijencijama, cističnom fibrozom, neonatusima i prevremeno rođenom decom (Pana i sar., 2014; Lestner i sar., 2015). VRP za oportunističke GI su pacijenti sa: HIV-om, transplantiranim organima, pacijenti na imunosupresivnoj, hemo i radioterapiji terapiji (Neto i sar., 2014; Vidović i sar., 2013). Kolonizacija gljivama je prva faza za razvoj IGI kod VRP, te je od izuzetnog značaja njihova pravovremena detekcija u RT (Portnoy i sar., 1993) (slika 3). Razvoj metoda za pravilno uzorkovanje reprezentativnog kliničkog materijala i analiza mikrobioma gornjih i donjih partija RT i dokazivanje gljiva u spoljašnjoj i životnoj sredini su značajne za prevenciju IGI kod VRP (Summerbell 1990; Baxter i sar., 2011).

Infekcije gornjih i donjih partija RT treba posmatrati kao "bolesti ujedinjenih disajnih puteva", zbog svoje fizičke i funkcionalne povezanosti (Licari i sar., 2014). Prisustvo gljiva u plućima i njihov značaj u fiziološkim (mikrobiom) i patološkim stanjima (alergija, micetoma, infekcija, IGI), kao i metode za uzorkovanje i detekciju gljiva iz donjih partija RT, su poslednjih decenija bili predmet istraživanja brojnih studija i o njima postoje brojni podaci (Morris i sar., 2014; Baxter i sar., 2011; Chardle i sar., 2012). Međutim, podaci o metodama za uzorkovanje reprezentativnih uzoraka iz gornjih partija RT kao i za detekciju gljiva kod pacijenata sa sumnjom na GRS su limitirani, a metodološki protokoli su nestandardizovani.

Kako za donje partije RT postoje formirani kvalitetni protokoli i razvijene metode za uzorkovanje kliničkog materijala, pluća su odličan "model" i uzor za formiranje novih metoda za indukciju i uzorkovanje reprezentativnog sadržaja iz sinusa u cilju izolacije gljiva i određivanja značaja njihovog prisustva u fiziološkim i patološkim uslovima.

### 1.3.5. Gljivični rinosinuzitis (GRS)

Paranasalni sinusi su šupljine ispunjene vazduhom iz kojih se drenira sadržaj u nosni kavum putem sinusnih otvora (slika 4). Sposobnost sinusa da dreniraju normalnu količinu mukusnog sekreta zavisi od tri glavna fiziološka parametra: (i) prohodnosti sinusnih otvora, (ii) cilijarne funkcije i (iii) sastava/gustine mukusa (Lanza i sar., 1997).



**Slika 4. Paranasalni sinusi**

\*Preuzeto i modifikovano sa <https://www.designink.info/medicalcityent/images/sinus>

Nastanak patofiziološkog procesa i gubitak funkcije bilo kojeg od tri navedena parametra vodi ka oštećenju sluznice sinusa. Posledica toga može biti: inflamacija, edem, kolonizacija/infekcija bakterijama i/ili gljivama, mukocilijarna disfunkcija i opstrukcija protoka vazduha.

HRS karakteriše zadebljanje mukoze sinusa, uvećanje nosne školjke i okluzija sinusnih otvora. Takođe, prisustvo inhaliranih gljiva iz vazduha na mukozi gornjih partija RT negativno utiče na sva tri navedena parametra koja omogućavaju normalnu drenažu sinusa. Zadebljala mukoza paranasalnih sinusa onemogućava pravilan protok vazduha i drenažu sekreta, zbog čega se povećava pritisak unutar sinusa (Shin i sar., 2005). Takođe, protok krvi u sinusnoj sluznici je značajno usporen i dovodi do razvoja edema (Drettner i sar., 1989). Snažna konstrikcija vodi ka nastanku bola zbog pritiska edematozne mukoze sinusa na

senzorne receptore. Sastav mukusa je takođe značajno izmenjen u HRS, povećane je viskoznosti čime se smanjuje mogućnost za pravilnu drenažu sinusa (Ali i sar., 2005; Kim i sar., 2011).

"**Fungalna hipoteza**" je bila prvi pokušaj da se objasni etiologija HRS, u kojoj je HRS smatran intenzivnim imunskim i zapaljenskim odgovorom sluzokože nosa i paranazalnih sinusa na Ag gljiva iz roda *Alternaria* (Ponikau i sar., 1999; Sasama i sar., 2005). Uloga gljiva u nastanku HRS je predmet istraživanja mnogih kliničko-laboratorijskih studija, ali i predmet kontroverzi. Gljive su prisute u sinonazalnom sekretu, kao i na površini sluznice nosa od 26.7% do 93% (Tosun i sar., 2007). Pojedini autori smatraju da se ovde primarno radi o gljivičnoj kolonizaciji sluznice, bez značaja u etiopatogenezi HRS ili GRS. Iako su pojedini istraživači odbacili ovu teoriju, drugi autori smatraju da bi upravo gljive mogle predstavljati najvažniji faktor rizika koji dovodi do ponavljanja zapaljenskih promena u mukozi sinusa, (rekalцитrantnog HRS) i nastanka GRS (Ponikau i sar., 1999; Barać i sar., 2015).

Gornji delovi RT su u otvorenoj komunikaciji sa spoljašnjom sredinom sa jedne strane i plućima sa druge strane. Održavanje normalnog mikrobioma sinusa je od velikog značaja za održavanje ravnoteže među saprofitnim mikroorganizmima sluznice RT, koja predstavlja prvu liniju odbrane (Chakrabarti sar., 2009). Čelije sluznice RT, zahvaljujući svojim cilijama, imaju sposobnost da zadrže većinu sitnijih i sve krupnije gljivične spore i time onemoguće njihov prodor u organizam (Knowles i sar., 2013).

Uticaj gljiva na razvoj HRS nije potpuno razjašnjen, iako rezultati novijih istraživanja idu u prilog tvrdnji da je samo prisustvo gljiva u sinusima i na sluznici nosa pokretač imunopatološkog procesa koji vodi razvoju HRS+/-NP kao i ABPA (Vennewald i sar, 1999; DeShazo i sar., 1998; Hirotsu i sar, 2014; Telmesani i sar., 2009). Tvrdnje da gljive mogu da dovedu do IGI invazijom tkiva i razaranjem kostiju sinusa, ali i da prisustvo gljiva u sinusima ne mora uvek da vodi razvoju GRS ili IGI, pa čak ni pokretanju inflamacije sluznice sinusa, podržano je brojnim studijama (Hirotsu i sar, 2014; Vennewald i sar, 1999; deShazo i sar., 1998). Međutim, nije još uvek razjašnjeno na koji način gljive mogu da perzistiraju na sluznici sinusa bez pokretanja imunopatološkog procesa (DeShazo i sar., 1998; Ponikau i sar., 1999). O tome da je GRS još uvek nedovoljno ispitan entitet, kao i da predstavlja predmet brojnih istraživanja, govore i brojne klasifikacije GRS koje su se često menjale (Bent i Kuhn, 1999; Bent i Kuhn, 2005, Chakrabarti sar., 2009) a GRS je dugo bio nazivan "*Aspergillus sinusitis*" (DeShazo, 1997). Ovakav naziv potiče od činjenice da je *Aspergillus* godinama bio

predominantan rod izolovan iz sinusa pacijenata. Danas, međutim, postoji veliki broj studija o najčešćim rodovima gljiva izolovanim iz sinusa pacijenata gde se, pored vrsta roda *Aspergillus* (Chi i sar., 2014; Porter i sar., 2014), kao uzročnici FRS navode i druge rodove kao što su *Alternaria* (Chang i sar., 2013), *Fusarium* (Stammberger i sar., 2000), *Cladosporium* (Shin i sar., 2007) i druge. Takođe, dat je i odgovor na pitanje zašto pojedine gljive više "vole" sinuse nego pluća, te se češće mogu izolovati iz gornjih partija RT (tabela 4).

### 1.3.6. Metode vizuelizacije sinusa (CT)

Iako je CT zlatni standard za dijagnozu GRS i HRS, nije široko rasprostranjen kao dijagnostička procedura u zemljama sa nižim socio-ekonomskim statusom i često se radi tek nakon neuspelog FESS-a kada se planira ponavljanje procedure ili ukoliko postoji komplikacija HRS (Phillips i sar., 1995). Pokazano je da CT ima prednost nad drugim dijagnostičkim procedurama u detekciji promena u nosnom kavumu, ostiomeatalnom kompleksu i paranazalnim sinusima, a značajan je i kao vizuelizaciona metoda koja olakšava sprovođenje endoskopije sinusa. Takođe se smatra pouzdanom metodom za praćenje toka i oporavka pacijenata sa HRS i GRS, kao i pojave komplikacije (Bhattacharyya i sar., 2010). Postoje publikacije o korelaciji simptoma GRS i mikološkog i CT nalaza (Bhattacharyya i sar., 2010; Hopkins i sar., 2007; Bhattacharyya i sar., 2007). Neke studije su pokazale da patološki CT nalaz paranazalnih sinusa ne korelira i sa mikološkim nalazom GRS (Kenny i sar., 2001; Bhattacharyya i sar., 2007), dok su druge studije pokazale suprotno (Stewart i sar., 2000). Takođe, nije precizno utvrđen značaj Lund McKey skora za CT nalaz, i njegove korelacije sa kliničkim i mikološkim nalazom kod GRS (Basu i sar., 2005; Hoolbrok i sar., 2005).

Zbog nepreciznosti, potrebno je korelirati klinički rinološki i alergološki nalaz, subjektivnu ocenu simptoma i mikološki nalaz sa rezultatima CT skora u donošenju zaključka o dijagnozi GRS (Basu i sar., 2005; Havas i sar., 1988). Trebalo bi usmeriti istraživanja na modifikaciju postojećih CT skorova i ispitivanja korelacije CT skora sa kliničkim nalazom i subjektivnim simptomima (VAS skala) u cilju formiranja dijagnostičkog protokola koji bi olakšao dijagnostiku GRS.

#### 1.4. Naučni doprinos disertacije

Siguran dokaz za GRS u sinusima je detekcija gljivičnih elemenata u aspiratu, NP ili tkivu mukoze sinusa (patohistološkim i/ili mikološkim metodama). Sa druge strane, gljive se mogu izolovati iz nazalnog sekreta zdravih ljudi, ali njihovo prisustvo ne predstavlja dijagnostički kriterijum za dijagnozu GRS (DeShazo i sar., 1998). Utvrđivanje značaja prisustva gljiva na sluznici u NP i/ili nazalnom sekretu i formiranje dijagnostičkog protokola za GRS u odnosu na lokalizaciju izolovanih gljiva je od ogromnog značaja za profilaksu i primenu odgovarajuće terapije.

Etiopatogenetski mehanizmi nastanka oboljenja RT koje izazivaju gljive nisu još uvek dovoljno naučno ispitani, dijagnostički kriterijumi nisu jasno definisani a terapija je veliki problem. Ova multidisciplinarna studija o evaluaciji metoda za indukciju sinonazalnog sekreta u cilju detekcije gljiva kod pacijenata sa HRS u fiziološkim i patološkim uslovima je prva u Republici Srbiji i regionu, a deo je projekta OI 175034 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Glavna grupa pacijenata kojom se Projekat bavi su VRP za razvoj IGI, ali imajući u vidu da su sinusi često primarno mesto lokalizacije gljiva kod ovih pacijenata, mogućnost njihovog jednostavnog i pouzdanog dokazivanja je od velikog značaja za prevenciju IGI, njihov razvoj ili letalan ishod.

**Naučni doprinos kandidata i značaj istraživanja** je u uvođenju, primeni i evaluaciji novih, pouzdanih, senzitivnih i reproducibilnih metoda za dokazivanje gljiva u sinusima, kao i formiranje kriterijuma za interpretaciju njihovog nalaza u fiziološkim i patološkim stanjima kod pacijenata sa HRS. Od velikog značaja je i formiranje kliničkih algoritama, laboratorijskih protokola i utvrđivanje faktora rizika za GRS. Time će biti omogućeno dizajniranje novih istraživanja, a pre svega onih koja prate klinički tok GRS i primenu/efikasnost antigljivične terapije, pre svega lokalne.

**Praktični značaj istraživanja** je unapređenje kliničke, radiološke i mikološko/citološke dijagnostike kroz: (i) Razvijanje protokola za ISNS kod pacijenata sa HRS, (ii) razvijanje protokola za uzorkovanje sekreta iz sinusa putem lavaže (ISNS\_L) i aspiracije (ISNS\_A), (iii) razvijanje protokola za obradu ISNS\_A, (iv) razvijanje protokola za obradu NP do jednoćelijske suspenzije, (v) detekcija gljiva iz obrađenih uzoraka, (v) utvrđivanje prevalencije GRS kod HRS i (vi) razvijanje algoritma za interpretaciju nalaza gljiva u fiziološkim (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološkim stanjima

(infekcija/alergija) u korelaciji sa faktorima rizika, kliničkim i sociodemografskim karakteristikama i kvalitetom života pacijenata sa GRS.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Imajući u vidu naučnu osnovu problema i radnu hipotezu, definisan je osnovni cilj istraživanja: **Kod pacijenata sa HRS, dokazati prisustvo gljiva u sinonazalnom sekretu, nakon indukcije, lavaže i aspiracije sekreta i u tkivu NP, nakon FESS-a, i interpretirati značaj njihovog prisustva u fiziološkim i patološkim stanjima.**

Ostali ciljevi istraživanja su:

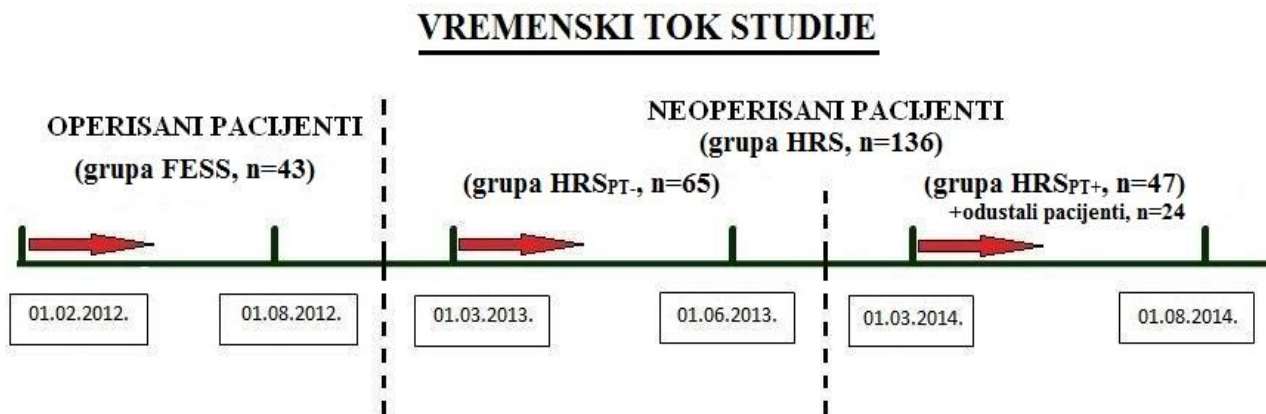
1. Razvijanje protokola za ISNS kod pacijenata sa HRS i detekcija gljiva
2. Razvijanje protokola za uzorkovanje sekreta iz sinusa putem lavaže (ISNS\_L) i aspiracije (ISNS\_A) i dokazivanje gljiva
3. Razvijanje protokola za primenu ultrazvuka (ultrazvučne kadice) u cilju obrade ISNS\_A i detekcija gljiva
4. Razvijanje protokola za obradu NP do jednoćelijske suspenzije i detekciju gljiva
5. Uporediti razvijene metode i ispitati senzitivnosti i specifičnosti u odnosu na "bris metod", kao i u odnosu na klinički dijagnostikovan GRS
6. Utvrđivanje prevalencije GRS kod HRS i određivanje prediktivne vrednosti razvijenih dijagnostičkih metoda
7. Razvijanje algoritma za interpretaciju nalaza gljiva u fiziološkim (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološkim stanjima (infekcija/alergija) u korelaciji sa faktorima rizika, kliničkim i sociodemografskim karakteristikama i kvalitetom života pacijenata sa GRS



### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. Mesto i period održavanja

U periodu od 01.02.2012. do 01.08.2014. urađena je hibridna studija, kombinacija: (i) kliničkog eksperimenta i (ii) studije serije slučajeva. Planirano je da se evaluacija metode ISNS izvrši na svim studijskim pacijentima, međutim zbog opsežnosti procesa NP i indikovanog FESS-a kod određenog broja pacijenata, metodološki su podeljeni u dve grupe. Studija je izvedena na grupi operisanih pacijenata sa HRS (grupa FESS) i grupi neoperisanih pacijenata (grupa HRS) u različitim vremenskim intervalima (slika 5). Grupu FESS su činili pacijenti koji su bili operisani putem FESS-a zbog prisustva NP. Grupu HRS su činili: (i) pacijenti kod kojih nije izvršen pretretman (PT) i toaleta nosnog kavuma pre primenjenih metoda uzorkovanja (grupa  $HRS_{PT-}$ ); (ii) pacijenti kod kojih je izvršen PT i toaleta nosnog kavuma pre primenjenih metoda uzorkovanja (grupa  $HRS_{PT+}$ ) i (iii) pacijenti koji su prošli samo prvu kliničko-epidemiološku fazu studije, bez druge faze koju su činile mikološke i radiološke analize (HRS pacijenti koji su odustali od daljeg ispitivanja). Studija je sprovedena: (i) na Klinici za ORL i MFH KCS; (ii) na Klinici za Alergologiju KCS; (iii) u Centru za radiološku dijagnostiku Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu i (iv) u NRLUM, Instituta za Mikrobiologiju, Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.



Slika 5. Vremenski tok studije i studijske grupe

## 3.2. Selekcija ispitanika

U studiji su učestvovali pacijenti sa HRS, dijagnostikovanim u skladu sa preporukama "EPOS 2012" (Fokkens i sar., 2012).

### 3.2.1. Inkluzioni kriterijumi

Selekcija ispitanika za studijsku grupu je vršena u odnosu na *major* i *minor* inkluzione kriterijume. Za ulazak u studiju potrebno je da pacijenti ispunjavaju *sve major* i najmanje *dva minor* kriterijuma.

*Major inkluzioni kriterijumi:* 1) pacijenti >16 god; 2) tegobe  $\geq 12$  nedelja; 3) pozitivan CT nalaz (zadebljanje mukoze sinusa/hiperatenuacija u sinusima); 4) dugotrajna terapijska upotreba antibiotika/kortikosteroida ( $\geq 12$  nedelja); 5) imunokompetentnost; 6) odsustvo IFI.

*Minor inkluzioni kriterijumi:* 1) bol/pritisak u predelu sinusa/glavobolja; 2) nazalna kongestija; 3) fetor ili smanjen/potpun izostanak mirisa; 4) anamnestički podatak o prisustvu nazalnog sekreta (curenje iz nosa ili slivanje niz zadnji zid ždrele); 5) rinoskopski/endoskopski nalaz (nalaz NP, inflamacija/hipertrofija sluzokože, prisustvo mucina).

### 3.2.2. Ekskluzioni kriterijumi

Pacijenti koji su imali sledeće ekskluzione kriterijume su isključeni iz studije:

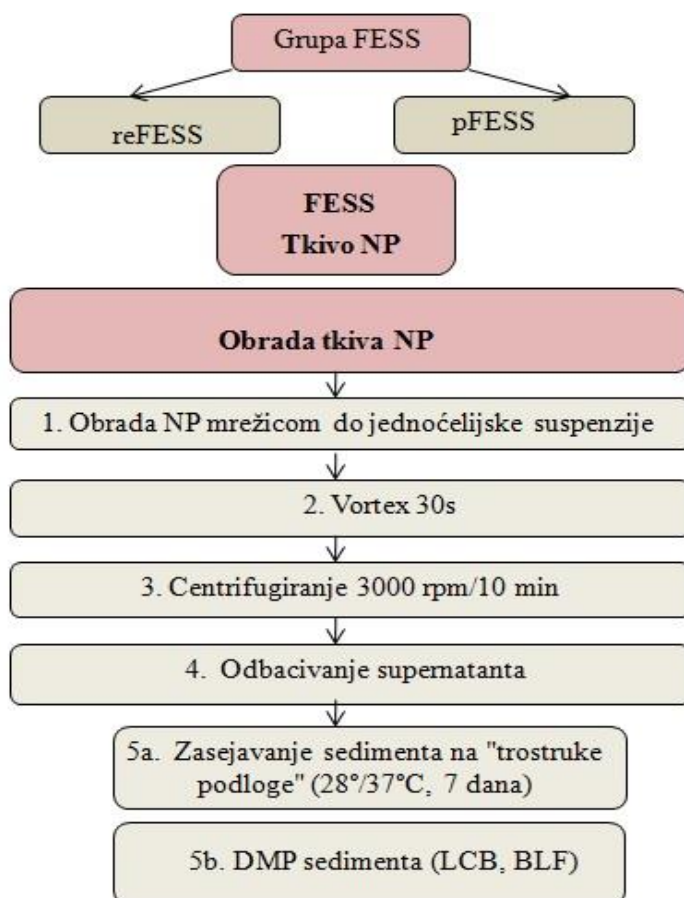
1) pacijenti <16 god; 2) terapija topikalnim ili sistemskim AM i/ili kortikosteroidima u prethodne 4 nedelje; 3) diabetes mellitus; 4) imunodeficientna stanja.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije (5030/5) i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (29/VI-3). Svi pacijenti su potpisali formular informisanog pristanka za učestvovanje u studiji (prilog 1).

### 3.2.3. Operisani pacijenti (grupa FESS)

U periodu od 01.02. do 01.08.2012. urađena je studija u cilju evaluacije novo-formiranog dijagnostičkog protokola za dobijanje jednoćelijske suspenzije od tkiva NP (Barać i sar., 2015). U studiju su uključena 43 konsektivna pacijenta sa HRS+NP operisana putem FESS-a na Klinici za Otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju (ORL i MFH) Kliničkog Centra Srbije (KCS) (grupa FESS). Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta KCS i Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu (Br. 5030/5).

Dizajn studije: (i) prikupljanje demografsko-epidemioloških podataka o pacijentima; (ii) anamnestički podaci o broju prethodnih FESS-ova, trajanju HRS, dužini korišćenja kortikosteroida i antibiotika, komorbiditeti (astma, aspirin intolerancija/AI, hipersenzitivnost na inhalatorne alergene) i (iii) prospektivno uzorkovanje NP tokom FESS-a za mikološku analizu. Pacijenti su podeljeni u dve grupe u zavisnosti od broja prethodnih FESS-ova. Pacijenti sa jednim ili više prethodnih operacija sinusa su pripadali grupi reFESS, dok su pacijenti bez prethodnih operacija pripadali grupi pFESS. Na osnovu rezultata mikološke analize pacijenti su podeljeni na grupu reFESS<sub>F+</sub> i grupu reFESS<sub>F-</sub> (shema 1).



Shema 1. Dizajn studije (grupa FESS)

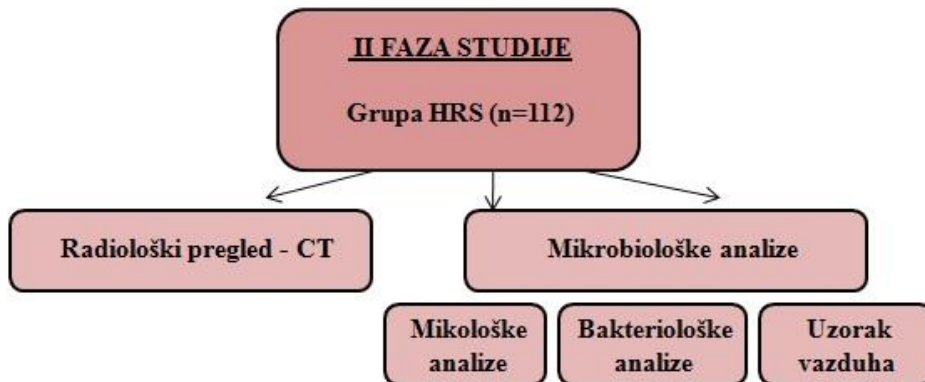
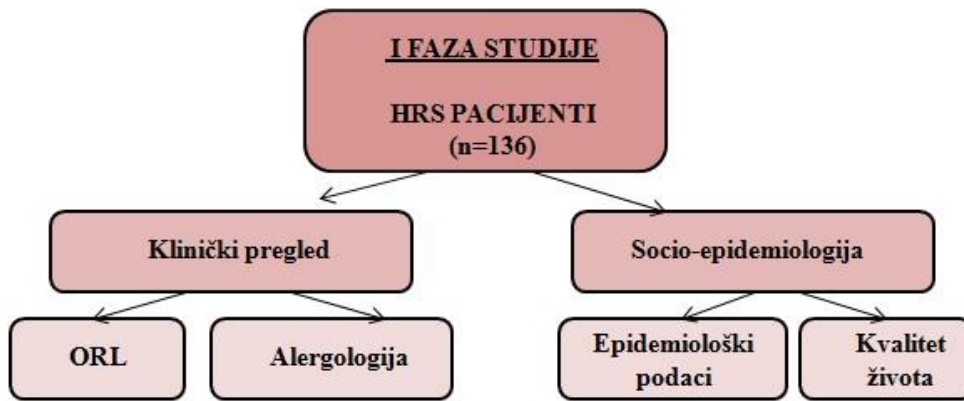
### **3.2.4. Neoperisani pacijenti (grupa HRS)**

#### **3.2.4.1. Grupa HRS<sub>PT-</sub>**

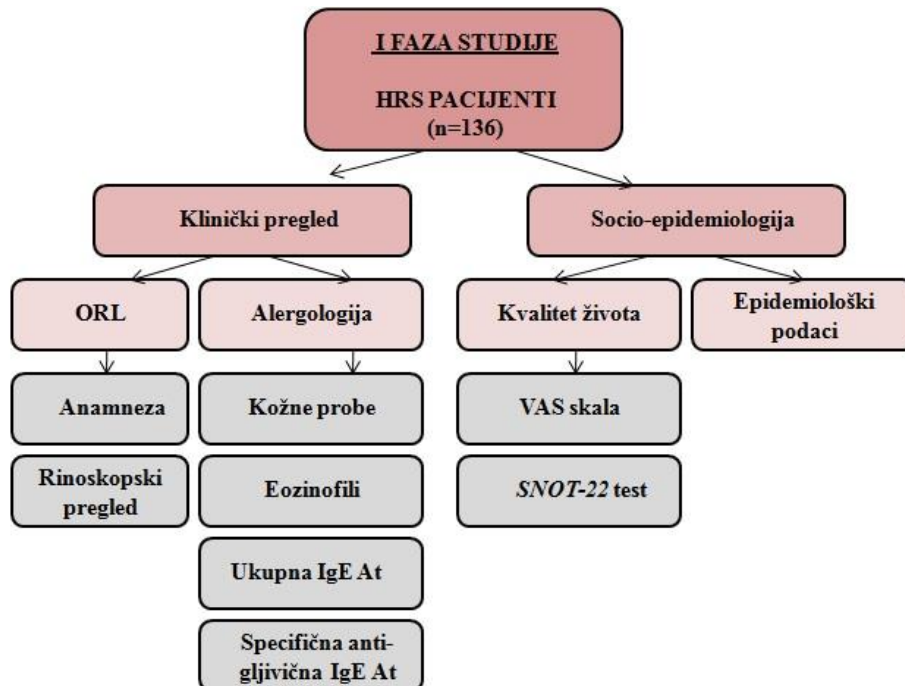
U periodu od 01.03. do 01.06.2013. godine urađena je studija serije slučajeva u koju je uključeno 65 konsektivnih pacijenata sa potvrđenom dijagnozom HRS, **grupa HRS<sub>PT-</sub>**, od ukupno 470 pacijenata koji su u navedenom periodu ambulantno lečena na Klinici za alergologiju i imunologiju KCS. Svih 65 pacijenata su prošli (i) kliničko-epidemiološku i (ii) mikološko-radiološku fazu studije bez primene pretretmana (PT) (sheme 2- 6).

#### **3.2.4.2. Grupa HRS<sub>PT+</sub>**

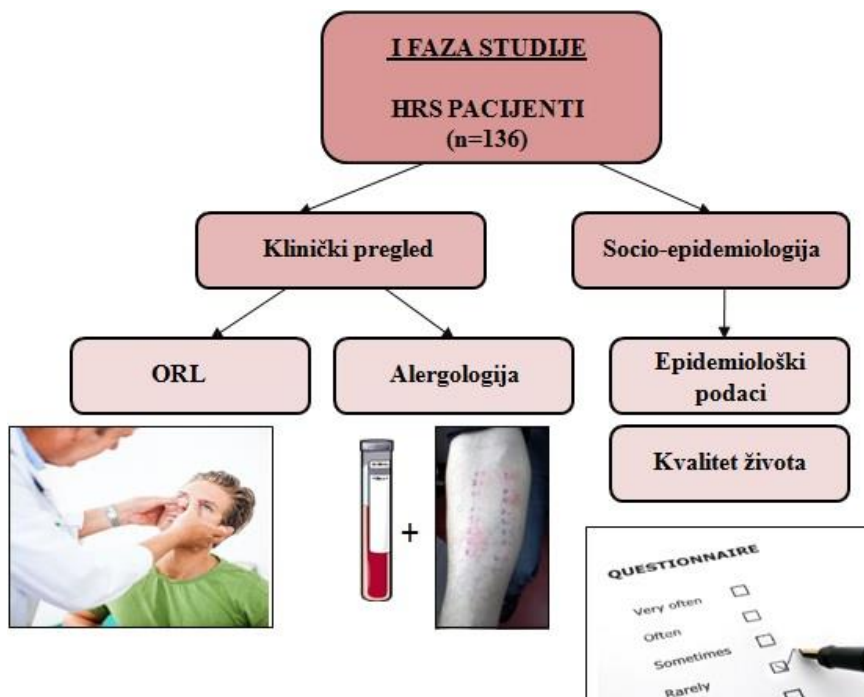
U periodu od 01.03. do 01.08.2014. godine urađena je studija serije slučajeva u koju je uključen 71 konsektivni pacijent sa potvrđenom dijagnozom HRS od ukupno 515 pacijenata koji su u navedenom periodu ambulantno lečeni na Klinici za alergologiju i imunologiju KCS. Od ukupno 71 pacijenta 47 je prošlo obe faze studije: (i) kliničko-epidemiološku i (ii) mikološko-radiološku fazu studije sa primenom PT (**grupa HRS<sub>PT+</sub>**). Ostala 24 pacijenta su prošla samo prvu kliničko-epidemiološku fazu studije (sheme 2-6).



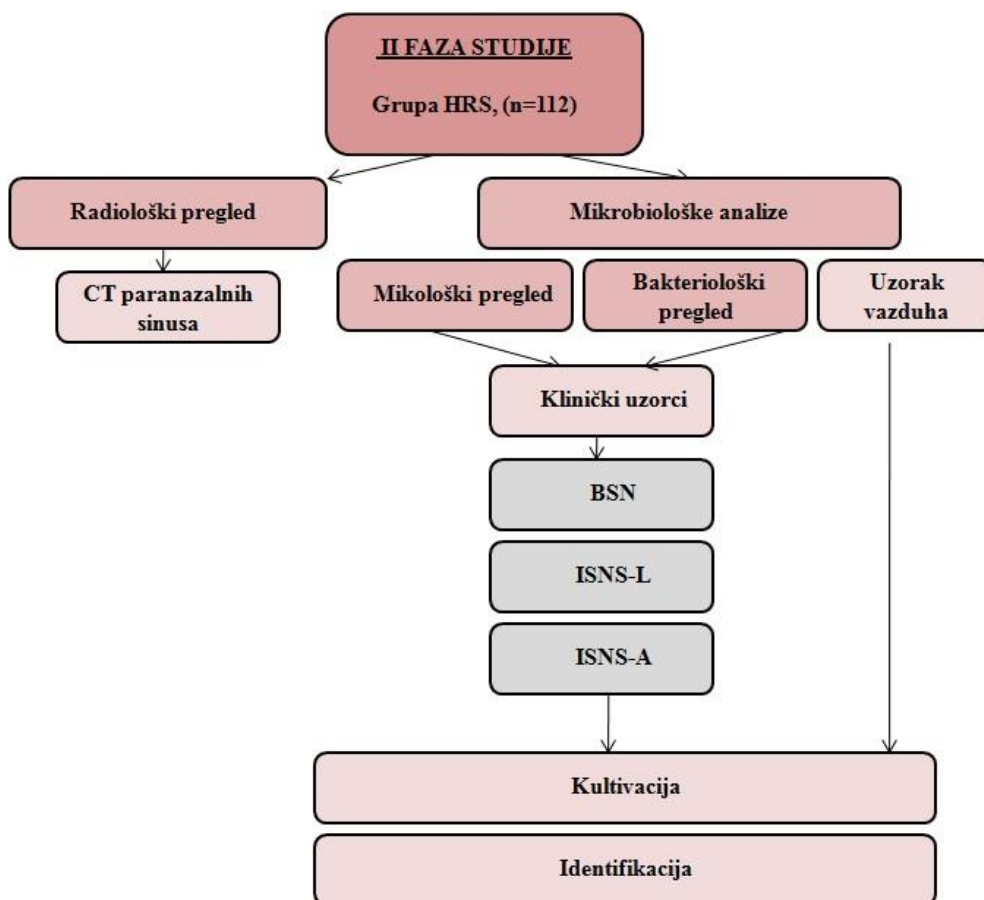
Shema 2. Dizajn studije (HRS pacijenti)



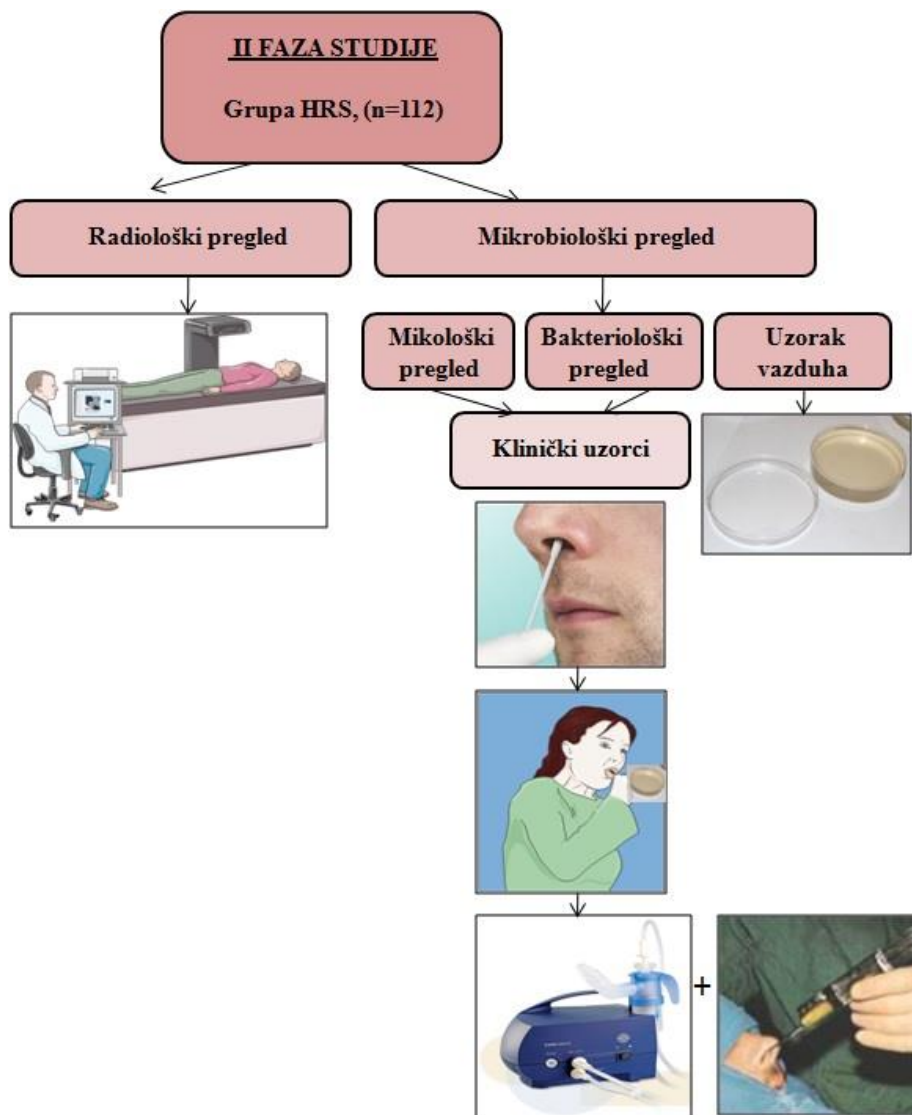
Shema 3. Dizajn I faze studije (HRS pacijenti)



Shema 4. Grafički prikaz dizajna I faze studije (HRS pacijenti)



Shema 5. Dizajn II faze studije (grupa HRS)



Shema 6. Grafički prikaz dizajna II faze studije (grupa HRS)

### 3.3. Metodologija studije

Grupa FESS je prošla kroz dve faze studije:

#### 1) kliničko-epidemiološka

Anamnestički su prikupljeni podaci o komorbiditetima, trajanju bolesti, terapiji i sociodemografiji pacijenata.

#### 2) hirurško-mikološka faza



Izvršena je operacija paranazalnih sinusa zahvaćenih polipozom putem FESS-a, ekstrakcija tkiva NP, mikološka obrada NP i analiza jednoćelijske suspenzije NP.

**Grupa HRS** je prošla kroz dve faze studije:

### **1) kliničko-epidemiološka**

Pacijenti su popunjavali kliničko-epidemiološke upitnike (prilog 2-8): (i) vizuelno analognu skalu (VAS); (ii) „*Sinonasal Outcome Test*“ (SNOT-22); (iii) opšti sociodemografski upitnik i urađen je (iv) alergološko-laboratorijski i (v) rinološki pregled.

### **2) radiološko-mikološka faza**

Pacijentima je urađeno CT snimanje paranazalnih sinusa i uzorkovanje, mikološka obrada i analiza ISNS\_L i ISNS\_A i BSN. Grupi **HRS<sub>PT-</sub>** i **HRS<sub>PT+</sub>** su primenjivane iste metode uzorkovanja, ali pod izmenjenim uslovima – grupi **HRS<sub>PT-</sub>** nije rađen PT i toaleta nosnog kavuma pre uzorkovanja, dok je grupi **HRS<sub>PT+</sub>** rađen PT. Uzorkovanje kliničkog materijala iz sinusa je urađeno: (i) BSN (standardna metoda) i primenom novo-ispitivanih metoda za ISNS (ii) lavaža/ISNS\_L i (iii) aspiracija/ISNS\_A. Klinički materijali iz sinusa su obrađeni modifikovanim protokolom za obradu ISNS\_A i ispitani na prisustvo gljiva i bakterija standardnim mikrobiološkim metodama (kultivacija).

**Grupa HRS<sub>PT-</sub>**: Pacijenti sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS\_A su činili **HRS<sub>F+/PT-</sub>** grupu, a pacijenti sa negativnim nalazom gljiva **HRS<sub>F-/PT-</sub>** grupu.

**Grupa HRS<sub>PT+</sub>**: Pacijenti sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS\_L i/ili ISNS\_A su činili **HRS<sub>F+/PT+</sub>**, a pacijenti sa negativnim nalazom gljiva **HRS<sub>F-/PT+</sub>** grupu.

**Cilj:** Razvijanje pouzdanih, reproducibilnih i bezbednih metoda za uzorkovanje i obradu ISNS ispitivanjem Sn i Sp metode za uzorkovanje ISNS.

U cilju formiranja dijagnostičkog protokola za GRS izvršena je korelacije laboratorijskog nalaza jednoćelijske suspenzije NP, BSN, ISNS\_A, ISNS\_L i ISNS\_komb (istovremena primena ISNS\_A i ISNS\_L) sa kliničkim i epidemiološkim podacima, kako bi se definisali klinički dijagnostički kriterijumi za GRS. Na osnovu nalaza gljiva u ISNS definisani su kriterijumi koji predstavljaju: (i) fiziološki nalaz (mikrobiom sinusa) ili (ii) patološki nalaz (infekcija/alergija).

### 3.3.1. Uzorak vazduha

U cilju kvantitativne i kvalitativne analize „indoor“ gljiva koje su prisutne u životnom/radnom prostoru pacijenata vršena je izolacija gljiva iz životnog prostora pacijenata sa HRS.

## 3.4. Podloge, reagensi i aparatura

### 3.4.1. „Trostruki“ set podloga za uzorkovanje i izolaciju gljiva i bakterija

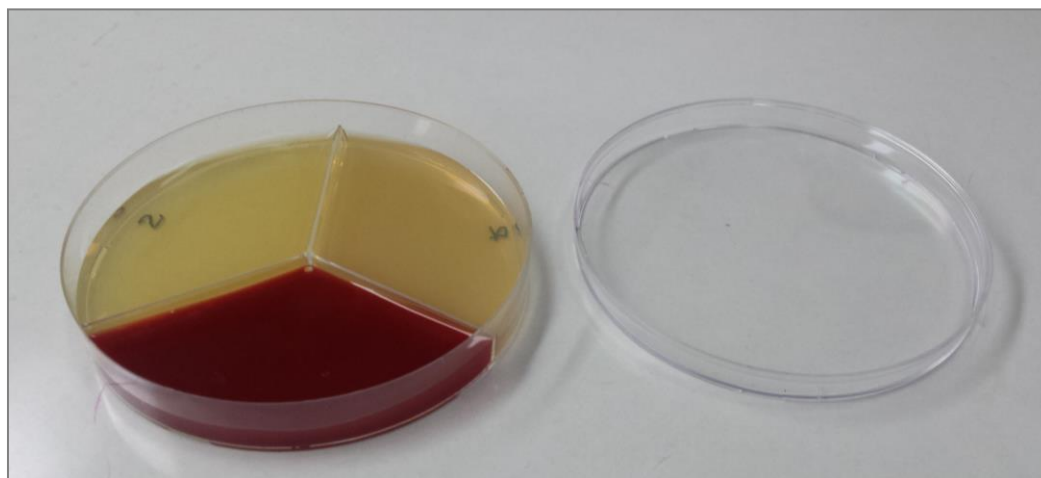
Korišćene su hranljive podloge, koje se sastoje od: (i) Sabouraud dekstroznog agra/SDA (Himedia, Indija), (ii) krompirovog dekstroznog agra (Potato dextrose agar/PDA, Biolab, Mađarska) i (iii) krvno-goveđeg agra/KA (Torlak, Srbija).

**SDA** je modifikovani agar sa dodatkom dekstroze koji je prvi opisao Sabouraud (Sabouraud i sar., 1892). SDA se koristi za rast komensalnih i patogenih plesni i kvasnica. Visoka koncentracija dekstroze i kiseli pH u sastavu SDA doprinose rastu gljiva (Jarett i sar., 1980). SDA je mikrobiološka podloga u obliku praha; za 1L podloge potrebno je 30 g praha u 1L destilovane vode. Ohlađena podloga (55°C) se razliva u jednu trećinu trostruke petri šolje (SIGMA Aldrich, SAD) u debljini od minimalno 5 mm.

**PDA** je modifikovani agar sa dodatkom dekstroze i krompirovog ekstrakta koji doprinose rastu gljiva. Koristi se za izolaciju komensalnih i patogenih plesni, jer stimuliše sporulaciju koja olakšava mikroskopsku i makroskopsku identifikaciju plesni. PDA je mikrobiološka podloga u obliku praha; za 1L podloge potrebno je 39 g praha u 1L destilovane vode. Ohlađena podloga (55°C) se razliva u jednu trećinu trostruke petri šolje u debljini od minimalno 5 mm.

**KA** je modifikovani agar sa dodatkom goveđe krvi. Koristi se za izolaciju bakterija. KA je mikrobiološka podloga u obliku praha; za 1L podloge potrebno je 43 g praha u 1L destilovane vode. Sterilisanj i ohlađenoj podlozi (40°C) dodaje se pod aseptičnim uslovima 5-7% sterilne defibrinisane krvi, dobro promeša i razlije u jednu trećinu trostruke petri šolje u debljini od minimalno 5 mm (slika 6).

Dizajniran je „trostruki“ set za uzorkovanje i izolaciju gljiva i bakterija, u sastavu od SDA, PDA i KA na po 1/3 trostruke petri ploče.



**Slika 6.** „Trostruki“ set za uzorkovanje i izolaciju gljiva i bakterija

### **3.5. Rastvori za indukciju sinonazalnog sekreta**

#### **35.1. Hipertonični fiziološki rastvor**

Hipertonični fiziološki rastvor (7% NaCl) je mukolitičko sredstvo. Smanjuje viskoznost nepurulentnog i purulentnog mukusa. Hipertonični NaCl povećava aktivnost cilija gornjih partija disajnih puteva, brzinu kretanja mukusa u bronhijama i olakšava izbacivanje sadržaja iz sinusa. Priprema se rastvaranjem 7g NaCl u 100 ml sterilne destilovane vode (Apoteka „Zvezdara, KBC Zvezdara, Beograd, Srbija).

#### **3.5.2. Sputasol**

Sputasol (ditiotreitrol 1.4%) je snažan mukolitik koji sadrži sulfhidrilne grupe (SH) u sastavu ditiotreitola i koristi se za obradu viskoznog mucina dobijenog aspiracijom iz sinusa pacijenata (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK).

## 3.6. Aparatura za uzorkovanje i obradu uzoraka ISNS

### 3.6.1. Ultrazvučna kada

Ultrazvučna (UZ) kada (Easy Clean, Velika Britanija) radi po principu ultrazvučne kavitacije u tečnosti. Snaga proizvedena sonifikatorom, generiše u tečnosti brojne mikrobalone koji ubrzavaju emulgaciju i rastvaranje. UZ kada je korišćena u procesu obrade uzoraka ISNS, a u cilju ekstrakcije gljiva iz tkiva i mucina i njihove lakše izolacije (Vollmer i sar., 2008). Kristal turmalina koji se nalazi u sastavu UZ kade fizički deformiše strukturu tkiva/biološkog materijala pod dejstvom električne energije, usled oscilacije na datoj frekvenciji.

### 3.6.2. Mukus ekstraktor

Mukus ekstraktor (Ultramed, Egipat) služi za sterilnu kolekciju aspiriranog sadržaja iz sinusa radi mikrobiološke dijagnostike. Sastoji se od sterilne zatvorene posude kapaciteta 25 ml i dve mekane PVC cevi dužine 40 cm i debljine 10FG locirane na suprotnim krajevima posude. Jedna cev sadrži nastavak kojim se priključuje za aspirator, a druga cev bez nastavka služi za uzorkovanje ISNS (slika 7). Pacijent je u ležećem položaju sa glavom nagnutom unazad za 30 stepeni. Cev se manuelno uvodi pod uglom od 90 stepeni kroz nozdrvu u sinuse (Sharma R. i sar., 2008).



**Slika 7. Mukus ekstraktor** (preuzeto sa <http://surgwide.kbo.co.ke>)

### 3.6.3. PARI-SINUS inhalator

PARI-SINUS inhalator (PARI GmbH, Nemačka) je specijalno dizajniran inhalator za inhalaciju sinusa, sa snažnim raspršivačem koji vrši snažnu disperziju tečnosti do mikrometarske veličine od 1 do 5  $\mu\text{m}$  i plasira je u unutrašnjost sinusa (Dalby R., 2011) (slika 8). Pumpica se stavlja direktno u nozdrvu, tečnost se sipa u posudu koja je sastavni deo pumpice i raspršivanje leka započinje uključivanjem aparata u struju. Inhalacija kroz svaku nozdrvu pojedinačno traje 5 minuta i vrši se sa 5 ml hipertoničnog fiziološkog rastvora (7% NaCl). Tokom rada se poštuju sva pravila asepse i rada u laboratoriji, kako se pumpica ne bi kontaminirala. Pacijent je u ležećem položaju sa glavom nagnutom unazad za 30 stepeni. Svakom pacijentu se za svaku nozdrvu plasira prethodno sterilisana pumpica. Nakon uključivanja prekidača pokreće se raspršivanje kapljica kroz pumpicu.



**Slika 8. PARI-sinus inhalator** (preuzeto sa <http://www.inel.co.rs/sr/proizvodi/>)

### 3.6.4. Aspirator

Za aspiraciju sinusa korišćen je portabilni aspirator (Miniaspeed Portable Aspirator Plus, SAD) sukzione snage 18 l/min. Na cev aspiratora je postavljan mukus ekstraktor u kojem se vršila kolekcija sadržaja.

### 3.7. Laboratorijske dijagnostičke procedure

#### 3.7.1. Kožne probe (Skin prick test/SPT)

SPT na inhalacione alergene je korišćen u svrhu dijagnostike hipersenzitivnosti na inhalacione alergene. Korišćen je set sa 15 inhalacionih alergena u bočicama od 2 ml, pozitivnom probom (histamin) i negativnom probom (fiziološki rastvor) (Alk-Abello, Danska). Kod svih ispitanika kožna preosetljivost je testirana metodom uboda ("prick"). Vrste alergena i njihove koncentracije prikazane su u tabeli 11. Na pacijentovoj podlaktici se hemijskom olovkom obeleže brojevi od 1 do 15 u dve kolone kao i "+" za pozitivnu kontrolu i "-" negativnu kontrolu. Na svako obeleženo mesto se stavi po jedna kap rastvorenih alergena. Kroz svaku kap se lancetom napravi blagi površni ubod, a zatim se kap ukloni papirnum ubrusom sa kože. Nakon 15-20 minuta vrši se očitavanje rezultata SPT. Postojanje preosetljivosti na inhalatorne alergene procenjavano je na osnovu veličine papule i eritema u mm (slika 9). Kao pozitivan rezultat uzimana je vrednost kožne reakcije koja je bar za 3 mm veća od negativne kontrole.



Slika 9. Kožne probe

**Tabela 11. Alergeni korišćeni za kožne probe**

Vrsta alergena	Naziv alergena	Koncentracija
Grinje	<i>Dermatophagoides farinae</i>	30 HEP
	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	30 HEP
Polen	<i>Betula verucosa</i>	30 HEP
	<i>Olea europea</i>	30 HEP
	<i>Cupressus arizonica</i>	30 HEP
	<i>Phleum pratense</i>	30 HEP
	<i>Ambrosia artemisia</i>	1:100 w/V
	<i>Artemisia vulgaris</i>	10 HEP
Plesni	<i>Alternaria alternata</i>	30 HEP
	<i>Penicillium notatum</i>	1:20 w/V
	<i>Cladosporium herbarum</i>	1:20 w/V
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1:20 w/V
Dlaka	<i>Horse epithelia</i>	10 HEP
	<i>Cat epithelia</i>	10 HEP
	<i>Dog epithelia</i>	10 HEP
Probe +/-	Histamin (pozitivna proba)	10 mg/ml
	Fiziološki rastvor (negativna proba)	2 ml

Skraćenice: HEP, *Histamine equivalent prick*

### 3.7.2. Ukupna IgE At u serumu

**Koncentracija ukupnih IgE At u serumu** je merena ELISA metodom (Euroimmun AG, Nemačka) iz uzoraka seruma pacijenata. Procedura za izvođenje ELISA testa je data u prilogu (prilog 9). Rezultati su tumačeni kao: (i) negativan (<100 IU/ml), (ii) nisko pozitivan (100-500 IU/ml); (iii) pozitivan (500-1000 IU/ml) i (iv) visoko pozitivan (>1000 IU/ml).

### 3.7.3. Specifična anti-gljivična IgE At

**Koncentracija specifičnih anti-gljivičnih IgE At** za smešu gljivičnih alergena (*A. fumigatus*, *C. herbarum*, *A. alternata* i *P. notatum*) iz uzoraka seruma pacijenata je određivana RIDA Allergy screen testom (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) po uputstvu proizvođača. Klasifikaciona skala za specifična anti-gljivična IgE At je bila:

- klasa 0 (< 0.35 IU/ml)
- klasa 1 (0.35–0.7 IU/ml)

- klasa 2 (0.7–3.5 IU/ml)
- klasa 3 (3.5–17.5 IU/ml)
- klasa 4 (17.5–50 IU/ml)
- klasa 5 (50–100 IU/ml)
- klasa 6 (100 IU/ml)

Rezultat je tumačen kao: (i) negativan (<0.35 IU/ml; klasa 0); (ii) umereno značajno (0.35 – 3.5 IU/ml; klasa od 1 do 2) i (iii) visokoznačajno (>3.5 IU/ml; klasa od 3 do 6).

### **3.7.3. Eozinofili (Eo) u perifernoj krvi**

**Određivanje broja eozinofila u perifernoj krvi** je vršeno bojenjem krvi sa 10% eozinom i brojanjem u komori. Merena je količina eozinofila u komori u  $\text{mm}^3$ , i klasifikovana kao: (i) normalna (0-349  $\text{mm}^3$ ); (ii) visoka (>350  $\text{mm}^3$ ) i (iii) jako visoka (>500  $\text{mm}^3$ ).

## **3.8. Kliničke dijagnostičke procedure**

### **3.8.1. Rinoskopski pregled**

Pacijenti su pregledani od strane specijaliste otorinolaringologije. Svi pacijenti su ambulantno pregledani putem prednje rinoskopije pomoću spekuluma. Beleženo je prisustvo sledećih parametara: (i) edem, (ii) inflamacija/edem/kruste, (iii) pre/post nazalni drip i (iv) prisustvo NP.

### **3.8.2. Kompjuterizovana tomografija (CT)**

Pacijentima je urađen CT glave i paranazalnih šupljina i analiziran od strane specijaliste radiologije. Vizuelizovani su frontalni, maksilarni, sfenoidni i etmoidni sinusi (slika 10). CT daje podatke o strukturi tkiva, hipo-, izo- ili hiperdenzitivnosti, o obliku i veličini sinusa. Beležen je: (i) denzitet sadržaja u sinusima izražen u HU, (ii) ispunjenost sinusa izražena u procentima i (iii) zadebljanje mukoze sinusa (Lund i sar., 1993).





Slika 10. CT paranazalnih sinusa pacijenta sa HRS+NP

### 3.9. Dizajn metoda uzorkovanja

Pacijentima su urađene mikrobiološke analize iz kliničkog materijala uzorkovanog na 4 načina:

- **Grupa FESS**

1. FESS

- **Grupa HRS**

2. BSN

3. ISNS\_L, primenom hipertonicnog fiziološkog rastvora i direktnim izbacivanjem sadržaja na hranljive podloge

4. ISNS\_A, inhalacijom hipertonicnog fiziološkog rastvora i aspiracijom (tabela 12).

**Tabela 12. Pretretman (PT), uzorkovanje i obrada kliničkog materijala iz sinusa u cilju dokazivanja gljiva**

Vrsta kliničkog uzorka	Sekret		Citologija	
	ISNS_A	ISNS_L	Tkivo polipa	Bris mukoze
<b>Pretretman</b>	Toaleta nosa; Indukcija SNS mukolitikom (7% NaCl)	Toaleta nosa; Indukcija SNS mukolitikom (7% NaCl)	*NP	*NP
<b>Metoda uzorkovanja</b>	Vakum aspiracija ISNS iz maksilarnih sinusa	Lavaža ISNS direktno na hranljive podloge	Intraoperativno (FESS)	BSN
<b>Vrsta uzorka</b>	SNS Mucin	Lavat/Fliggeove kapi	Tkivo polipa	Sadržaj sa mukoze nosa
<b>Količina uzorka</b>	1-2ml	*NP	1-2 cm <sup>3</sup>	*NP
<b>Obrada uzorka</b>	1. Ekstrakcija gljiva hemijskim metodama (mukolitik:ISNS=1:1) 2. Homogenizacija (Vortex) 3. Ekstrakcija gljiva fizičkim metodama (ultrazvučna kada) 4. Koncentrovanje (centrifugiranje)	*NP	1. Pravljenje jednoćelijske suspenzije pomoću mrežice 2. Homogenizacija (Vortex) 3. Koncentrovanje (centrifugiranje)	*NP
<b>Kultivisanje/vrsta podloga</b>	"Trostruki" set podloga	KA SDA	"Trostruki" set podloga	"Trostruki" set podloga
<b>Mogućnost kontaminacije</b>	Minimalna, direktna kolekcija sadržaja u sterilnu posudu	Minimalizovana 2x ponovljenim uzorkovanjem u razmaku od 7 dana	Minimalna, uzorkovanje pod aseptičnim uslovima u hirurškoj sali	Visoka

\*NP, nije primenjeno.

### 3.9.1. FESS

Ukoliko je rinoskopski nalaz ukazao na opsežnu nazalnu polipozu i ukoliko je indikovana operacija, pacijentima je rađen FESS. FESS se radi u opštoj endotrahealnoj anesteziji, u ležećem položaju pacijenta, uvođenjem optičkog instrumenta u kavum nosa - endoskopa, pod

uglom od 0 ili 30°, pomoću kog se jasno vide paranazalne šupljine pod uveličanjem. Strukturu endoskopa čini niz cilindričnih sočiva ugrađenih u dvostruku metalnu košuljicu kroz koju prolaze optička vlakna za intenzivno osvetljenje sa vidnim poljem širine od 90° u svim pravcima i mogućim uvećanjem slike. Korišćeni su tanki osvetljeni endoskopi prečnika od 2,7 do 4 mm čiji vrhovi omogućavaju gledanje pod različitim uglovima (0 ili 30°) i sadrže hladna sečiva za uklanjanje NP i obolele mukoze. Endoskop se pažljivo stavlja u nos i prilikom svakog prolaska kroz nosne hodnike. FESS-om su ekstrahovani NP iz zahvaćenih sinusa i pod sterilnim uslovima odstranjeni u sterilnu posudu. Najkasnije 2h nakon operacije, operativni materijal je dostavljan u NRLUM, Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### 3.9.2. Bris sluznice nosa (BSN)

Bris (Copan diagnostics, SAD) je uziman posebno za levu i posebno za desnu nozdrvu. Bris je plasiran do oko 2 cm u nozdrvu i uzorak je uzet rotirajući brisom po nazalnoj sluznici (slika 11). Transport u NRLUM, Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu je izvršen u roku od 2 sata na sobnoj temperaturi.



**Slika 11. Uzorkovanje brisa sa sluzokože nosa i mikrobiološko ispitivanje**

### 3.9.3. Lavaža indukovanog sinonazalnog sekreta (ISNS\_L)

Pre ISNS\_L pacijentima su brisom detaljno obrisani nosni kavumi kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije i povećala verovatnoća uzorkovanja sadržaja direktno iz sinusa. Pacijenti su zatim raspršivali hipertonični rastvor NaCl putem sterilisanog raspršivača u svaku nozdrvu po 3 puta. Nakon raspršivanja spreja u svaku nozdrvu, pacijenti su bili zamoljeni da snažnim izduvavanjem kroz nos izbace sadržaj direktno na KA i SDA, posebno za svaku nozdrvu (slika 12). ISNS\_L je rađena dva puta, u razmaku od 7 dana, a pozitivnim nalazom je smatran 2 puta ponovljen nalaz istog izolata.



Slika 12. Protokol uzorkovanja ISNS\_L

### 3.9.4. Aspiracija indukovanog sinonazalnog sekreta (ISNS\_A)

Svaki ispitanik je inhaliran sa 5 ml hipertoničnog rastvora NaCl putem PARI-SINUS inhalatora tokom 10 minuta u kvadripedalnom položaju (slika 13). Kvadripedalni položaj olakšava drenažu sadržaja iz paranazalnih sinusa (Ford i sar., 2011). Nakon inhalacije svake nozdrve pojedinačno, mucin iz sinusa je uziman putem aspiracije u ležećem položaju sa glavom zabačenom u nazad pod uglom od 30°. ISNS\_A je sterilno uzorkovan pomoću mukus ekstraktora. Mukus ekstraktor se jednim krajem nadovezuje na aparat za aspiraciju, dok se drugi kraj plasira, pod pravim uglom kroz nosne hodnike do sinusa. Tokom aspiracije sadržaj iz sinusa se pokretanjem papučice na aspiratoru uvlači kroz mukus ekstraktor i zadržava u

sterilnoj posudi koja je njen sastavni deo (slika 13). Aspiracija se vrši posebno za leve i posebno za desne paranazalne sinuse.

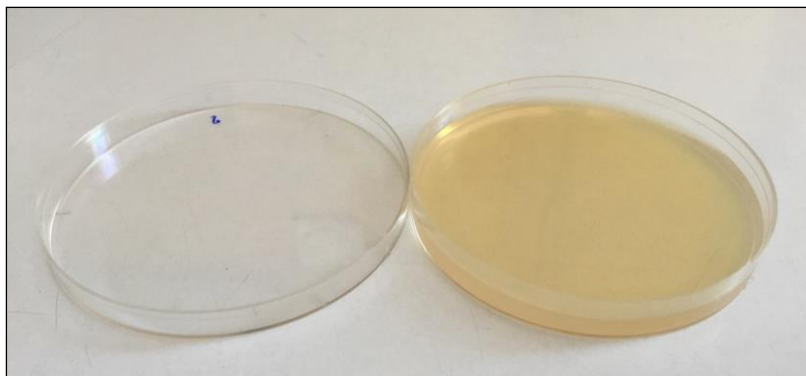
Aspiracija sadržaja iz sinusa je pravilna ukoliko je količina aspiriranog sadržaja 1 ml ili više.



**Slika 13. Protokol uzorkovanja ISNS\_A**

### **3.9.5. Uzorkovanje vazduha iz životnog/radnog prostora pacijenata**

Pacijenti su zamoljeni da ostave otvorenu jednu petri šolju sa PDA tokom 1 h na sobnoj temperaturi u prostoriju u kojoj borave, i jednu petri šolju sa PDA u prostoriji u kojoj rade (slika 14). Zatvorene petri šolje i pričvršćene parafilmom (Sigma-Aldrich, SAD) su dostavljane u NRLUM radi dalje analize. PDA podloge koje sadrže uzorke vazduha su postavljene u inkubator na 28°C, a rezultati su evidentirani nakon 7 dana.



**Slika 14. Uzorkovanje vazduha**

### 3.10. Uzorci

U odnosu na grupe pacijenata, korišćeni su sledeći uzorci:

**1. Grupa FESS:** (i) obrađeno tkivo NP (JĆS)

**2. Grupa HRS:**

**HRS<sub>PT-</sub>:** (i) ISNS\_A; (ii) ISNS\_L i (iii) BSN bez PT

**HRS<sub>PT+</sub>:** (i) ISNS\_A; (ii) ISNS\_L i (iii) BSN sa PT

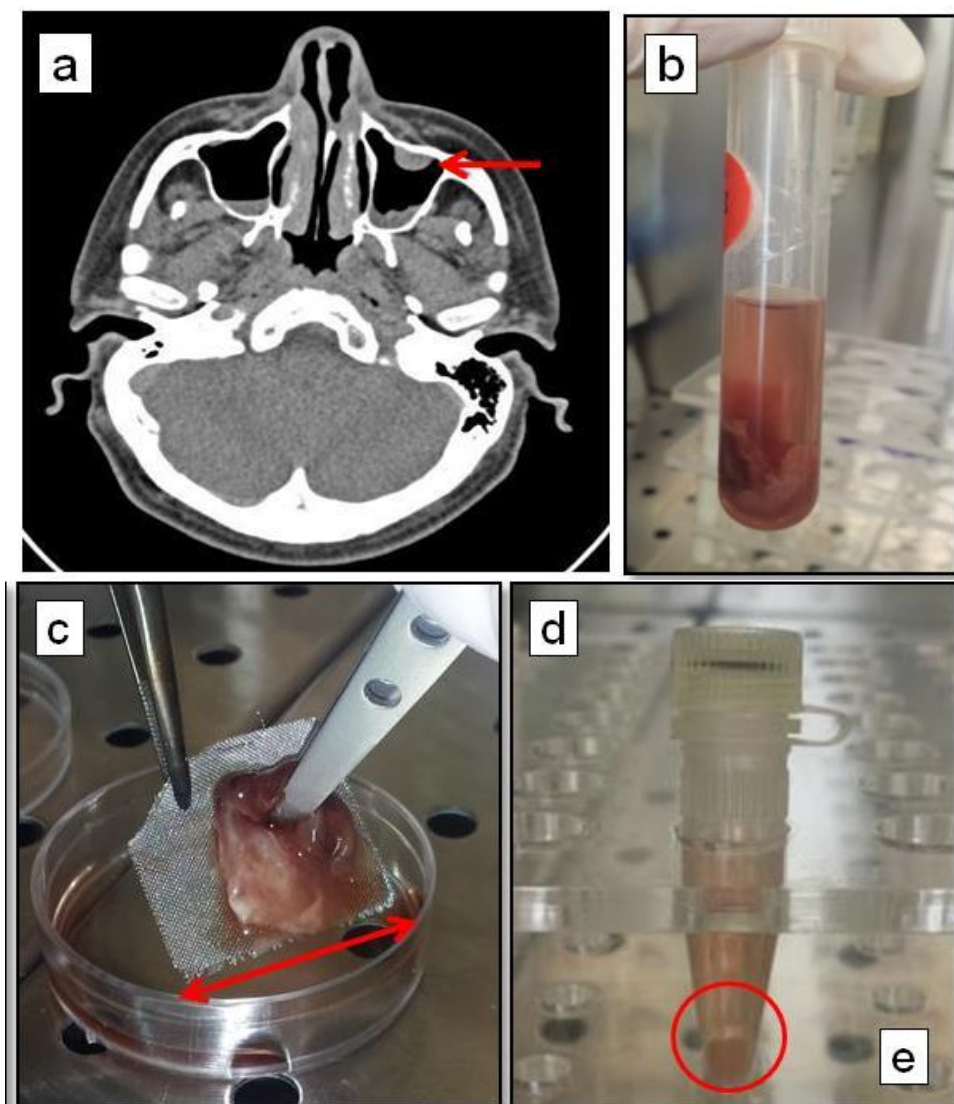
#### 3.10.1. Obrada uzoraka

##### 3.10.1.1. Obrada tkiva NP do jednoćelijske suspenzije

Tkivo NP je obrađivano po novo-formiranom protokolu za dobijanje jednoćelijske suspenzije (slika 15). Nakon obrade tkiva NP do jednoćelijske suspenzije zasejano je 50 µl na svaki od tri dela trostruke hranljive podloge, u duplikatu, radi inkubacije na 28 °C i 37°C. Obeležene podloge su postavljene u inkubator na 28 °C i 37°C, a rezultati su evidentirani nakon 24h za bakterije i nakon 7 dana za plesni.

**Algoritam za obradu tkiva NP do jednoćelijske suspenzije (slika 15):**

- a) Detekcija NP na CT snimku
- b) Uklanjanje NP pod aseptičnim uslovima putem FESS-a i transportovanje u laboratoriju u sterilnoj plastičnoj posudi
- c) Priprema jednoćelijske suspenzije u petri šolji pomoću mrežice za obradu tkiva, snažnim pritiskom NP tkiva na mrežicu i pomeranjem u levu i desnu stranu
- d) Smeša jednoćelijske suspenzije i ekvivalentne količine 1.4% ditiotreitola. Homogenizacija sadržaja vorteksovanjem 30s i taloženje sedimenta na sobnoj temperaturi 15 minuta
- e) Centrifugiranje JĆS na 3000 rpm tokom 10 minuta; odbacivanje supernatanta; korišćenje sedimenta za mikološku kultivaciju i direktni mikroskopski pregled



\* Publikovano Barać i sar., 2015

**Slika 15. Algoritam za obradu NP**

### 3.10.1.2. Obrada brisa sluznice nosa (BSN)

U komori za sterilan rad, bris je nanet pojedinačno na svaki od tri dela trostruke podloge u jednom potezu u naizmeničnom pravcu. BSN je zasejan u duplikatu, radi inkubacije na 28 °C i 37°C.

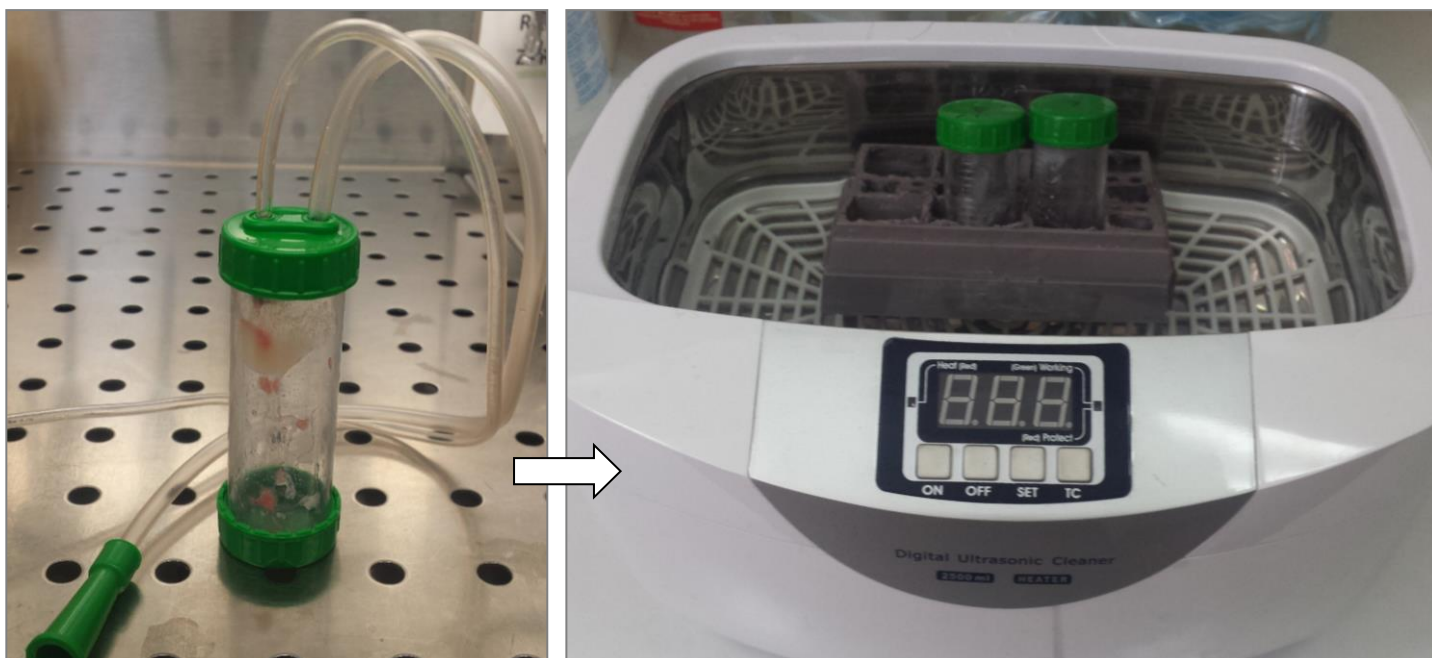
### 3.10.1.3. Obrada ISNS\_L

Nakon uzorkovanja ISNS\_L, SDA podloga koja sadrži ISNS\_L je postavljena u inkubator na 28°C, a KA podloga koja sadrži ISNS\_L je postavljena u inkubator na 37°C.

### 3.10.1.4. Obrada ISNS\_A

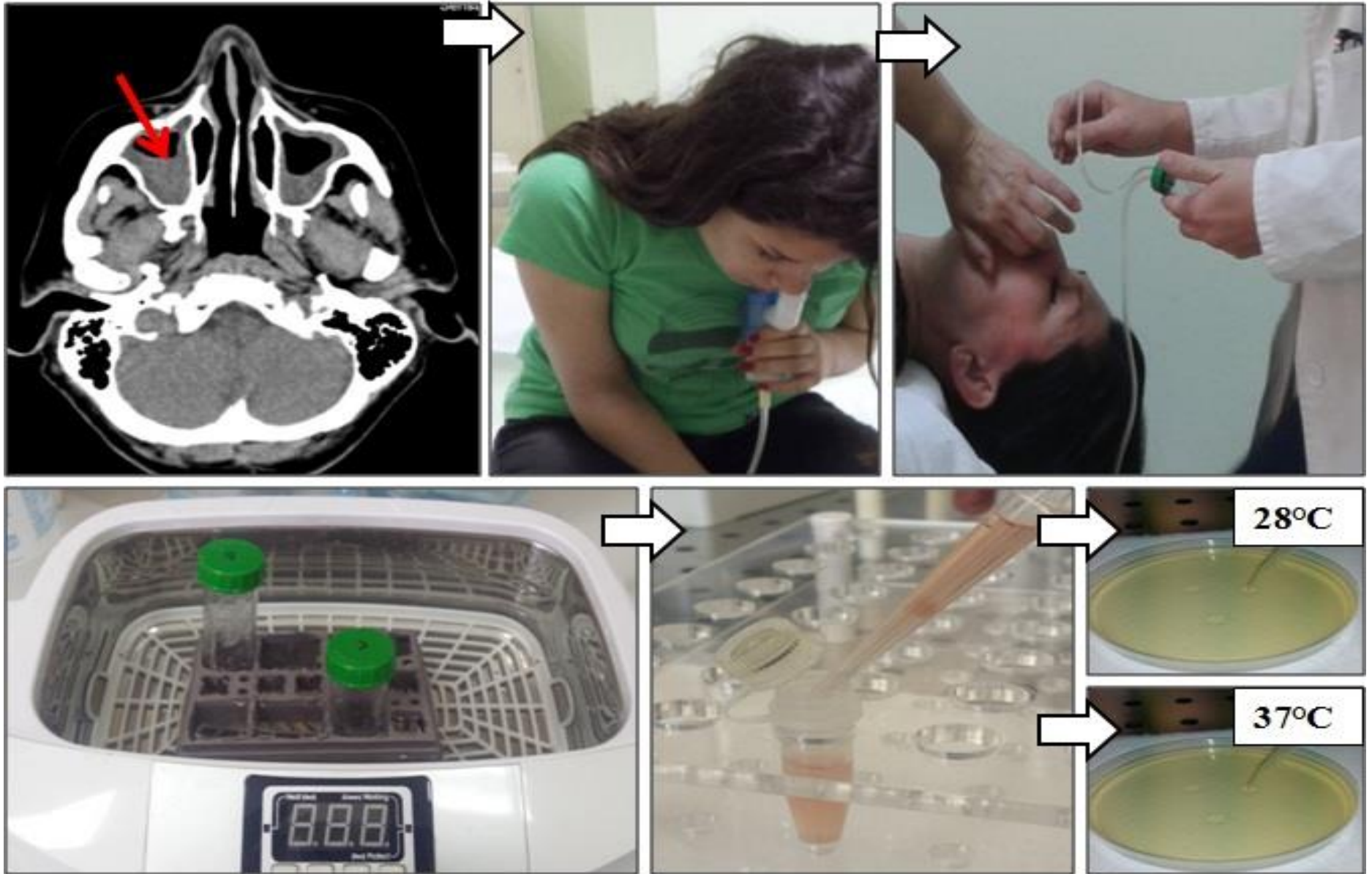
ISNS\_A je obrađen po modifikovanom protokolu (Ponikau i sar., 1999). Aspiriranom sadržaju je dodata ekvivalentna količina 1.4% diotiotreitola. Sadržaj je homogenizovan na vortex mešalici tokom 60s, a zatim je posuda mukus ekstraktora sa ISNS\_A postavljena u UU kadu u uspravnom položaju i obrađivana ultrazvucima od 42 kHz, na temperaturi od 50°C tokom 480s (slika 16 i 17). Nakon obrade ISNS\_A po 50 µl je zasejano na svaki od tri dela trostruke hranljive podloge, u duplikatu, radi inkubacije na 28 °C i 37°C. Obeležene podloge su postavljene u inkubator na 28 °C i 37°C, a rezultati su evidentirani nakon 24h za bakterije i nakon 7 dana za plesni.

Polovina ukupnog sadržaja ISNS\_A je ispitana mikrobiološki, a druga polovina je sačuvana u banci uzoraka na -70°C.



Slika 16. Obrada ISNS\_A





Slika 17. Protokol za uzorkovanje i obradu ISNS\_A

### **3.10.2. Izolacija i identifikacija gljiva i bakterija**

#### **3.10.2.1. Podloge za izolaciju**

Za izolaciju bakterija i gljiva iz: (i) jednoćelijske suspenzije NP, (ii) BSN i (iii) ISNS\_A korišćene su „trostruke podloge“.

Za izolaciju bakterija i gljiva iz ISNS\_L korišćene su KA i SDA hranljive podloge.

Za izolaciju gljiva iz uzorka vazduha korišćena je hranljiva podloga sa PDA (slika 18).

#### **3.10.2.2. Temperatura inkubacije**

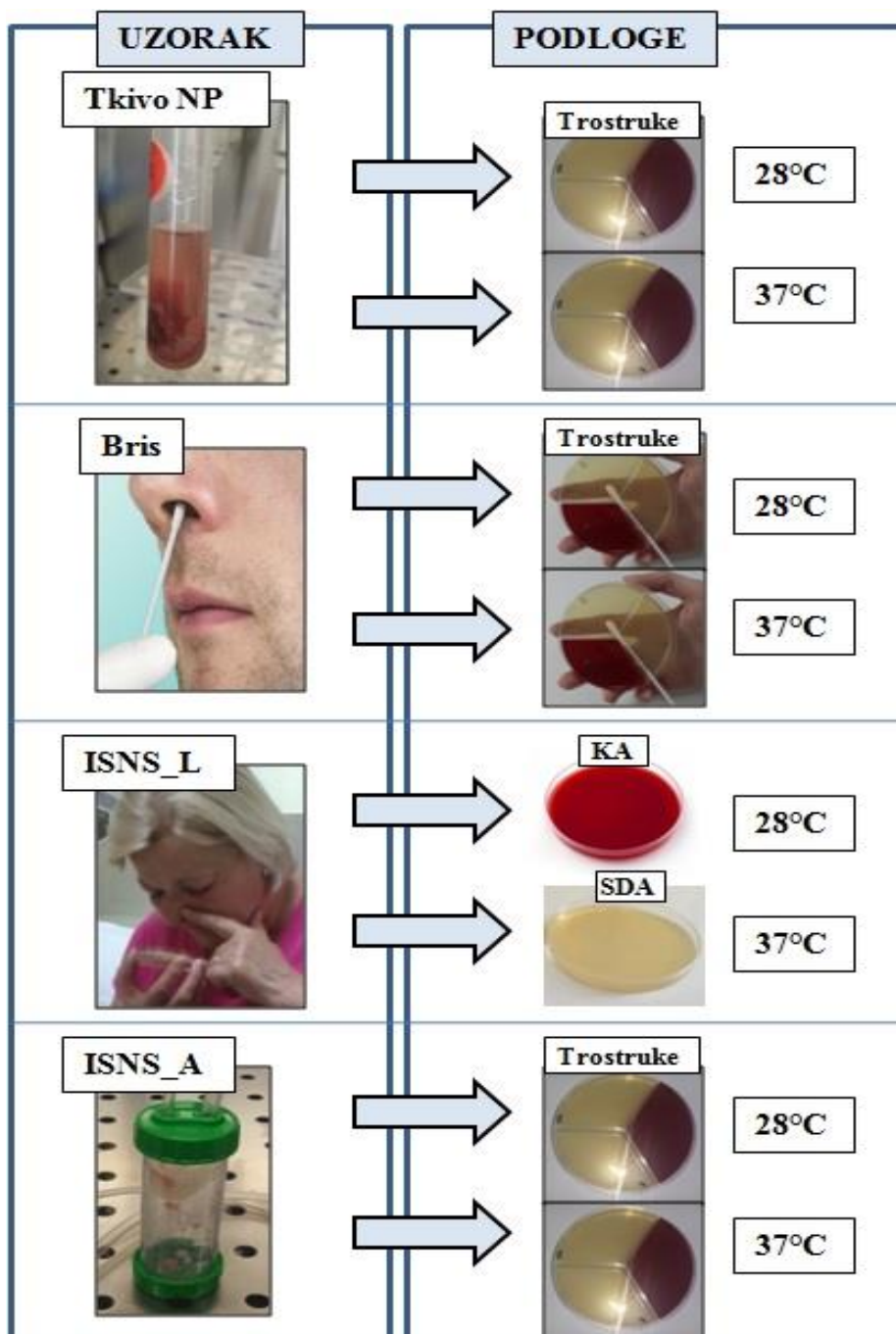
Nakon zasejavanja uzoraka, obeležene podloge su postavljene u inkubator na 28°C i 37°C, a rezultati su evidentirani nakon 24h za bakterije i svakodnevno tokom 7 dana za plesni. Nakon 24h bakteriološki nalaz je izdavan kao negativan ukoliko nije bilo porasta bakterija ili ukoliko je bila prisutna fiziološka mikroflora i pozitivan ukoliko je bilo porasta patogenih bakterija. Nakon 7 dana mikološki nalaz je izdavan kao negativan ukoliko nije bilo porasta i pozitivan ukoliko je bilo porasta gljiva (slika 18).

#### **3.10.2.3. Identifikacija bakterija i gljiva**

Bakterije su identifikovane putem makroskopskih, mikroskopskih i enzimskih karakteristika do nivoa vrste nakon 24h od postavljanja u inkubator.

Gljive su identifikovane putem makroskopskih i mikroskopskih karakteristika do nivoa vrste nakon 7 dana od postavljanja u inkubator. Mikroskopska identifikacija je vršena pravljenjem mikroskopskog preparata sa kulture bojenjem sa *Lactophenol cotton blue/LCB* (Hardy Diagnostics, SAD) i 20% NaCl i posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom (40x, 100x; Leica, SAD).

Izolati gljiva su sačuvani u kolekciji značajnih gljiva u: (i) destilovanoj vodi na sobnoj temperaturi i (ii) *Skim milk*-u (HiMedia, Indija) na -20 °C.



Slika 18. Izolacija gljiva iz kliničkih uzoraka (podloge, vreme i temperatura)

### 3.11. Instrumenti merenja

Za sve pacijente su prikupljeni:

- (i) sociodemografski podaci (upitnici A1, A2, E)
- (ii) klinički podaci - alergološkim, prednje-rinoskopskim i radiološkim pregledom (upitnici A3, B, C)
- (iii) mikrobiološki nalazi (upitnik D).

Kandidat je na osnovu anamnestičkih podataka dobijenih od pacijenata popunjavao upitnike A1, A2 i E, dok su upitnike A3, B, C i D popunjavali kandidat i lekari specijalisti iz oblasti alergologije, orl, radiologije i mikrobiologije.

**Upitnik A1** predstavlja subjektivna vizuelno analogna skala (VAS) za određivanje težine HRS na osnovu šest vodećih simptoma. VAS skala se sastoji od jedne linije dužine 10 cm podeljene na 10 podeoka od po 1cm, koja je na početku obeležena sa "0" (bez tegoba), a na kraju sa "10" (intenzivne tegobe) (prilog 2). Ispitanik treba da subjektivni osećaj tegoba izrazi kroz numerizaciju između ove dve krajnje tačke. U studiji je korišćena tzv. "Smile" VAS skala. "Smile" skala na samom početku i kraju linije, sadrži crteže koji odslikavaju bolno stanje pacijenta, dok su između ova dva crteža numeričke oznake. Pojedinačno dobijeni skorovi za svaki simptom, od kojih se svaki boduje od 0 do 10, su sabrani i podeljeni sa ukupnim brojem simptoma (5) i na taj način se dobija ukupna vrednost (od 0-10) što predstavlja skor VAS skale. Na osnovu ukupne vrednosti, težina HRS se izražava kao: (i) blaga (0–4), (ii) umerena (5–6) i (iii) teška (7–10) (Soler i sar., 2008) (prilog 2).

**Upitnik A2** predstavlja SNOT-22, koji su formirali Hopkins i saradnici, u formi upitnika o QoL uključujući 22 najčešća simptoma HRS i služi za određivanje težine HRS (Hopkins i sar., 2009). Originalna engleska verzija upitnika je prevedena na srpski (od strane dva prevodioca) potom je formirana zajednička srpska verzija prevoda koja je vraćena na engleski (takođe od strane dva prevodioca). Engleske verzije upitnika su poslate autoru (dr Hopkins) koji je nakon uvida dao odobrenje da se upitnik može koristiti u našem ispitivanju.

Svi ispitanici su anketirani od strane istog lekara. Najpre su ukratko objašnjeni svrha i način popunjavanja upitnika, da bi se potom, uz njihov pristanak, pristupilo popunjavanju upitnika. SNOT-22 je upitnik specifičan za oboljenje, primarno namenjen proceni kvaliteta života obolelih od HRS. Za ispitivanje je korišćena verzija koju popunjava ispitivač, a period na koji se odnose pitanja upitnika iznosio je dve nedelje (po uzoru na izvornu verziju SNOT-22). Pacijenti su zamoljeni da subjektivno ocene 22 najčešće tegobe za HRS prema težini: (i) 0 - bez tegoba; (ii) 1 - veoma slabe tegobe; (iii) 2 - slabe tegobe; (iv) 3 - umerene tegobe; (v) 4 - izražene tegobe i (vi) 5 - nepodnošljive tegobe (prilog 3). SNOT-22 je podeljen na 5 domena: 1. nazalni simptomi (kijanje, curenje iz nosa, vlažan nos, prisustvo vodenastog sekreta u nosu, prisustvo gustog sekreta u nosu, blokada/otežano disanje na nos, smanjen osećaj mirisa, neprijatan miris iz nosa); 2. orofaringealni simptomi (kašalj, vrtoglavica, osećaj punoće u

ušima, bol u ušima); 3. facijalni simptomi (bol ili pritisak na nekom delu lica); 4. simptomi vezani za spavanje (isprekidan san, noćno buđenje zbog otežanog disanja, osećaj umora prilikom buđenja, smanjena koncentracija, iscrpljenost/zamor, smanjena produktivnost tokom dana, poteškoće vezane sa spavanjem); 5. sistemski simptomi (anksioznost/nervoza, loše raspoloženje). Za sva pacijente je određivan ukupan SNOT-22 skor sabiranjem ocena za svaku od 22 tegobe iz upitnika. Vrednosti ukupnog SNOT-22 skora se kreću od 0-110, pri čemu viša vrednost SNOT-22 skora ukazuje na lošiji ishod HRS. Skorovanje je izvršeno na sledeći način: (i) 0-35 lak HRS, (ii) 36-75 umeren HRS i (iii) 76-110 težak HRS (DeConde i sar., 2014) (prilog 3).

**Upitnik A3** se odnosi na alergološki klinički nalaz i popunjava ga lekar. Obuhvata rezultate SPT, nalaz ukupnih IgE At u serumu pacijenata, nalaz specifičnih IgE At u serumu pacijenata na mix gljivičnih alergena, broj Eo u serumu pacijenata i rezultat metaholinskog testa (prilog 4).

Rezultat **SPT** na inhalatorne alergene je skorovan na sledeći način:

- (i) Negativni svi inhalatorni alergeni - 0 bodova
- (ii) Pozitivna do 2 inhalatorna alergena – 1 bod
- (iii) Pozitivna 3 i više inhalatorna alergena – 2 boda

Nalaz **ukupnih IgE At** u serumu pacijenata je skorovan na sledeći način:

- (i) Negativna - 0 bodova
- (ii) Pozitivan ( $>100$  IU/ml) – 1 bod
- (iii) Visokopozitivna ( $>1000$  IU/ml) – 2 boda

Nalaz **specifičnih anti-gljivičnih IgE At** u serumu pacijenata je skorovan na sledeći način:

- (i) Negativno ( $<0.35$  IU/ml) - 0 bodova
- (ii) Umereno značajno (klasa od 1 do 2) ( $0.35 - 3.5$  IU/ml) – 1 bod
- (iii) Visokoznačajno (klasa od 3 do 6) ( $>3.5$  IU/ml) – 2 boda

Broj **Eo u serumu** pacijenata je skorovan na sledeći način:

- (i) Normalni ( $0-349$  mm<sup>3</sup>) - 0 bodova
- (ii) Visoki ( $>350$  mm<sup>3</sup>) – 1 bod

(iii) Jako visoki ( $>500 \text{ mm}^3$ ) – 2 boda

**Upitnik B** se odnosi na kliničke podatke vezane za HRS (anamnestički i rezultati endoskopskog/rinoskopskog pregleda) i služi za određivanje rinoskopskog skora. Sadrži 5 anamnestičkih pitanja i 4 rinoskopska parametra i odgovori se pojedinačno skoruju od 0 do 2, odnosno od 0 do 3. Upitnikom su dobijeni anamnestički podaci o težini HRS: (i) dužina trajanja tegoba (glavobolja/bol u predelu sinusa, nazalna drenaža, otežano disanje), (ii) dužina korišćenja lekova (antibiotici, topikalni kortikosteroidi, antihistaminici), (iii) intenzitet simptoma, (iv) prethodne operacije sinusa i (v) uzrast u kom su počele tegobe.

Kliničkim rinološkim pregledom je dobijen podatak o – prisustvu edema, eritema i pre-post nazalnog dripa (leva i desna strana) (prilog 5). Prisustvo svake od promena na rinološkom nalazu nosi 1 bod, a odsustvo 0 bodova, te je maksimalan skor 3, a minimalan 0. Skorovanje kliničkog rinološkog nalaza je izvršeno na sledeći način: (i) 0-1 lak HRS, (ii) 2 umeren HRS i (iii) 3 težak HRS (prilog 5).

**Upitnik C** se odnosi na CT nalaz endokranijuma (paranasalnih sinusa). Obuhvata 5 parametara koji ukazuju na očuvanost kontinuiteta zida sinusa, sadržaj sinusa i gustinu sadržaja u sinusima. Ispunjenost sinusa je određivana posebno za maksilarne sinuse i posebno za ostale sinuse (etmoidalni, sfenoidalni, frontalni) (Lund i sar., 1993) (prilog 6).

Za određivanje težine HRS korišćen je novo-formirani „Skor za procenjivanje ispunjenosti maksilarnih sinusa“, određivanjem procentualnih vrednosti sledećih parametara putem kompjuterskog programa:

(i) Zadebljanje mukoze maksilarnih sinusa, skorovano na sledeći način: (i) od 0 do 33% - 0 bodova, (ii) od 33 do 66% - 1 bod i (iii) od 66 do 100% - 2 boda.

(ii) Ispunjenost maksilarnih sinusa, skorovana na sledeći način: (i) od 0 do 33% - 0 bodova, (ii) od 33 do 66% - 1 bod i (iii) od 66 do 100% - 2 boda. Procentualna ispunjenost maksilarnih sinusa je procenjivana putem kompjuterskog programa *Box count* metodom kojom se određuje fraktalna dimezija kao mera zauzetosti prostora sinusne šupljine (“*space filling*”) (Heinz-Otto i sar., 2004).

Za navedene parametre računat je zbirni skor, a određivanje intenziteta promena je računato na sledeći način:

(i) Bez zadebljanja sluznice i bez sadržaja u sinusima - 0 bodova

(ii) Zadebljanje sluznice 33-66% i/ili ispunjenost sinusa 33-66% - 1 bod

(iii) Zadebljanje sluznice 66-100% i/ili ispunjenost sinusa 66-100% - 2 boda

**Upitnik D** se odnosi na mikrobiološke nalaze jednoćelijske suspenzije NP, BSN, ISNS\_L, ISNS\_A i uzorka vazduha iz životnog/radnog prostora pacijenata. Beleži se prisustvo gljiva i bakterija na kulturi jednoćelijske suspenzije NP, BSN, ISNS\_L, ISNS\_A i uzoraka vazduha, kao i njihova makroskopska i mikroskopska identifikacija (prilog 7).

3.2.8. **Upitnik E** sadrži osam pitanja koja se odnose na sociodemografske podatke pacijenata (pol, uzrast, mesto stanovanja, zanimanje, prisustvo vlage/buđi u životnom prostoru, komorbiditeta, korišćenje cigareta, trajanje HRS). Pacijenti su klasifikovani u sedam uzrasnih grupa: (i) 16-20, (ii) 21-30, (iii) 31-40, (iv) 41-50, (v) 51-60, (vi) 61-70 i (vii) >70 (prilog 8).

### 3.12. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka je obrađena uz pomoć statističkog paketa SPSS 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences* version 17.0). Varijable za bazu podataka su formirane prema A1, A2, A3, B, C, D i E upitnicima. Formirana je online baza podataka sa softverom za personalizovanu dijagnostiku i praćenje pacijenata sa HRS/FRS (e-SINONAZAL-LabNet; MyCoMedLab Ltd., Beograd, Srbija) (slika 19).



**Slika 19. E-SINONAZAL-LabNet**

Za statističku obradu dobijenih podataka korišćene su metode deskriptivne statistike: mere centralne tendencije - aritmetička sredina i medijana, mere varijabiliteta - standardna devijacija, minimum i maksimum, interval poverenja, kao i grafičko i tabelarno prikazivanje rezultata. Atributivna obeležja posmatranja prikazana su apsolutnim i relativnim brojevima (%).

Od metoda interferencijalne statistike primenjene su:

- Hi kvadrat test i McNemar test za analizu učestalosti pojedinih ocena posmatranih parametara između grupa;
- t-test za nezavisne uzorke kod numeričkih obeležja posmatranja sa normalnom raspodelom, za poređenje vrednosti između analiziranih grupa; ANOVA test za poređenje razlika između tri ili više grupa;
- za evaluaciju i poređenje dijagnostičkih metoda uzorkovanja mikrobiološkog materijala korišćena je ROC kriva (*Receiver operating characteristic curve*). U ROC krivi je prava pozitivna stopa ( $S_n$ ) prikazana u funkciji lažno pozitivnih rezultata ( $1-S_p$ ). Svaka tačka na ROC krivi je predstavljena odnosom senzitivnost/specifičnost. Površina ispod ROC krive (AUC) je mera koliko dobro parametar može razlikovati dve dijagnostičke grupe (oboleli/normalni).  $S_n$  je verovatnoća da će rezultat testa biti pozitivan kada je bolest prisutna, a  $S_p$  je verovatnoća da će rezultat biti negativan kada bolest nije prisutna.

Za određivanje značajnosti kliničkih parametara za dijagnostiku FRS korišćena je multivarijantna i linearna regresija.

Sve vrednosti  $p < 0.05$  uzete su kao statistički značajne.



## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Sociodemografske karakteristike i grupe HRS pacijenata

U studiji je ispitano ukupno 179 HRS pacijenata. U cilju razvijanja metode dokazivanja gljiva u tkivu (jednoćelijska suspenzija NP) istraživanje je izvršeno na grupi hospitalizovanih operisanih pacijenata (n=43, **FESS grupa**) (tabela 13, slika 20). U cilju određivanja prevalencije HRS, HRS+NP i GRS i evaluacije metoda ISNS istraživanje je izvršeno na grupi ambulantnih neoperisanih pacijenata (n=136, **HRS grupa**) (tabela 14, slika 20).

##### 4.1.1. Sociodemografske i kliničke karakteristike operisanih pacijenata (n=43)

Grupu operisanih pacijenata su pretežno činile osobe muškog pola (70%), prosečnog uzrasta 36.7 godina sa prosečnom dužinom HRS 14.5 godina. reFESS je imalo 19/43 pacijenata (44.1%).

**Tabela 13. Sociodemografske i kliničke karakteristike operisanih pacijenata (n=43)**

Sociodemografski podaci		Grupa (n, %) FESS (43, 100%)
Pol	M	30 (69.8%)
	Ž	13 (30.3)
Uzrast (u godinama), srednja vrednost±SD		36.7±12.8
Dužina HRS (u godinama), srednja vrednost ±SD		14.5±6.2
FESS	reFESS	<b>19 (44.1)</b>
	pFESS	<b>24 (55.9)</b>

\*Mann-Whitney U test, p<0.05; \*\*Hi-kvadrat test, p<0.05, statistički značajna razlika.

##### 4.1.2. Sociodemografske i kliničke karakteristike neoperisanih pacijenata (n=136)

U grupi neoperisanih pacijenata je zastupljenost polova bila skoro podjednaka (M:Ž odnos 1:1.1), prosečnog uzrasta 38.47 godina sa prosečnom dužinom HRS 12.64 godina. Najčešći komorbiditet bila je astma (41.9%), dok je grupu činilo pretežno gradsko stanovništvo (72.1%).

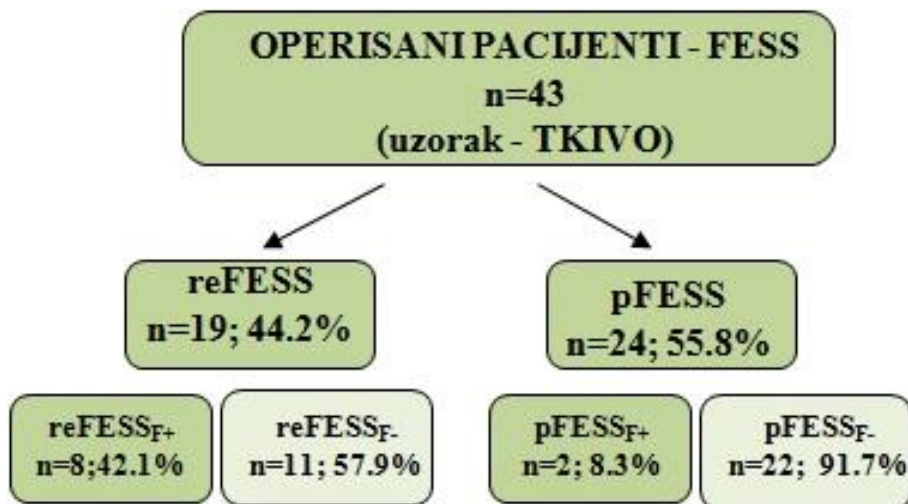
**Tabela 14. Sociodemografske karakteristike neoperisanih pacijenata (n=136)**

Demografski podaci		Grupa (n, %)
HRS neoperisani (136, 100%)		
<b>Pol</b>		
M		70 (51.5)
Ž		66 (48.5)
<b>Uzrasna grupa (god.)</b>		
16-20		7 (5.2)
21-30		38 (28)
31-40		22 (16.2)
41-50		38 (27.9)
51-60		21 (15.4)
61-70		10 (7.3)
<b>Godine (mean±SD)</b>		38.47±13.56
<b>Zanimanje (kontakt sa alergenima)</b>		
da		112 (82.4)
ne		24 (17.6)
<b>Mesto stanovanja</b>		
grad		98 (72.1)
selo		38 (27.9)
<b>Komorbiditet</b>		
astma		57 (41.9)
ABPA		1 (0.7)
nema		78 (57.4)
<b>Trajanje bolesti po kategorijama (god.)</b>		
<5		39 (28.7)
5-10		31 (22.8)
10-20		27 (19.8)
>20		39 (28.7)
<b>Trajanje bolesti (god.) (mean±SD)</b>		12.64±10.22

\*Hi-kvadrat; \*\*T-test, statistički značajna razlika.

#### 4.1.3. Karakteristike grupa operisanih HRS pacijenata i nalaz gljiva

Od 43 operisana pacijenta (FESS grupa), 44.2% su bili pacijenti sa prethodnim FESS-om (reFESS grupa), dok su 55.8% pacijenata imali FESS prvi put (pFESS). Mikološkim analizama je pokazano da je 42.1% pacijenata sa reFESS-om imalo gljive u jednoćelijskoj suspenziji NP (reFESS<sub>F+</sub> grupa), dok je samo 8.3% pacijenata iz pFEES grupe pozitivan nalaz gljiva (pFESS<sub>F+</sub> grupa) (slika 20).

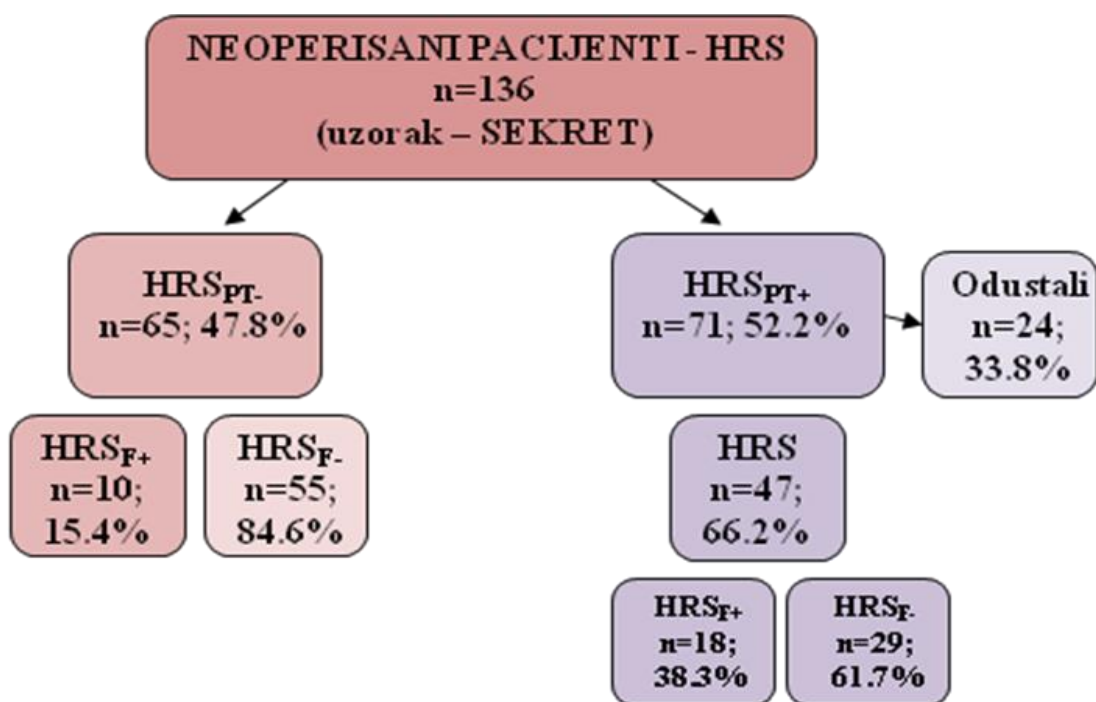


Slika 20. Karakteristike grupa operisanih HRS pacijenata i nalaz gljiva

#### 4.1.4. Karakteristike grupa neoperisanih HRS pacijenata i nalaz gljiva

U zavisnosti od toga da li je pre ISNS primenjen PT svih 136 neoperisanih pacijenata (HRS grupa) je podeljeno u podgrupe: **HRS<sub>PT-</sub>** (n=65) i **HRS<sub>PT+</sub>** (n=71). Takođe, izdvojila se i grupa pacijenta koji su odustali od druge faze ispitivanja (n=24).

U grupi **HRS<sub>PT-</sub>** pozitivan nalaz na gljive je bio kod 10 pacijenata (10/65, 15.4%) , a u grupi **HRS<sub>PT+</sub>** pozitivan nalaz gljiva je imalo 18 pacijenata (18/47, 38.3%) (slika 21).



Slika 21. Karakteristike grupa neoperisanih HRS pacijenata i nalaz gljiva

#### 4.1.5. Povezanost sociodemografskih i kliničkih karakteristika operisanih HRS (FESS, n=43) pacijenata i nalaza gljiva

Trajanje HRS između FESS<sub>F+</sub> i FESS<sub>F-</sub> grupa se statistički značajno razlikovalo (17.4±10.9 vs 10.4±7.0, redom) (p=0.033) dok se prosečan uzrast pacijenata između FESS<sub>F+</sub> i FESS<sub>F-</sub> grupa takođe razlikovao (30.0 ±14.8 vs 38.7±11.8, redom), ali bez statističkog značaja (p=0.059). Pacijenti iz FESS<sub>F+</sub> grupe su imali statistički duže trajanje HRS+NP i bili su mlađi u poređenju sa FESS<sub>F-</sub> grupom. U reFESS grupi pozitivan nalaz gljiva je nađen u 8/19 (42.1%) pacijenata, dok je u pFESS grupi pozitivan nalaz nađen u 2/24 (8.3%) a ova razlika je visoko statistički značajna (p=0.01). Pacijenti iz FESS<sub>F+</sub> grupe su češće imali reFESS u poređenju sa FESS<sub>F-</sub> grupom (tabela 15).

**Tabela 15. Povezanost sociodemografskih i kliničkih karakteristika operisanih pacijenata grupe FESS (n=43) i nalaza gljiva**

Sociodemografski podaci		Grupa (n, %)		p
		FESS <sub>F+</sub> (33, 76.7%)	FESS <sub>F-</sub> (10, 23.3%)	
Pol	M	23 (69.7)	7 (70)	0.985
	Ž	10 (30.3)	3 (30)	
Uzrast (u godinama), srednja vrednost±SD		38.7±11.8	30.0 ±14.8	0.059
Dužina HRS (u godinama), srednja vrednost ±SD		10.4±7.0	17.4±10.9	<b>*0.033</b>
FESS	reFESS (n=19)	11/19 (57.9)	8/19 (42.1)	<b>**0.01</b>
	pFESS (n=24)	22/24 (91.7)	2/24 (8.3)	

\*Mann-Whitney U test, p<0.05; \*\*Hi-kvadrat test, p<0.05, statistički značajna razlika.

#### 4.1.6. Povezanost i sociodemografske karakteristike neoperisanih HRS pacijenata i nalaza gljiva

U cilju utvrđivanja povezanost i sociodemografskih karakteristika neoperisanih HRS pacijenata i nalaza gljiva izvršena je analiza pola, starosti, zanimanja, mesta stanovanja, prisutnih komorbiditeta i trajanja bolesti za grupe HRS<sub>PT+</sub>, HRS<sub>PT-</sub> i pacijenata koji su odustali od druge faze studije.

#### 4.1.6.1. Sociodemografske karakteristike grupe neoperisanih pacijenata HRS<sub>PT+</sub> i HRS<sub>PT-</sub> (n=112)

Grupu HRS<sub>F+</sub> je u najvećem procentu (≈40%) činila mlađa populacija (od 21-30 god), a zastupljenost polova je bila skoro ravnomerna (M:Ž odnos 1:1.2). Najčešći komorbiditet u HRS<sub>F+</sub> grupi bila je astma prisutna kod 46% pacijenata. Trajanje HRS kod pacijenata sa HRS<sub>F+</sub> je bilo statistički značajno duže u odnosu na HRS<sub>F-</sub> grupu (p=0.05) (tabela 16).

**Tabela 16. Povezanost sociodemografskih karakteristika neoperisanih pacijenata grupe HRS<sub>PT+</sub> i HRS<sub>PT-</sub> (n=112) i nalaza gljiva**

Sociodemografski podaci		Grupa (n, %)			p
		HRS <sub>PT+</sub> i HRS <sub>PT-</sub> (112, 100%)	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Pol</b>					0.29
M		56 (50)	37 (44)	19 (68)	
Ž		56 (50)	47 (56)	9 (32)	
<b>Uzrasna grupa (god.)</b>					0.792
16-20		4 (3.6)	3 (3.5)	1 (3.6)	
21-30		32 (28.6)	21 (25)	11 (39.3)	
31-40		20 (17.9)	15 (17.8)	5 (17.7)	
41-50		31 (27.7)	25 (30)	6 (21.4)	
51-60		16 (14.2)	13 (15.4)	3 (10.8)	
61-70		9 (8)	7 (8.3)	2 (7.2)	
<b>Godine (mean±SD)</b>		38.37±13.32	38.95±13.35	36.61±13.29	0.422
<b>Zanimanje (kontakt sa alergenima)</b>					0.766
da		38 (34)	14 (16.7)	24 (85.7)	
ne		74 (66)	70 (83.3)	4 (14.3)	
<b>Mesto stanovanja</b>					0.124
grad		91 (81.3)	71 (84.5)	20 (71.4)	
selo		21 (18.7)	13 (15.5)	8 (28.6)	
<b>Komorbiditet</b>					0.115
astma		43 (38.5)	30 (35.7)	13 (46.4)	
ABPA		1 (0.9)	0 (0)	1 (3.6)	
bronhitis		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
nema		68 (60.6)	54 (64.3)	14 (50)	
<b>Trajanje bolesti (god.)</b>					0.254
<5		30 (26.9)	26 (31)	4 (14.3)	
5-10		22 (19.6)	17 (20.2)	5 (17.9)	
10-20		22 (19.6)	14 (16.7)	8 (28.6)	
>20		38 (33.9)	27 (32.1)	11 (39.3)	
<b>Trajanje bolesti (god.) (mean±SD)</b>		13.77±10.67	12.99±10.69	16.11±10.47	0.672

#### 4.1.6.2. Sociodemografske karakteristike grupe neoperisanih HRS pacijenata (n=136) u odnosu na učešće pacijenata u ispitivanju

Imajući u vidu da je grupa pacijenta odustala od druge faze studije (n=24) izvršeno je ispitivanjem povezanosti njihovih sociodemografskih karakteristika i karakteristika pacijenata koji su nastavili drugu fazu (HRS<sub>PT+</sub> i HRS<sub>PT-</sub>, n=112). U odnosu na grupe HRS<sub>PT+</sub> i HRS<sub>PT-</sub>, za grupu pacijenata koji su odustali od druge faze studije je pokazana statistički značajna razlika u trajanju bolesti i mestu stanovanja. Grupnu koja je odustala od druge faze studije je činilo pretežno seosko stanovništvo (p=0.000) sa kraćim trajanjem HRS (p=0.005) (tabela 17).

**Tabela 17. Povezanost sociodemografskih karakteristika pacijenata HRS<sub>PT+</sub> i HRS<sub>PT-</sub> grupe (n=112) i pacijenata koji su odustali od druge faze studije (n=24)**

Sociodemografski podaci		Grupa (n, %)			p
		Svi HRS (136, 100%)	HRS <sub>PT+</sub> i HRS <sub>PT-</sub> (112, 82,4%)	Odustali (24, 17,6%)	
<b>Pol</b>					0.459
	M	70 (51.5)	56 (50)	14 (58.3)	
	Ž	66 (48.5)	56 (50)	10 (41.7)	
<b>Uzrasna grupa (god.)</b>					0.510
	16-20	7 (5.2)	4 (3.6)	3 (12.5)	
	21-30	38 (28)	32 (28.5)	6 (25)	
	31-40	22 (16.2)	19 (17)	3 (12.5)	
	41-50	38 (27.9)	33 (29.5)	5 (20.9)	
	51-60	21 (15.4)	16 (14.2)	5 (20.9)	
	61-70	10 (7.3)	8 (7.2)	2 (8.2)	
<b>Godine (mean±SD)</b>					0.847
		38.47±13.56	38.37±13.32	38.96±14.91	
<b>Zanimanje (kontakt sa alergenima)</b>					0.298
	da	112 (82.4)	94 (83.9)	18 (75)	
	ne	24 (17.6)	18 (16.1)	6 (25)	
<b>Mesto stanovanja</b>					<b>*0.000</b>
	grad	98 (72.1)	91 (81.25)	6 (25)	
	selo	38 (27.9)	21 (18.75)	<b>18 (75)</b>	
<b>Komorbiditet</b>					0.339
	astma	57 (41.9)	43 (38.5)	13 (54.2)	
	ABPA	1 (0.7)	1 (0.8)	0 (0)	
	nema	78 (57.4)	68 (60.7)	11 (45.8)	
<b>Trajanje bolesti po kategorijama (god.)</b>					<b>*0.015</b>
	<5	39 (28.7)	30 (26.8)	7 (29.2)	
	5-10	31 (22.8)	22 (19.6)	10 (41.6)	
	10-20	27 (19.8)	22 (19.6)	6 (25)	
	>20	39 (28.7)	<b>38 (33.9)</b>	1 (4.2)	
<b>Trajanje bolesti (god.) (mean±SD)</b>					<b>** 0.005</b>
		12.64±10.22	<b>13.77±10.67</b>	7.38±5.3	

\*Hi-kvadrat; \*\*T-test, statistički značajna razlika.

## 4.2. Prikaz mikrobiološkog nalaza po uzorku iz sinusa pacijenata sa HRS korišćenjem metoda jednoćelijske suspenzije NP, ISNS i BSN

### 4.2.1. Prikaz sinusa sa pozitivnim nalazom gljiva u jednoćelijskoj suspenziji NP

Ukupno 55 sinusa su operisana putem FESS-a (55/86 sinusa; 63.9%) i na 55 uzoraka tkiva NP je primenjena metoda obrade do jednoćelijske suspenzije radi dokazivanja prisustva gljiva. Nalaz gljiva je bio pozitivan kod 10/43 (23.3%) pacijenata, što predstavlja 13/55 pozitivnih jednoćelijskih suspenzija NP (23.6%) (tabela 18). Nalaz gljiva je obostrano bio pozitivan kod 3/10 pacijenata (30%). Jedan pacijent je imao pozitivan nalaz i na kulturi i na DMP (1/13; 7.7 %) (tabela 1). Najčešće izolovana vrsta po uzorku je bila *Aspergillus flavus*, identifikovan u 8/13 (61.5%) jednoćelijskih suspenzija NP, koji pripadaju 6/10 (60 %) pacijenata iz FESS<sub>F+</sub> grupe (tabela 1).

**Tabela 18. Vrste gljiva iz uzoraka sinusa i tkiva NP obrađenih jednoćelijskih suspenzija NP (n=13) kod 10 pacijenata označenih kao HRS grupa FESS<sub>F+</sub>**

Pacijenti FESS <sub>F+</sub>	Uzorci iz sinusa	Vrste izolata*
1	1L	<i>Aspergillus niger</i>
	1D	/
2	2L	/
	2D	<i>A. flavus</i>
3.	3L	<i>A. niger</i>
	3D	<i>A. niger</i>
4.	4L	<i>A. niger</i>
	4D	<i>A. niger</i>
5.	5L	<i>A. flavus</i>
	5D	<i>A. flavus</i>
6.	6L	<i>A. niger</i>
	6D	/
7.	7L	/
	7D	<i>Alternaria alternata</i>
8.	8L	<i>A. flavus</i>
	8D	/
9.	9L	<i>A. flavus</i>
	9D	/
10.	10L	/
	10D	<i>A. flavus</i>

*Bakteriolška analiza nije rađena*\* Skraćenice: L, levi sinus; D, desni sinus;



#### **4.2.2. Prikaz sinusa sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS\_A bez pretretmana (PT) (grupa HRS<sub>PT-/F+</sub>; n=130)**

Metoda ISNS bez PT je primenjena na ukupno 130 sinusa (65 pacijenata). Uzorkovano je po 130: (i) BSN, (ii) ISNS\_L i (iii) ISNS\_A. Pozitivne pacijente je činila grupa pacijenata sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS\_A. Pacijenti sa pozitivnim nalazom ISNS\_L i BSN bez PT nisu smatrani „pozitivnim“ s obzirom na nerelevantnost BSN i ISNS\_L bez prethodnog PT.

Nalaz gljiva je bio pozitivan kod 10/65 (15.4%) pacijenata grupe HRS<sub>PT-</sub>, što predstavlja 13/130 pozitivnih ISNS\_A (10%) (tabela 19). Nalaz gljiva je obostrano bio pozitivan kod 3/10 pacijenata (30%). Najčešće izolovana vrsta po uzorku je bila *Aspergillus fumigatus*, identifikovan u 3/13 (23.1%) ISNS\_A. Kod svih 13/130 (10%) pozitivnih uzoraka ISNS\_A, nalaz ISNS\_L i BSN su takođe bili pozitivni (tabela 19).

**Tabela 19. Vrste gljiva i bakterija iz uzoraka sinusa izolovane primenom 3 različite metode uzorkovanja sekreta (bez PT) kod 10/65 pacijenata (13/130 sinusa) označenih kao grupa HRS<sub>PT-/F+</sub>**

HRS <sub>PT-/F+</sub>	Br. sinusa	Metode		
		ISNS_A	ISNS_L	BSN
1.	1L	/	/	/
	1D	<i>Alternaria alternata</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
2.	2L	<i>A. alternata</i> <i>S.pyogenes</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Alternaria alternata</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
	2D	/	/	/
3.	3L	<i>A. fumigatus</i> <i>S. aureus</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>S. aureus</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>S. aureus</i>
	3D	<i>A. fumigatus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
4.	4L	<i>A. niger</i> <i>S.pneumoniae</i>	<i>A. niger</i> <i>S.pneumoniae</i>	<i>A. niger</i> <i>S.pneumoniae</i>
	4D	/	/	/
5.	5L	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
	5D	<i>Cladosporium</i> sp. <i>S. aureus</i>	<i>Cladosporium</i> sp. <i>S. aureus</i>	<i>Cladosporium</i> sp. <i>S. aureus</i>
6.	6L	/	/	/
	6D	<i>Rhizopus</i> sp. <i>S.aureus</i> <i>H.influenzae</i>	<i>Rhizopus</i> sp. <i>S.aureus</i> <i>H.influenzae</i>	<i>Rhizopus</i> sp. <i>S.aureus</i> <i>H.influenzae</i>
7.	7L	/	/	/
	7D	<i>A. fumigates</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	<i>A. fumigates</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	<i>A. fumigates</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>
8.	8L	<i>Penicillium</i> sp. <i>S.pneumoniae</i>	<i>Penicillium</i> sp. <i>S.pneumoniae</i>	<i>Penicillium</i> sp. <i>S.pneumoniae</i>
	8D	<i>Penicillium</i> sp. <i>S.pneumoniae</i>	<i>Penicillium</i> sp. <i>S.pneumoniae</i>	<i>Penicillium</i> sp. <i>S.pneumoniae</i>
9.	9L	<i>A. flavus</i> <i>S. aureus</i> <i>H.influenzae</i> <i>P.aeruginosa</i>	<i>A. flavus</i> <i>S. aureus</i> <i>H.influenzae</i> <i>P.aeruginosa</i>	<i>A. flavus</i> <i>S. aureus</i> <i>H.influenzae</i> <i>P.aeruginosa</i>
	9D	/	/	/
10.	10L	/	/	/
	10D	<i>A. niger</i> <i>S.pneumoniae</i>	<i>A. niger</i> <i>S.pneumoniae</i>	<i>A. niger</i> <i>S.pneumoniae</i>

Skraćenice: L, levi sinus; D, desni sinus.

#### **4.2.3. Prikaz sinusa sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS\_A, ISNS\_L i BSN sa PT grupa HRS<sub>PT+/F+</sub> (n=94)**

Metoda ISNS sa PT je primenjena na ukupno 94 sinusa (47 pacijenata). Uzorkovano je po 94: (i) BSN, (ii) ISNS\_L i (iii) ISNS\_A. Uzorci su postavljeni na dve temperature, 37°C i 28°C. Pokazan je bolji porast gljiva iz kliničkih uzoraka iz sinusa na 28°C. Pozitivne pacijente je činila grupa pacijenata sa pozitivnim nalazom gljiva u ISNS\_A i ISNS\_L. Pacijenti sa pozitivnim nalazom BSN nisu smatrani „pozitivnim“ s obzirom na nerelevantnost ove metode.

Nalaz gljiva je bio pozitivan kod 18/47 (38.3%) pacijenata grupe HRS<sub>PT+</sub>, što predstavlja 29/94 pozitivnih uzoraka ISNS (30.9%) (tabela 20). Nalaz gljiva je obostrano bio pozitivan kod 11/47 (23.4%) pacijenata grupe HRS<sub>PT+</sub>. Najčešće izolovana vrsta po uzorku je bila *Penicillium spp.*, identifikovan u 8/29 (27.6%) ISNS i *Aspergillus fumigatus* identifikovan u 6/29 (20.7%) ISNS. Nalaz BSN je bio pozitivan kod 5/94 (5.3%) pacijenata grupe grupe HRS<sub>PT+</sub> (tabela 20).

**Tabela 20. Vrste gljiva i bakterija iz uzoraka sinusa izolovane primenom 3 različite metode uzorkovanja sekreta (sa PT) kod 18/47 pacijenata (29/94 sinusa) označenih kao grupa HRS<sub>PT+/F+</sub>**

HRS <sub>PT+/F+</sub>	Br. sinusa	Metode		
		ISNS_A	ISNS_L	BSN
1.	1L	/	/	/
	1D	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>A. alternata</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
2.	2L	<i>P. chrysogenum</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	2D	<i>P. chrysogenum</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
3.	3L	<i>A. fumigatus</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. cladosporioides</i> <i>S. aureus</i>
	3D	<i>A. fumigatus</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. cladosporioides</i> <i>S. aureus</i>
4.	4L	/	/	/
	4D	<i>C. cladosporioides, P. chrysogenum</i> <i>S. aureus, Escherichia coli</i>	<i>C. cladosporioides, P. chrysogenum</i> <i>S. aureus, E. coli</i>	<i>S. aureus, E. coli</i>
5.	5L	<i>A. fumigatus, C. cladosporioides</i> <i>Bacillus cereus, N. meningitides</i>	<i>A. fumigatus, C. cladosporioides</i> <i>B. cereus, N. meningitides</i>	<i>B. cereus, N. meningitides</i>
	5D	<i>A. fumigatus, C. cladosporioides</i> <i>B. cereus, N. meningitides</i>	<i>A. fumigatus, C. cladosporioides</i> <i>B. cereus, N. meningitides</i>	<i>B. cereus, N. meningitides</i>
6.	6L	/	<i>R. oryzae</i>	/
	6D	/	<i>R. oryzae</i>	/
7.	7L	/	/	/
	7D	<i>A. alternata</i>	/	<i>A. alternata</i>
8.	8L	/	<i>A. fumigatus</i>	/
	8D	/	/	/
9.	9L	/	/	/
	9D	<i>S. aureus</i>	<i>A. flavus, P. chrysogenum</i>	<i>S. aureus</i>
10.	10L	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	/
	10D	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	/
11.	11L	<i>S. aureus</i>	<i>R. oryzae, F. oxysporum</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	11D	/	/	/
12.	12L	<i>A. fumigatus, P. notatum</i>	<i>P. notatum</i>	/
	12D	<i>A. fumigatus, P. notatum</i>	<i>P. notatum</i>	/
13.	13L	<i>R. oryzae, F. oxysporum</i> <i>S. aureus</i>	<i>R. oryzae, F. oxysporum</i> <i>S. aureus</i>	<i>R. oryzae</i> <i>S. aureus</i>
	13D	<i>R. oryzae, F. oxysporum</i> <i>S. aureus</i>	<i>R. oryzae, F. oxysporum</i> <i>S. aureus</i>	<i>R. oryzae</i> <i>S. aureus</i>
14.	14L	/	<i>A. flavus</i>	/
	14D	/	<i>A. flavus</i>	/
15.	15L	<i>S. aureus</i>	<i>C. cladosporioides, P. chrysogenum</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	15D	<i>S. aureus</i>	<i>C. cladosporioides, P. chrysogenum</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
16.	16L	/	<i>A. fumigatus</i>	/
	16D	/	<i>A. fumigatus</i>	/
17.	17L	<i>P. chrysogenum</i>	/	/
	17D	/	/	/
18.	18L	<i>S. aureus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>S. aureus</i>
	18D	<i>S. aureus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>S. aureus</i>

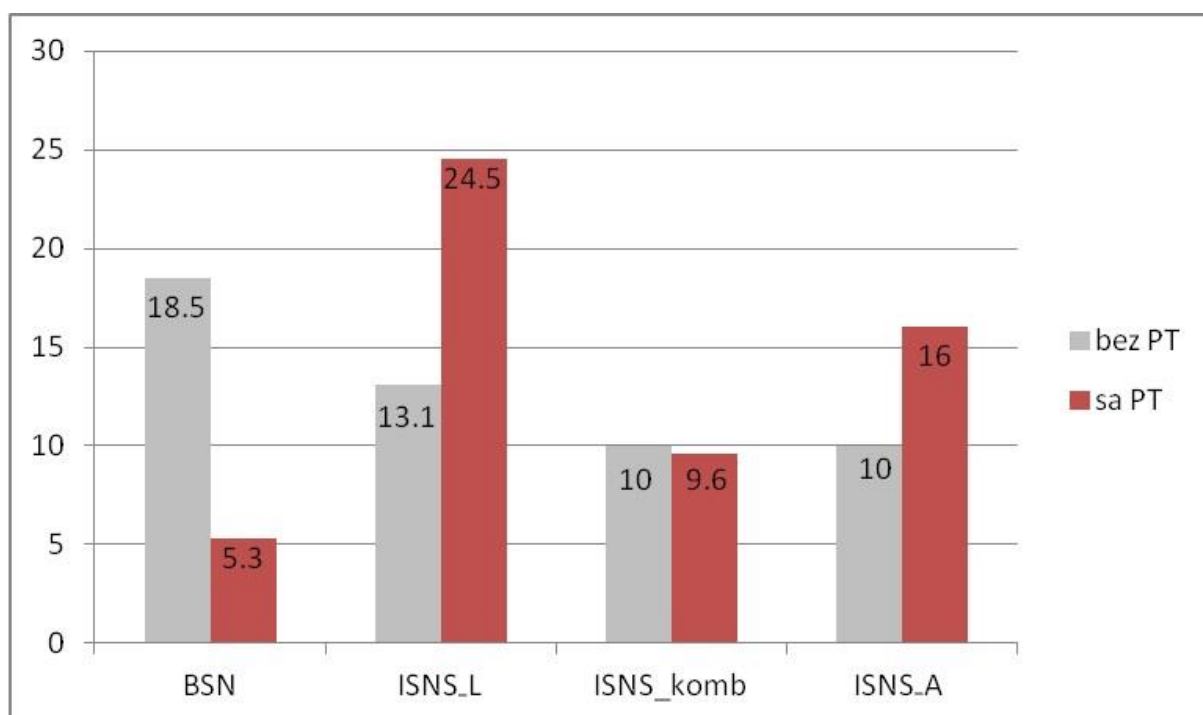
#### 4.2.4. Procenat pozitivnosti gljiva u odnosu na metodu i/ili kombinaciju metoda

##### 4.2.4.1. Prikaz pozitivnog nalaza gljiva/fungi (F) u tkivu NP korišćenjem jednoćelijske suspenzije

Pozitivan nalaz gljiva u tkivu NP korišćenjem metode obrade do jednoćelijske suspenzije je pokazan kod 10/43 (23.3%) pacijenata, što predstavlja 13/55 pozitivnih NP (23.6%).

##### 4.2.4.2. Prikaz pozitivnog nalaza gljiva (F) u sinusima korišćenjem metoda ISNS\_A, ISNS\_L, ISNS\_komb i BSN sa i bez PT

U zavisnosti od korišćenja PT pokazana je različita pozitivnost korišćenjem različitih metoda. U grupi u kojoj je primenjen PT ( $HRS_{PT+}$ ) najveća pozitivnost je pokazana kod ISNS\_L (24.5%), dok je u grupi bez PT ( $HRS_{PT-}$ ) najveću pozitivnost pokazala metoda uzorkovanja BSN (18.5%) (grafikon 2).



**Grafikon 2. Prikaz pozitivnog nalaza gljiva (F) u sinusima korišćenjem metoda: ISNS\_A, ISNS\_L, ISNS\_komb i BSN u zavisnosti od pretrmana (PT)**

#### 4.2.4.3. Komparacija rezultata metoda ISNS\_A, ISNS\_L, ISNS\_komb i BSN sa i bez PT

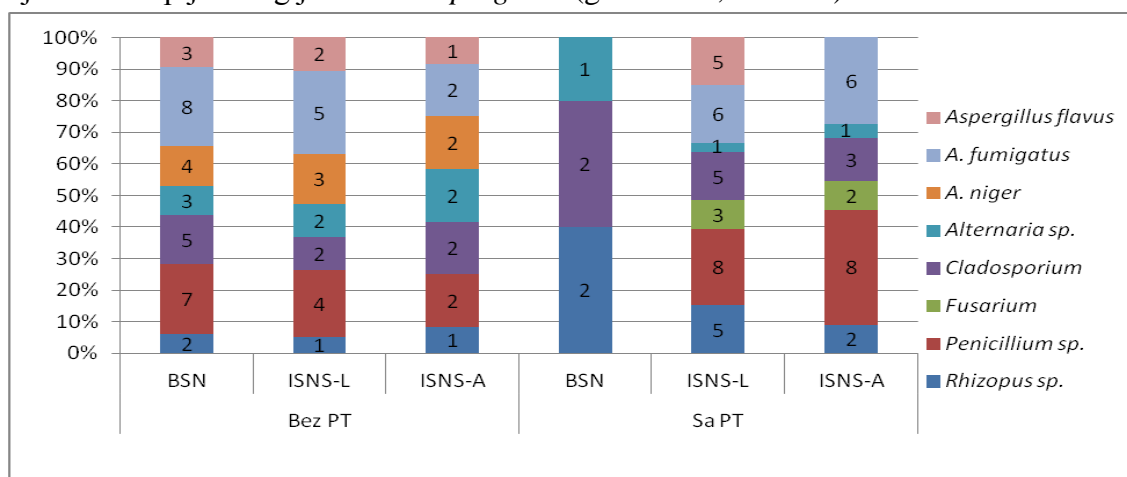
Komparacijom rezultata svake od korišćenih metoda u zavisnosti od prisustva PT pokazano je da je najveća razlika u pozitivnom nalazu dobijena između metode BSN sa i bez PT (5.3% vs. 18.5%, redom) i metode ISNS\_L sa i bez PT (24.5% vs. 13.1%, redom) (tabela 21, grafikon 3).

**Tabela 21. Komparacija rezultata metoda BSN, ISNS\_A, ISNS\_L sa i bez PT u cilju dokazivanje gljiva (F)**

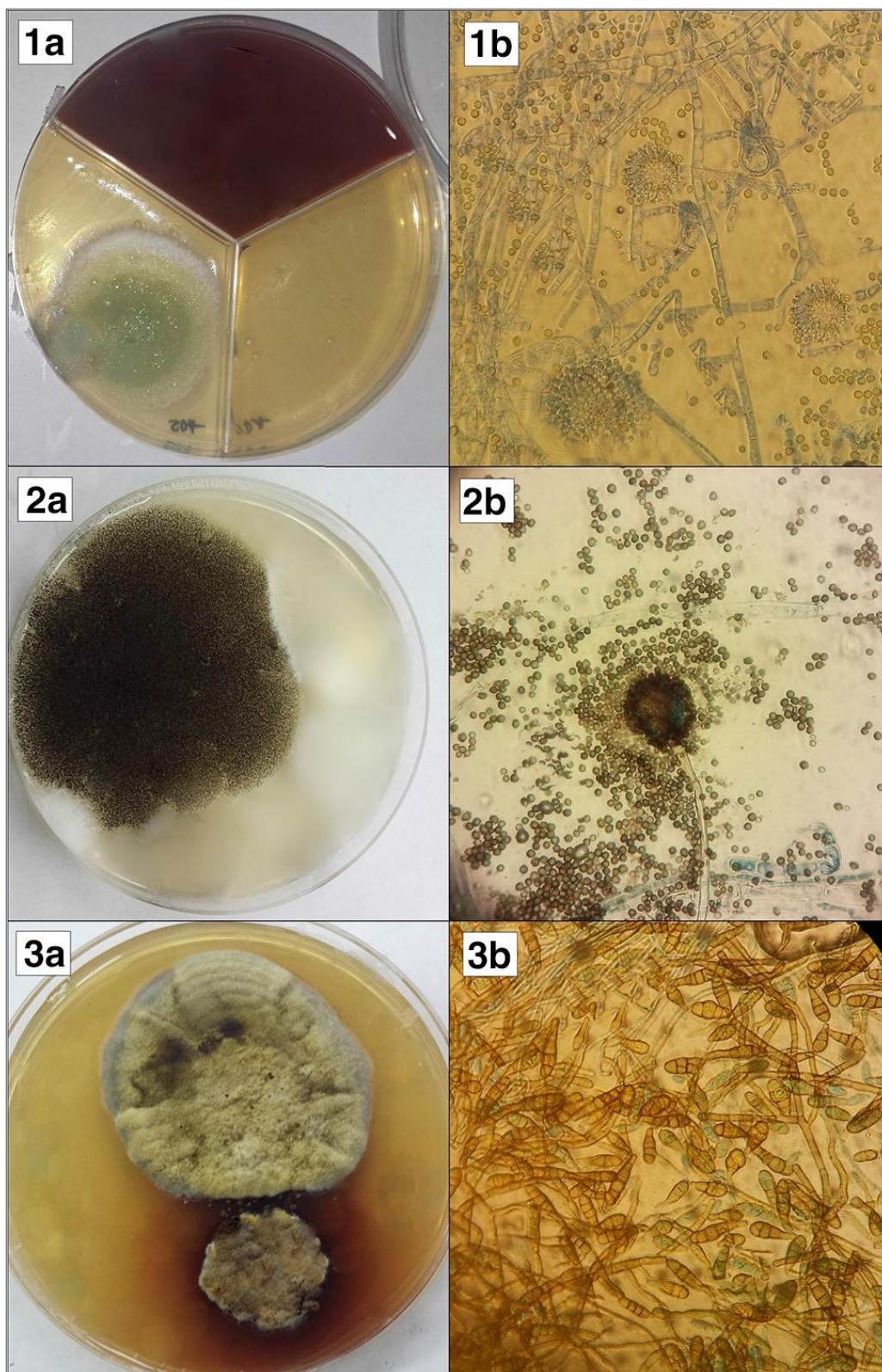
Nalaz	Metoda		
	BSN (%)	ISNS_A (%)	ISNS_L (%)
F+ (bez PT)	<b>18.5%</b>	10%	13.1%
F+ (sa PT)	5.3%	16%	<b>24.5%</b>
F- (bez PT)	81.5%	<b>90%</b>	86.9%
F- (sa PT)	<b>94.7%</b>	84%	75.5%

#### 4.2.4.4. Distribucija gljiva/fungi (F) u sinusima (n=224)

Analizom distribucije gljiva u sinusima korišćenjem metoda ISNS sa i bez PT pokazana je najveća zastupljenost gljiva roda *Aspergillus* (grafikon 2, slika 22).



**Grafikon 3. Distribucija gljiva u odnosu na vrstu uzoraka (per sinuses, procentualno)**

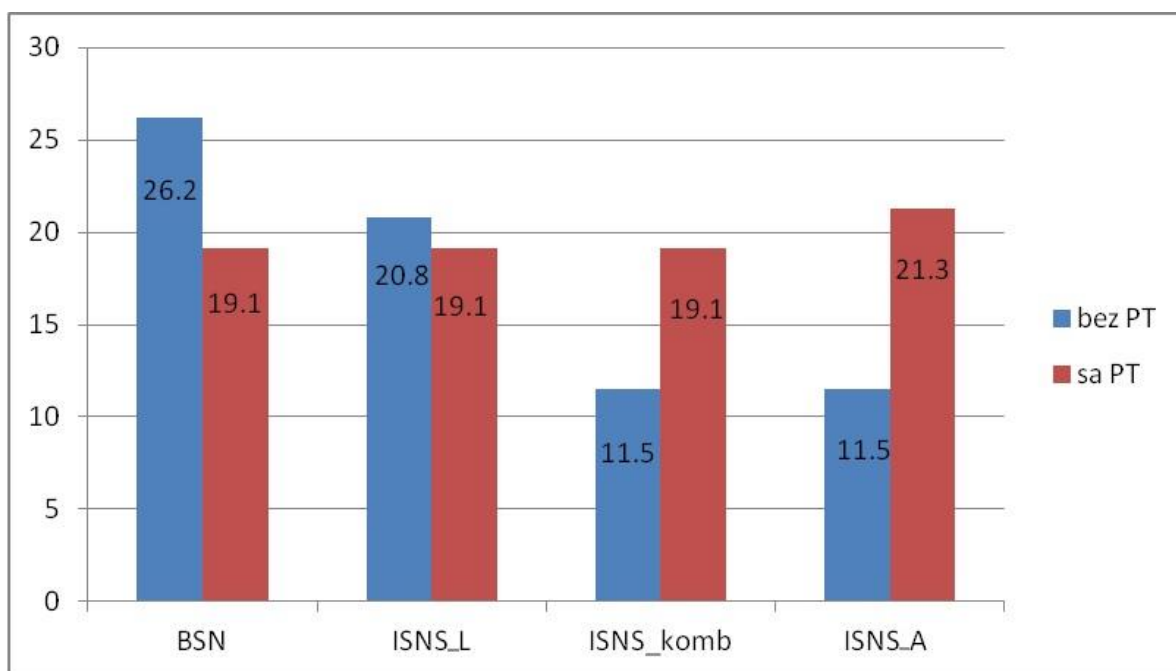


Slika 22. Makroskopski (a) i mikroskopski (b) prikaz najčešćih izolata iz ISNS\_A bojenih bojom *Lacto-phenol cotton blue*. 1a,b *Aspergillus flavus*; 2a,b *A. niger* i 3a,b *Alternaria alternata*

#### 4.2.5. Procenat pozitivnosti bakterija u odnosu na metodu i/ili kombinaciju metoda

##### 4.2.5.1. Prikaz pozitivnog nalaza bakterija (B) u sinusima korišćenjem metoda ISNS\_A, ISNS\_L, ISNS\_komb i BSN sa i bez PT

Analizom zastupljenosti bakterija u odnosu na način uzorkovanja pokazan je najveći procenat pozitivnog nalaza korišćenjem metode BSN bez PT (26.2%), ISNS\_A sa PT (21.3%) i ISNS\_L bez PT (20.8%) (grafikon 4).

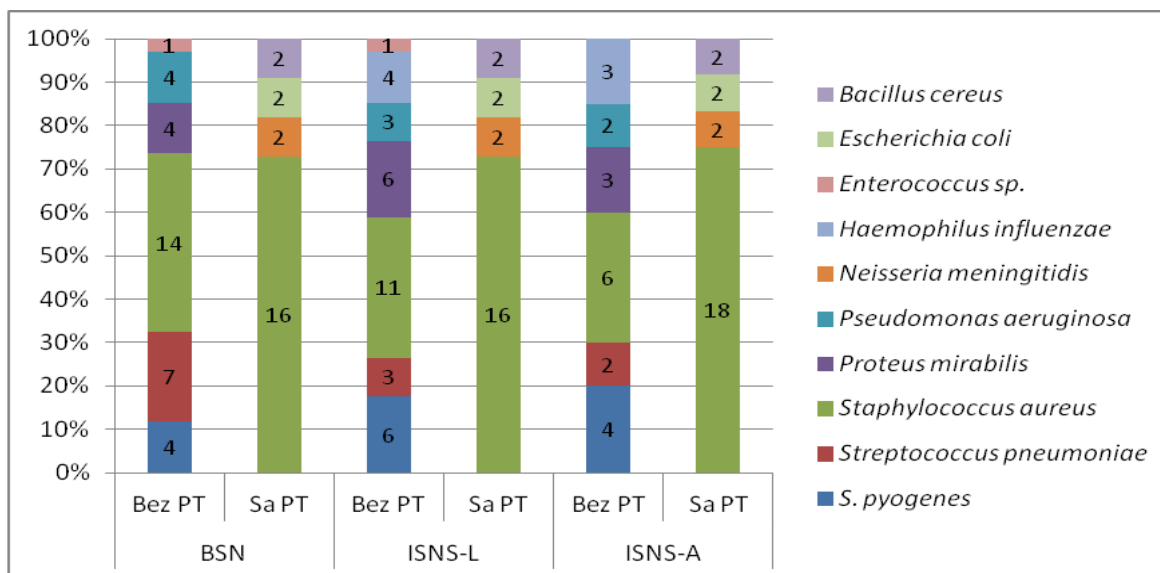


**Grafikon 4. Prikaz pozitivnog nalaza bakterija (B) u sinusima korišćenjem metoda: ISNS\_A, ISNS\_L, ISNS\_komb i BSN u zavisnosti od pretretmana (PT)**

##### 4.2.5.2. Distribucija bakterija (B) u sinusima

Analizom distribucije bakterija u sinusima korišćenjem metoda ISNS sa i bez PT pokazana je najveća zastupljenost bakterije *Staphylococcus aureus* (grafikon 5).

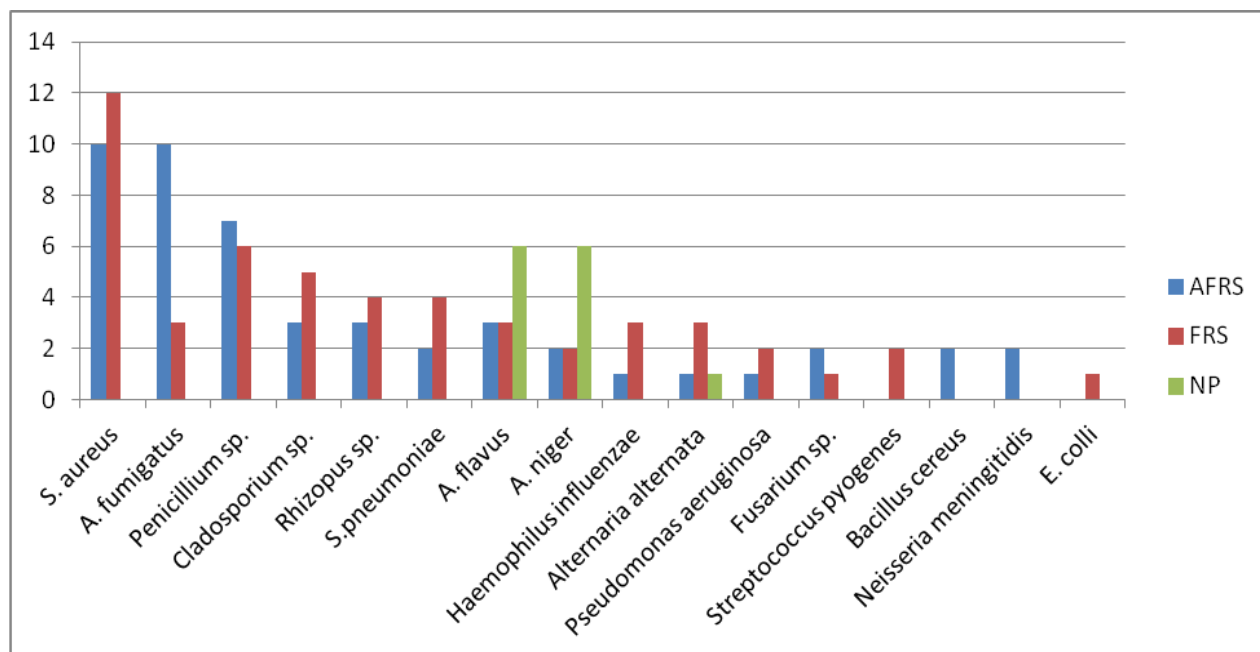




**Grafikon 5. Distribucija bakterija u odnosu na vrstu uzoraka (per sinuses, procentualno)**

#### 4.2.6. Prikaz izolata gljiva i bakterija u odnosu na grupu pacijenata sa GRS

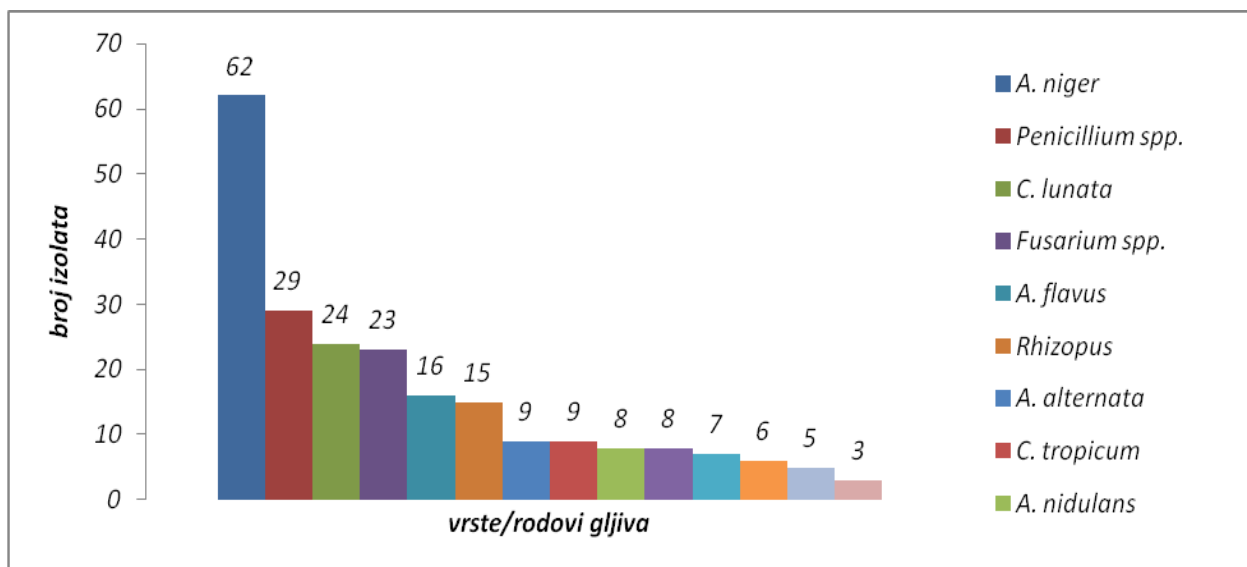
Analizom distribucije gljiva i bakterija u sinusima između grupa pacijenata sa AGRS (n=15 pacijenata), GRS (n=13) i NP operisanih FESS-om (n=43) pokazan je najveći broj izolata u grupi GRS (51 izolat). Najčešće izolovane gljive bile su *A. fumigatus* i *Penicillium spp.*, a je najčešće izolovana bakterija *S. aureus* (grafikon 6).



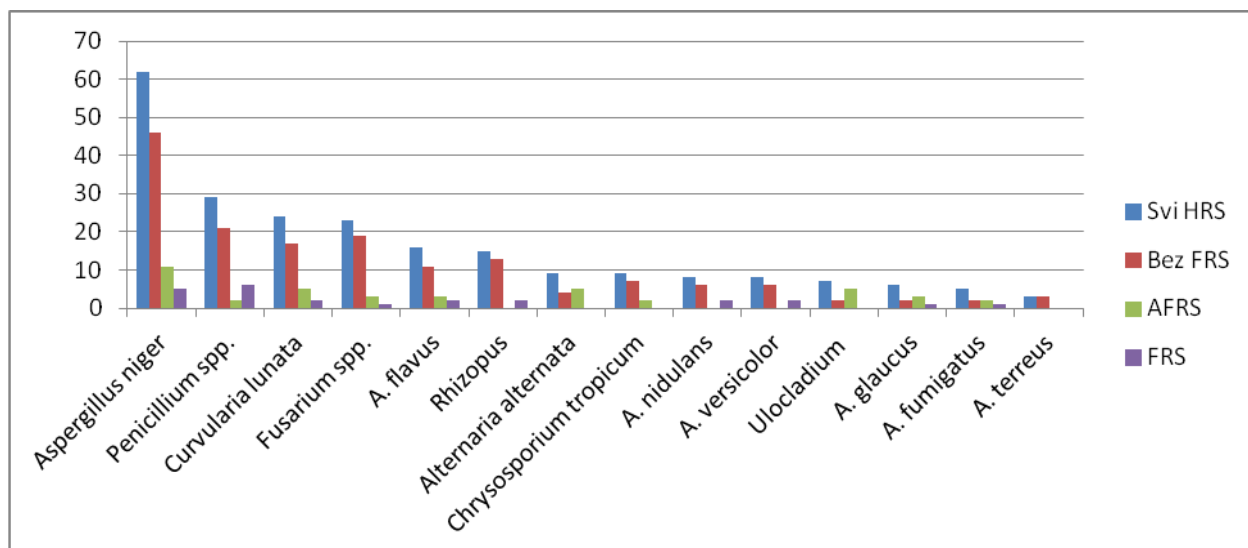
**Grafikon 6. Distribucija gljiva i bakterija u odnosu na grupe pacijenata AFRS, FRS i NP (per sinuses)**

#### 4.2.7. Distribucija vrsta i rodova gljiva u uzorku vazduha iz životnog prostora pacijenata sa HRS

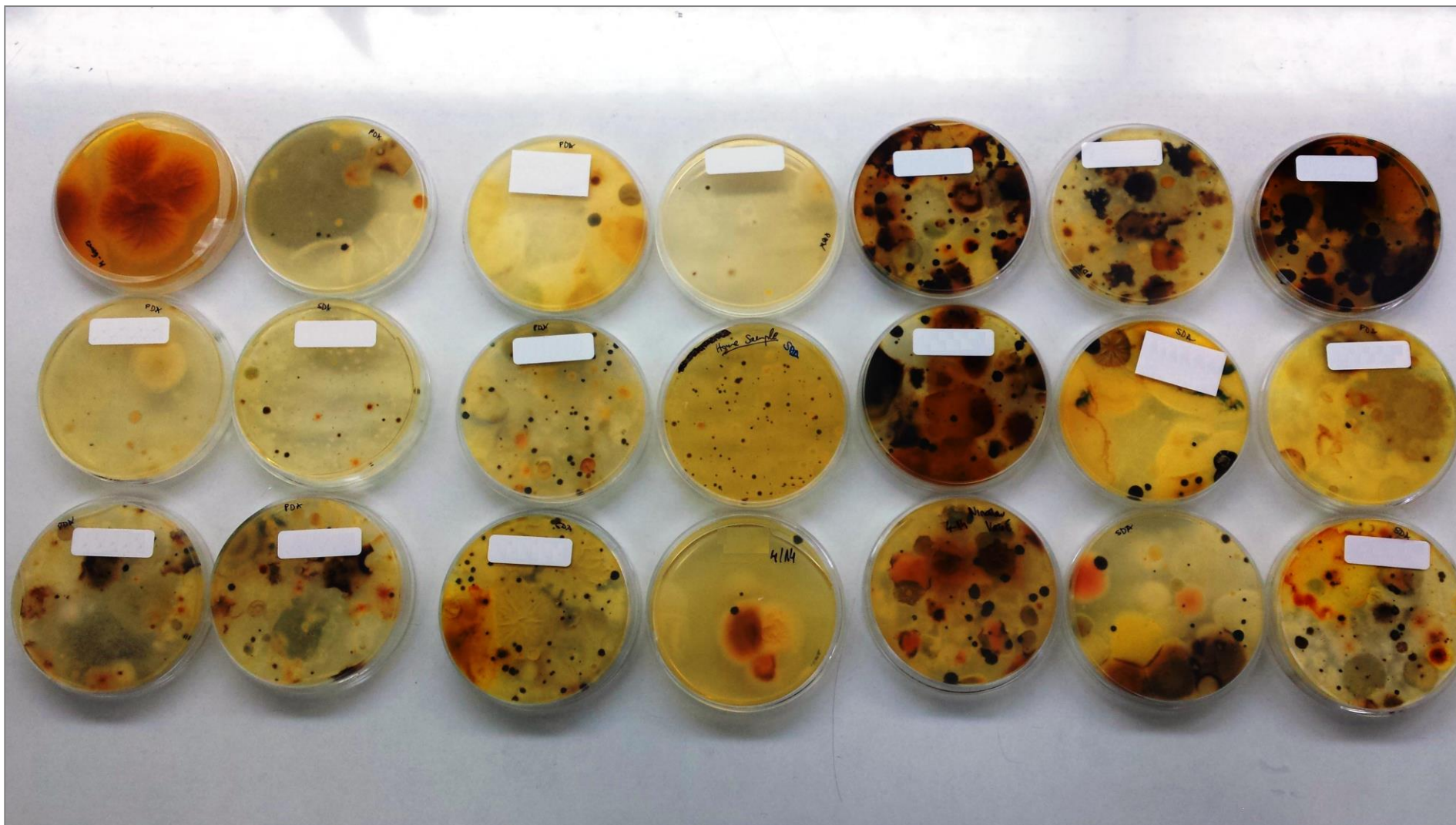
Analizom distribucije vrsta i rodova gljiva u uzorku vazduha iz životnog prostora pacijenata sa HRS pokazano je da je najčešći izolat iz vazduha *Aspergillus niger* (62/224, 27.7%) (grafikon 7 i 8, slika 23).



**Grafikon 7. Prikaz vrsta i rodova gljiva u uzorku vazduha iz životnog prostora pacijenata**



**Grafikon 8. Prikaz vrsta i rodova gljiva u uzorku vazduha iz životnog prostora pacijenata u zavisnosti od grupe: (i) svi pacijenti, (ii) pacijenti bez GRS, (iii) AGRS pacijenti i (iv) GRS pacijenti**



**Slika 23. Makroskopski prikaz najčešćih izolata iz uzoraka vazduha životnog prostora pacijenata sa HRS**

### 4.3. Karakteristike pacijenata sa HRS i određivanje težine bolesti

Kliničke karakteristike pacijenata sa HRS i težina bolesti određivane su rinoskopskim pregledom, CT pregledom, anamnestički i pomoću upitnika za merenje kvaliteta života SNOT-22 i VAS skale (prilog 2-8).

#### 4.3.1. Kliničke karakteristike neoperisanih pacijenata sa HRS i određivanje težine bolesti

Ocena simptoma HRS kao “težak” je primenom VAS skale utvrđena kod 68.4% pacijenata (93/136), dok je primenom SNOT-22 upitnika koji je grupisan u 5 dimenzija utvrđena kod 42.6% (58/136) pacijenata. SNOT-22 upitnikom, specijalizovanim za HRS, izdvojile su se kao visoko značajne 2 dimenzije: SNOT “nazalni simptomi” i SNOT “orofaringealni simptomi” (tabela 22).

**Tabela 22. Kvalitet života pacijenata sa HRS (n=136) i težina bolesti utvrđena VAS i SNOT-22 upitnicima**

KVALITET ŽIVOTA		Grupa (n, %)
		HRS neoperisani (136, 100%)
<b>VAS skor (0-10)</b>		
	Lak (0-3)	6 (4.4)
	Umeren (4-7)	37 (27.2)
	Težak (8-10)	93 (68.4)
<b>Skor prosečna težina HRS (mean±SD)</b>		6.82±1.95*
<b>SNOT-22 skoru (0-110)</b>		
	Lak (0-35)	44 (32.4)
	Umeren (36-75)	34 (25)
	Težak (76-110)	58 (42.6)
<b>Srednja ocena težine HRS (mean±SD)</b>		58.84±32.01*
<b>SNOT-22 skor (0-110) (mean±SD)</b>		
	Nazalni simptomi (0-40)**	23.48±15.64
	Orofaringealni simptomi (0-25)**	16.41±5.69
	Facijalni simptomi (0-15)	12.69±1.62
	Simptomi vezani za spavanje (0-20)	15.14±4.57
	Sistemske simptomi (0-10)	6.62±2.35

Ispitivanjem kliničkih karakteristika pacijenata utvrđeno je da je tromesečna primena lokalne kortikosteroidne terapije imala značajan pozitivan efekat na simptome bolesti HRS pacijenata (56.6%). Prisustvo NP je utvrđeno kod 41/136 pregledanih pacijenata (30%). Anamnestički je utvrđeno da je skoro 60% pacijenata nekada imalo FESS: oko 1/3 samo jednu operaciju (pFESS) i oko 2/3 više operacija (reFESS). Rinoskopskim pregledom je utvrđen “težak” HRS kod skoro polovine ispitanika (46.3%). CT pregledom su dokazane “izražene” promene u sinusima kod oko 1/3 ispitanika (36.6%). Dobijeni rezultati kliničkih karakteristika pacijenata sa HRS su prikazani u tabeli 23.

**Tabela 23. Kliničke karakteristike HRS pacijenata (n=136)**

KLINIČKE KARAKTERISTIKE		Grupa (n, %)
		HRS neoperisani (136, 100%)
<b>Efekat lokalne kortikosteroidne Th</b>		
	Značajan	77 (56.6)
	Umeren	22 (16.2)
	Odsutan	37 (27.2)
<b>NP</b>		
	Odsutni NP	95 (69.9)
	Prisutni NP	41 (30.1)
<b>FESS</b>		
	Odsutan FESS	54 (39.7)
	Prisutan FESS	25 (18.4)
	Ponovljeni FESS	57 (41.9)
<b>Rinoskopski skor (0-3)</b>		
	Lak (0)	45 (33.1)
	Umeren (1-2)	28 (20.6)
	Težak (3)	63 (46.3)
<b>CT skor*</b>		
	Bez promena (0)	31 (27.7)
	Umerene promene (1/3)	40 (35.7)
	Izražene promene ( $\geq 2/3$ )	41 (36.6)

\* CT nije urađen za grupu pacijenata koji su odustali od daljeg istraživanja (n=24)

### 4.3.2. Alergološke karakteristike pacijenata sa HRS

#### 4.3.2.1. Nalaz Eo, IgE At i inhalatornih alergena, kod HRS pacijenata

Povećane vrednosti Eo su bile prisutne kod 41/136 (30.1%) pacijenata, a od toga visoko povećane kod 26/136 (19.1%) pacijenata. Ukupna IgE At su bila pozitivna kod 25/136 (18.4%) pacijenta, a od toga 8/136 (5.9%) visoko pozitivna. Specifična anti-gljivična IgE At su bila pozitivna kod 34/136 (25%) pacijenta, a od toga kod 15/136 (11%) visoko pozitivna

(tabela 24). Inhalatorni alergeni (SPT) su bili pozitivni kod 81/136 (59.6%) pacijenata, a od toga 1-2 alergena kod 52/136 (38.2%), a 3 ili više alergena kod 29/136 (21.3%). Kod ispitanika su polen (41.9%) i grinje (18.4%) bili dominantni alergeni. Najčešće pozitivni inhalatorni alergeni su bili: iz grupe polena *Olea europea* (14.7%) i *Phleum pretense* (13.2%), iz grupe plesni *Alternaria* (11.8%) i iz grupe grinja *Dermatophagoides farina* (11.8%) (tabele 24 i 25).

**Tabela 24. Nalaz Eo, IgE At i inhalatornih alergena kod HRS pacijenata (n=136)**

ALERGOLOŠKE KARAKTERISTIKE		Grupa (n, %) HRS neoperisani (136, 100%)
<b>Eo (mm<sup>3</sup>)</b>		
	Negativan	95 (69.9)
	Pozitivan (>350)	15 (11)
	Visoko pozitivan (>500)	26 (19.1)
Prosečna vrednost Eo (mean±SD)		205.9±264.29
<b>Ukupna IgE At (IU/ml)</b>		
	Negativan	111 (81.6)
	Pozitivan (>100)	17 (12.5)
	Visoko pozitivan (>1000)	8 (5.9)
Prosečna vrednost ukupnih IgE At (mean±SD)		160.51±367.63
<b>Specifična IgE At (IU/ml)</b>		
Negativno (0 do 0.35)*		102 (75)
Umereno značajno (0.35 do 3.5)#		19 (14)
Visokoznačajno (3.5 do ≥100) <sup>α</sup>		15 (11)
<b>Inhalatorni alergeni</b>		
	Negativan	55 (40.4)
	Pozitivan 1-2 alergena	52 (38.2)
	Pozitivan 3-15 alergena	29 (21.3)
<b>SPT grinje</b>		
	Negativan	111 (81.6)
	Pozitivan	25 (18.4)
<b>SPT polen</b>		
	Negativan	79 (58.1)
	Pozitivan	57 (41.9)
<b>SPT plesni</b>		
	Negativan	114 (83.8)
	Pozitivan	22 (16.2)
<b>SPT dlaka</b>		
	Negativan	124 (91.2)
	Pozitivan	12 (8.8)

**Tabela 25. Grupe i vrste inhalatornih alergena kod HRS pacijenata (n=136)**

ALERGENI		Grupa (n, %) HRS neoperisani (136, 100%)	
Grupe	Pozitivan nalaz	Vrste alergena	Pozitivan nalaz
Grinje	25 (18.4)		
		<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	15 (11)
		<i>Dermatophagoides farinae</i>	16 (11.8)
Polen	57 (41.9)		
		<i>Betula verucosa</i>	15 (11)
		<i>Olea europea</i>	20 (14.7)
		<i>Cupressus arizonica</i>	5 (3.7)
		<i>Phleum pratense</i>	18 (13.2)
		<i>Ambrosia artemisifolia</i>	15 (11)
		<i>Artemisia vulgaris</i>	8 (5.9)
Plesni	22 (16.2)		
		<i>Alternaria</i>	16 (11.8)
		<i>Penicillium notatum</i>	2 (1.5)
		<i>Cladosporium herbarum</i>	5 (3.7)
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	14 (10.3)
Dlaka	12 (8.8)		
		<i>Horse dander</i>	0 (0)
		<i>Cat hair</i>	7 (5.1)
		<i>Dog hair</i>	5 (3.7)

#### 4.3.3. Utvrđivanje povezanosti kliničkih i alergoloških karakteristika HRS pacijenata sa nalazom gljiva

##### 4.3.3.1. Povezanost kliničkih karakteristike operisanih pacijenata (FESS grupa) i nalaza gljiva

Kliničke karakteristike pacijenata iz FESS grupe kao i podatak o prisustvu komorbiditeta su dobijeni anamnestički, dok težina HRS nije određivana kod ove grupe pacijenata. Pacijenti sa re-FESS-om su statistički značajno češće imali pozitivan nalaz gljiva u tkivu NP ( $p=0.01$ ). FESS<sub>F+</sub> pacijenti su češće imali jednostrane NP (7/10, 70%), a kao najčešće komorbiditete astmu i AI (tabela 26).

**Tabela 26. Povezanost kliničkih karakteristika pacijenata sa FESS-om (n=43) i nalaza gljiva**

Parametri		Grupa (n, %)		p
		FESS <sub>F+</sub> (33, 76.7%)	FESS <sub>F-</sub> (10, 23.3%)	
FESS	reFESS (n=19)	11/19 (57.9)	8/19 (42.1)	**0.01
	pFESS (n=24)	22/24 (91.7)	2/24 (8.3)	
NP	Jednostrani	24 (72.7)	7 (70)	0.866
	Obostrani	9 (27.3)	3 (30)	
Komorbiditeti	Astma	16 (48.5)	5 (50.0)	0.933
	SPT+	6 (18.2)	1 (10.0)	0.539
	AI	9 (27.3)	5 (50.0)	0.179

\*Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ; \*\*Hi-kvadrat test,  $p < 0.05$ , statistički značajna razlika.

#### **4.3.3.2. Povezanost kvaliteta života i težine bolesti neoperisanih pacijenata (HRS grupa) i nalaza gljiva**

Izvršeno je ispitivanje povezanosti kliničkih i alergoloških karakteristika HRS pacijenata sa nalazom gljiva u sinusima između grupa HRS<sub>F+</sub> i HRS<sub>F-</sub> u cilju dobijanja statističke značajnosti.

Prema SNOT-22 upitniku, tvrđeno je da HRS<sub>F+</sub> pacijenti češće imaju “težak HRS” ( $p=0.000$ ) kao i značajno viši ukupan SNOT-22 skor ( $p=0.000$ ). Međutim, analizom svake od 5 dimenzija SNOT-a, pokazana je statistička značajnost samo za 2 dimenzije: SNOT-nazalni simptomi i SNOT-orofaringealni simptomi (tabela 27).



**Tabela 27. Povezanost kvaliteta života i težine bolesti neoperisanih pacijenata sa HRS (n=112) i nalaza gljiva**

KVALITET ŽIVOTA		Grupa (n, %)			
Težina HRS		HRS <sub>PT+</sub> i HRS <sub>PT-</sub> (112, 100%)	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	p
<b>VAS skor (0-10)</b>					0.2
	Lak (0-3)	3 (26.8)	2 (2.4)	1 (3.6)	
	Umeren (4-7)	31 (27.7)	29 (34.5)	2 (7.1)	
	Težak (8-10)	78 (69.5)	53 (63.1)	25 (89.3)	
<b>Skor prosečna težina HRS (mean±SD)</b>					0.3
		6.91±1.97	6.68±2.02	7.61±1.66	
<b>SNOT-22 skor (0-110)</b>					<b>*0.000</b>
	Lak (0-35)	37 (33)	37 (44)	0 (0)	
	Umeren (36-75)	28 (25)	24 (28.6)	4 (14.3)	
	Težak (76-110)	47 (42)	23 (27.4)	<b>24 (85.7)</b>	
<b>Srednja ocena težine HRS (mean±SD)</b>					<b>**0.000</b>
		59.08±32.18	49.71±30.2	<b>87.18±19.05</b>	
<b>Dimenzije SNOT-22</b>					
<b>Skor (mean±SD)</b>					
	Nazalni simptomi (0-40)	23.48±15.64	8.1±7.8	<b>15.38±9.24</b>	<b>**0.000</b>
	Orofaringealni simptomi (0-25)	16.41±5.69	6.21±2.69	10.21±4.39	<b>**0.000</b>
	Facijalni simptomi (0-15)	12.69±1.62	5.96±2.71	6.73±2.82	0.879
	Simptomi vezani za spavanje (0-20)	15.14±4.57	7.44±3.45	8.0±4.34	0.777
	Sistemske simptomi (0-10)	6.62±2.35	4.33±1.70	2.29±0.98	0.348

\*Hi-kvadrat; \*\*T-test, statistički značajna razlika

#### **4.3.2.3. Povezanost kliničkih karakteristika neoperisanih pacijenata sa HRS i nalaza gljiva**

U poređenju sa HRS<sub>F-</sub> grupom, HRS<sub>F+</sub> pacijenti su statistički značajno češće imali lošiji efekat na tromesečnu lokalnu kortikosteroidnu terapiju (p=0.000), češće prisustvo NP (p=0.000) i više prethodnih operacija sinusa (reFESS) (p=0.000). Rinoskopski skor, koji je ukazivao na češće prisustvo teškog oblika HRS, je statistički značajno bio viši u grupi HRS<sub>F+</sub> (p=0.000), a CT analiza promena u sinusima je pokazala "izraženije" promene kod HRS<sub>F+</sub> pacijenata (p=0.000) (tabela 28).

**Tabela 28. Povezanost kliničkih karakteristika neoperisanih pacijenata sa HRS (n=112) i nalaza gljiva**

KLINIČKE KARAKTERISTIKE	Grupa (n, %)			p
	HRS <sub>PT+</sub> i HRS <sub>PT-</sub> (112, 100%)	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Efekat lokalne kortikosteroidne Th</b>				<b>*0.000</b>
Značajan	62 (55.4)	56 (66.6)	6 (21.4)	
Umeren	19 (17)	13 (15.5)	6 (21.4)	
Odsutan	31 (27.6)	15 (17.9)	<b>16 (57.2)</b>	
<b>NP</b>				<b>*0.000</b>
Odsutni NP	79 (70.5)	65 (77.4)	14 (50)	
Prisutni NP	33 (29.5)	19 (22.6)	<b>14 (50)</b>	
<b>FESS</b>				<b>*0.000</b>
Odsutan FESS	42 (37.5)	39 (46.4)	3 (10.7)	
Prisutan FESS	20 (17.9)	17 (20.3)	3 (10.7)	
Ponovljeni FESS	50 (44.6)	28 (33.3)	<b>22 (78.6)</b>	
<b>Rinoskopski skor (0-3)</b>				<b>*0.000</b>
Lak HRS (0)	34 (30.4)	33 (39.3)	1 (3.6)	
Umeren HRS (1-2)	20 (17.6)	18 (21.4)	2 (7.1)	
Težak HRS (3)	58 (52)	33 (39.3)	<b>25 (89.3)</b>	
<b>CT skor</b>				<b>*0.000</b>
Bez promena (0)	31 (29.5)	29 (38.1)	2 (3.6)	
Umerene promene (1/3)	40 (36.6)	37 (46.4)	3 (7.1)	
Izražene promene (≥2/3)	41 (33.9)	18 (15.5)	<b>23 (89.3)</b>	

\*Hi-kvadrat; \*\*T-test, statistički značajna razlika

#### 4.3.2.4. Povezanost Eo, IgE At i inhalatornih alergena neoperisanih pacijenata sa HRS i nalaza gljiva

Povišene vrednosti Eo su statistički značajno češće bile prisutne kod HRS<sub>F+</sub> pacijenata (p=0.000), kao i nalaz ukupnih IgE At (p=0.000), odnosno specifičnih anti-gljivična IgE At (p=0.000) (tabela 29). U poređenju sa HRS<sub>F-</sub> grupom, HRS<sub>F+</sub> pacijenti su statistički značajno češće imali pozitivan nalaz na ukupne inhalatorne alergene (SPT) (p=0.000), posebno na grupe alergena: polena (p=0.000) i plesni (p=0.000). U grupi HRS<sub>F+</sub> statistički značajno češće su bile pozitivne vrste alergena: iz grupe polena *Phleum pretense* (p=0.002), iz grupe plesni *Alternaria* (p=0.011) (tabela 30).

**Tabela 29. Povezanost Eo, IgE At nalaza i inhalatornih alergena, kod neoperisanih HRS pacijenata (n=112) sa nalazom gljiva**

ALERGOLOŠKE KARAKTERISTIKE		Grupa (n, %)			p
		HRS <sub>PT+</sub> i HRS <sub>PT-</sub> (112, 100%)	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Eo (mm<sup>3</sup>)</b>					<b>*0.000</b>
	Negativan	75 (67)	66 (78.6)	9 (32.1)	
	Pozitivan (>350)	12 (10.7)	10 (11.9)	2 (7.1)	
	Visoko pozitivan (>500)	25 (22.3)	8 (9.5)	<b>17 (60.8)</b>	
<b>Prosečna vrednost Eo (mean±SD)</b>		216.9±274.32	144.27±191.55	<b>434.79±361.83</b>	<b>**0.000</b>
<b>Ukupna IgE At (IU/ml)</b>					<b>*0.000</b>
	Negativan	88 (78.6)	75 (89.3)	13 (46.4)	
	Pozitivan (>100)	16 (14.3)	9 (10.7)	7 (25)	
	Visoko pozitivan (>1000)	8 (7.1)	0 (0)	<b>8 (28.6)</b>	
<b>Prosečna vrednost ukupnih IgE At (mean±SD)</b>		184.0±401.19	69.26±161.85	<b>528.21±646.01</b>	<b>**0.000</b>
<b>Specifična anti-gljivična IgE At (IU/ml)</b>					<b>*0.001</b>
	Negativno (0 do 0.35)*	78 (69.6)	63 (75)	15 (53.6)	
	Umereno značajno (0.35 do 3.5)#	19 (17)	16 (19)	3 (10.7)	
	Visokoznačajno (3.5 do ≥100) <sup>‡</sup>	15 (13.4)	5 (6)	<b>10 (35.7)</b>	
<b>Inhalatorni alergeni (SPT)</b>					
<b>SPT</b>					<b>0.000</b>
	Negativan	46 (41)	45 (53.6)	1 (35.6)	
	Pozitivan 1-2	41 (36.6)	28 (33.3)	13 (46.4)	
	Pozitivan 3-15	25 (22.4)	11 (13.1)	<b>14 (50)</b>	
<b>SPT grinje</b>					0.124
	Negativan	91 (81.3)	71 (84.5)	20 (71.4)	
	Pozitivan	21 (18.7)	13 (15.5)	8 (28.6)	
<b>SPT polen</b>					<b>*0.000</b>
	Negativan	65 (58.1)	57 (67.9)	8 (28.6)	
	Pozitivan	47 (41.9)	27 (32.1)	<b>20 (71.4)</b>	
<b>SPT plesni</b>					<b>*0.000</b>
	Negativan	96 (85.7)	78 (92.9)	18 (64.3)	
	Pozitivan	16 (14.3)	6 (7.1)	<b>10 (35.7)</b>	
<b>SPT dlaka</b>					0.099
	Negativan	101 (90.2)	78 (92.9)	23 (82.1)	
	Pozitivan	11 (9.8)	6 (7.1)	5 (17.9)	

\* Hi-kvadrat test; \*\* T- test; statistički značajna razlika

**Tabela 30. Poređenje grupa i vrsta inhalatornih alergena kod neoperisanih HRS pacijenata (n=112) i nalaza gljiva**

POZITIVAN NALAZ ALERGENA		Grupa (n, %)			p
Grupe	Vrste alergena	HRS <sub>PT+</sub> i HRS <sub>PT-</sub> (112, 100%)	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
Grinje		20 (17.9)	15 (17.9)	5 (17.8)	0.240
	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	11 (9.8)	8 (9.5)	3 (10.7)	0.121
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	12 (10.7)	10 (11.9)	2 (7.1)	0.988
Polen		47 (41.9)	27 (32.1)	<b>20 (71.4)</b>	<b>*0.000</b>
	<i>Betula verucosa</i>	11 (9.8)	9 (10.7)	2 (7.1)	0.544
	<i>Olea europea</i>	20 (17.9)	15 (17.9)	5 (17.8)	0.240
	<i>Cupressus arizonica</i>	5 (4.5)	2 (2.4)	3 (10.7)	0.711
	<i>Phleum pratense</i>	15 (13.4)	9 (10.7)	<b>6 (21.4)</b>	<b>*0.002</b>
	<i>Ambrosia artemisifolia</i>	10 (8.9)	8 (9.5)	2 (7.1)	0.094
	<i>Artemisia vulgaris</i>	8 (7.1)	6 (7.1)	2 (7.1)	0.781
Plesni		16 (14.3)	6 (7.1)	<b>10 (35.7)</b>	<b>*0.000</b>
	<i>Alternaria</i>	14 (12.5)	9 (10.7)	5 (17.8)	<b>*0.011</b>
	<i>Penicillium notatum</i>	2 (1.8)	1 (1.2)	1 (3.6)	0.084
	<i>Cladosporium herbarum</i>	5 (4.5)	3 (3.6)	2 (7.1)	0.124
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4 (12.5)	2 (2.4)	2 (7.1)	0.322
Dlaka		11 (9.8)	6 (7.1)	5 (17.9)	0.099
	<i>Horse dander</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.112
	<i>Cat hair</i>	4 (3.6)	3 (3.6)	1 (3.6)	0.122
	<i>Dog hair</i>	3 (2.7)	2 (2.4)	1 (3.6)	0.114

\* Hi-kvadrat test; statistički značajna razlika

#### 4.3.3. Multivarijantna regresiona analiza kliničkih i alergoloških kriterijuma za predikciju GRS

U cilju razvijanja kliničkih kriterijuma za **predikciju GRS** je urađena regresiona analiza kliničkih i alergoloških parametara poređenjem dobijenih rezultata za HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupe. RA je pokazala statističku značajnost za: SNOT-nazalni simptomi, SNOT-orofaringelani simptomi, odsustvo efekta nakon  $\geq 3$  meseca lokalne kortikosteroidne terapije, težak HRS ocenjen rinoskopskim nalazom, prisustvo NP, reFESS, pozitivan SPT na više od 2 inhalatorna alergena, CT sinusa sa izraženim promenama u  $\geq 2/3$  (zadebljanje sluznice i/ili ispunjenost sinusa), visok broj Eo u krvi, visok nivo ukupnih IgE At i nalaz anti-gljivičnih specifičnih IgE At klase od 3 do 6 (tabele 31-40).

#### 4.3.3.1. Subjektivna ocena težine hroničnog rinosinuzitisa (HRS) i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke, na koje je primenjena regresiona analiza, utvrđeni su “potencijalni indikatori” subjektivne težine HRS za **predikciju GRS**. Dobijeni rezultati su pokazali statističku značajnost za skor “težak HRS” i za ukupni SNOT-22, kao i za 2 pojedinačne dimenzije (SNOT-nazalni i SNOT-orofaringealni simptomi). Imajući u vidu da ove 2 dimenzije čine veći deo SNOT-22 upitnika, da sadrže ključne podatke za HRS i da imaju veću praktičnu primenu, skor “težak HRS” (SNOT-nazalni ili SNOT-orofaringealni) je izdvojen kao statistički značajan anamnestički parametar za **predikciju GRS** (tabela 31).

**Tabela 31. Povezanost i regresiona analiza za SNOT-nazalni i SNOT-orofaringealni simptomi za subjektivnu ocenu težine hroničnog rinosinuzitisa (HRS) između grupa HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28)**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>SNOT-nazalni simptomi (0-40)</b>			<b>*0.000</b>
lak HRS (0-12)	35 (41.7)	0 (0)	
umeren HRS (13-25)	20 (23.8)	5 (17.9)	
težak HRS (26-40)	29 (34.5)	<b>23 (82.1)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.833</b>

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>SNOT-orofaringealni simptomi (0-25)</b>			<b>*0.000</b>
lak HRS (0-7)	29 (34.5)	0 (0)	
umeren HRS (8-15)	32 (38.1)	6 (21.4)	
težak HRS (16-25)	23 (27.4)	<b>22 (78.6)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.831</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.2. Efekat lokalne kortikosteroidne Th<sub>≥3</sub> meseca i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke dobijene za efekat lokalne kortikosteroidne Th  $\geq 3$  meseca, kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, na koje je primenjena regresiona analiza, skor “bez efekta” se izdvojio kao visoko statistički značajan za **predikciju GRS** (tabela 32).

**Tabela 32. Povezanost i regresiona analiza efekta lokalne kortikosteroidne Th  $\geq 3$  meseca između HRS HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Efekat lokalne kortikosteroidne terapije</b>			<b>*0.000</b>
Značajan	56 (66.6)	6 (21.4)	
Umeren	13 (15.5)	6 (21.4)	
Odsutan	15 (17.9)	<b>16 (57.2)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.512</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.3. Klinička ocena težine hroničnog rinosinuzitisa (HRS) i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke za rinoskopski skor “**težak HRS**” kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, na koje je primenjena regresiona analiza, ovaj skor se izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 33).

**Tabela 33. Povezanost i regresiona analiza i kliničke ocene težine HRS između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Rinoskopski skor (0-3)</b>			<b>*0.000</b>
Lak HRS (0)	33 (39.3)	1 (3.6)	
Umeren HRS (1-2)	18 (21.4)	2 (7.1)	
Težak HRS (3)	33 (39.3)	<b>25 (89.3)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>1.000</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.4. Nazalna polipoza (NP) i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke za NP kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, primenom regresione analize se skor “**reNP/>5 god HRS**” izdvojio kao visoko statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 34).

**Tabela 34. Povezanost i regresiona analiza za NP između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>NP</b>			<b>*0.000</b>
Odsustvo NP	31 (36.9)	10 (35.7)	
Prisustvo NP	0 (0)	0 (0)	
Rekalitrantna NP/>5 god HRS	53 (63.1)	18 (64.3)	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>1.000</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.5. Funkcionalna endoskopska hirurgija sinusa (FESS) i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke za FESS kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, primenom regresione analize, skor “reFESS” se izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju FRS** (tabela 35).

**Tabela 35. Povezanost i regresiona analiza za FESS-a između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>FESS</b>			<b>*0.000</b>
Odsustvo FESS	39 (46.4)	3 (10.7)	
Prisustvo FESS	17 (20.3)	3 (10.7)	
Više od 1 prethodnog FESS	28 (33.3)	<b>22 (78.6)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.869</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.6. Inhalatorni alergeni (IA) i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke za IA kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, primenom regresione analize, skor “pozitivan>3” se izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 36).

**Tabela 36. Povezanost i regresiona analiza za inhalatorne alergene (IA) između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
SPT			<b>*0.000</b>
Negativan	45 (53.6)	1 (35.6)	
Pozitivan 1-2	28 (33.3)	13 (46.4)	
Pozitivan 3-15	11 (13.1)	<b>14 (50)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.595</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.7. CT skor za procenu ispunjenosti maksilarnih sinusa i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (FRS)

U odnosu na dobijene vrednosti CT skora za procenu ispunjenosti maksilarnih sinusa kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, primenom regresione analize, se **rezultat “izražene promene, 66-100% zauzetosti sinusa”** izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 37).

**Tabela 37. Povezanost i regresiona analiza za CT skor za procenu ispunjenosti sinusa između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>CT sinus-skor za procenu ispunjenosti sinusa</b>			<b>*0.000</b>
Bez promena	29 (38.1)	2 (3.6)	
Umerene promene	37 (46.4)	3 (7.1)	
Izražene promene	18 (15.5)	<b>23 (89.3)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.869</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.8. Broj eozinofila (Eo) u krvi i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke dobijene za broj eozinofila (Eo) u krvi kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, primenom regresione analize, **skor “visoko pozitivan (>500)”** se izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 38).



**Tabela 38. Povezanost i regresiona analiza za broj Eo između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Eo (mm<sup>3</sup>)</b>			<b>*0.000</b>
Negativan	66 (78.6)	9 (32.1)	
Pozitivan (>350)	10 (11.9)	2 (7.1)	
Visoko pozitivan (>500)	8 (9.5)	<b>17 (60.8)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.000</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.310</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.9. Ukupni IgE At i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke za ukupni IgE At grupa HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub>, primenom regresione analize, skor “**visoko pozitivan (>1000)**” se izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 39).

**Tabela 39. Povezanost i regresiona analiza za ukupna IgE At između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Ukupna IgE At (IU/ml)</b>			<b>*0.001</b>
Negativan	75 (89.3)	13 (46.4)	
Pozitivan (>100)	9 (10.7)	7 (25)	
Visoko pozitivan (>1000)	0 (0)	<b>8 (28.6)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.001</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.714</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

#### 4.3.3.10. Specifična anti-gljivična IgE At i predikcija gljivičnog rinosinuzitisa (GRS)

U odnosu na ordinalne podatke za specifična anti-gljivična IgE At kod HRS<sub>F-</sub> i HRS<sub>F+</sub> grupa, primenom regresione analize, skor “**izražena preosetljivost**” se izdvojio kao statistički značajan klinički parametar za **predikciju GRS** (tabela 40).

**Tabela 40. Povezanost i regresiona analiza za specifična anti-gljivična IgE At između HRS<sub>F-</sub> (n=84) i HRS<sub>F+</sub> (n=28) grupa**

Varijabla	Grupa (n, %)		p
	HRS <sub>F-</sub> (84, 75%)	HRS <sub>F+</sub> (28, 25%)	
<b>Specifična anti-gljivična IgE At (IU/ml)</b>			<b>*0.000</b>
Negativan (klasa 0)	63 (75)	15 (53.6)	
Umerena preosetljivost (klase 1 i 2)	16 (19)	3 (10.7)	
Izražena preosetljivost (klase 3 do 6)	5 (6)	<b>10 (35.7)</b>	
<b>Regresiona analiza</b>			<b>**0.001</b>
<b>Koeficijent determinacije R<sup>2</sup></b>			<b>0.310</b>

\* Hi-kvadrat test, \*\*Regresiona analiza

Na osnovu dobijenih rezultata, 10 kriterijuma (skorova) prikazanih u delu 3.4. su izdvojeni kao ključni anamnesički i klinički parametri za **predikciju GRS**.

#### **4.3.4. Definisane kriterijuma, indeks sistema i algoritma za kliničku predikciju GRS**

U cilju evaluacije nove metode ISNS za dokazivanje gljiva u sinusima (poglavlje 4.3.) formiran je algoritam za kliničku predikciju GRS. Zbog različitih numeričkih i/ili opisnih vrednosti skorova izvršeno je uvođenje indeks sistema.

##### **4.3.4.1. Indeks sistem za kriterijume za kliničku predikciju GRS**

Za numeričko uniformisanje kriterijuma oformljen je **GRS<sub>indeks</sub> 0, 1 i 2**. Svih 10 kriterijuma koji su se izdvojili kao značajni anamnestički i klinički parametri za **predikciju GRS** su prikazani tabeli 41.

**Tabela 41. Definisanje GRS<sub>index</sub>-a za izdvojene skorove**

<b>SNOT-22 (0-110)</b>		<b>Efekat lokalne kortikosteroidne Th (≥3 meseca)</b>	
<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>	<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>
lak (0-35)	<b>0</b>	Značajan (0)	<b>0</b>
umeren (36-75)	<b>1</b>	Umeren (1)	<b>1</b>
težak (76-110)	<b>2</b>	Bez efekta (2)	<b>2</b>
<b>Rinoskopski nalaz</b>		<b>NP</b>	
<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>	<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>
lak (0-1)	<b>0</b>	Odsustvo NP (0)	<b>0</b>
umeren (2)	<b>1</b>	Prisustvo NP (1)	<b>1</b>
težak (3)	<b>2</b>	Rekalcitrantna NP (2)	<b>2</b>
<b>FESS</b>		<b>Inhalatorni SPT (15 alergena)</b>	
<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>	<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>
Odsustvo FESS (0)	<b>0</b>	Negativni svi (0)	<b>0</b>
Prisustvo FESS (1)	<b>1</b>	Pozitivan 1 do 2 alergena (1)	<b>1</b>
<b>Više od 1 prethodni FESS (2)</b>	<b>2</b>	<b>Pozitivan 3 do 15 alergena (2)</b>	<b>2</b>
<b>CT skor za procenu ispunjenosti maksilarnih sinusa</b>		<b>Broj Eo u krvi</b>	
<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>	<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>
Bez promena (0)	<b>0</b>	Negativan (0)	<b>0</b>
Promene .0-66% (1)	<b>1</b>	Pozitivan (1)	<b>1</b>
<b>Promene 66-100% (2)</b>	<b>2</b>	Visoko pozitivan (2)	<b>2</b>
<b>Ukupna IgE At</b>		<b>Specifična anti-gljivična IgE At</b>	
<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>	<b>Skor</b>	<b>Indeks</b>
Negativan (0)	<b>0</b>	Negativan (0)	<b>0</b>
Pozitivan (1)	<b>1</b>	Umerena preosetljivost (1)	<b>1</b>
Visoko pozitivan (2)	<b>2</b>	Izražena preosetljivost (2)	<b>2</b>

#### 4.3.5. Definisanje algoritma za kliničku predikciju GRS

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz literature predložen je algoritam za kliničku predikciju GRS (tabela 42). Kod HRS pacijenata kod kojih je ispitano svih 10 GRS kriterijuma, GRS je klinički visoko suspektan kod pacijenata koji imaju **GRS<sub>index</sub>2 (skor 2 na ≥ 5 kriterijuma)**.

**Tabela 42. Algoritam za kliničku predikciju GRS**

	<b>KRITERIJUM</b>	<b>SKOR</b>	<b>INDEX</b>
1.	<b><u>SNOT-22</u></b> (max 110) HRS lak (0-35) HRS umeren (36-75) HRS težak (76-110)	lak (0-35) umeren (36-75) težak (76-110)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
2.	<b><u>Efekat lokalne kortikosteroidne Th, ≥3 meseca</u></b> Značajno smanjenje simptoma nakon Th (0) Umereno smanjenje simptoma nakon Th (1) Bez smanjenja simptoma nakon Th (2)	Značajan efekat Th (0) Umeren efekat Th (1) Bez efekta Th (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
3.	<b><u>Rinoskopski klinički nalaz:</u></b> HRS lak (0) HRS umeren (1-2) HRS težak (3)	lak (0-1) umeren (2) težak (3)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
4.	<b><u>Prisustvo NP</u></b> Odsutni NP (0) Prisutni NP (1) Rekalcitrantna NP (2)	NP- (0) NP+ (1) reNP (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
5.	<b><u>Prisustvo FESS</u></b> Odsustvo FESS (0) Prisustvo FESS (1) Više od 1 prethodni FESS (2)	FESS- (0) FESS+ (1) reFESS (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
6.	<b><u>SPT inhalatorni alergeni</u></b> Negativni svi (0) Pozitivna do 2 (1) Pozitivna od 3 do 15 (2)	Negativni svi (0) Pozitivan 1-2 (1) Pozitivan >2 (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
7.	<b><u>CT skor za procenu ispunjenosti maksilarnih sinusa</u></b> bez sadržaja i zadebljanja sluznice u sinusima (0) zadebljanje sluznice/ispunjenost sinusa 0-66% (1) zadebljanje sluznice 66-100%/ispunjenost 66-100% (2)	Bez promena (0) Umerene promene (1) Izražene promene (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
8.	<b><u>Eo u krvi</u></b> Normalni (0-349 mm <sup>3</sup> ) (0) Visoki (>350 mm <sup>3</sup> ) (1) Jako visoki (>500 mm <sup>3</sup> ) (2)	Negativan (0) Pozitivan (1) Visoko pozitivan (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
9.	<b><u>Ukupna IgE At</u></b> Negativna (0) Pozitivan (>100 IU/ml) (1) Visokopozitivna (>1000 IU/ml) (2)	Negativan (0) Pozitivan (1) Visoko pozitivan (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>
10.	<b><u>Specifična anti-gljivična IgE At</u></b> Negativno (<0.35 IU/ml) (0) Umereno značajno (klasa 1-2) (0.35 – 3.5 IU/ml) (1) Visokoznačajno (klasa 3) (>3.5 IU/ml) (2)	Negativan (0) Umerena preosetljivost (1) Izražena preosetljivost (2)	<b>0</b> <b>1</b> <b>2</b>

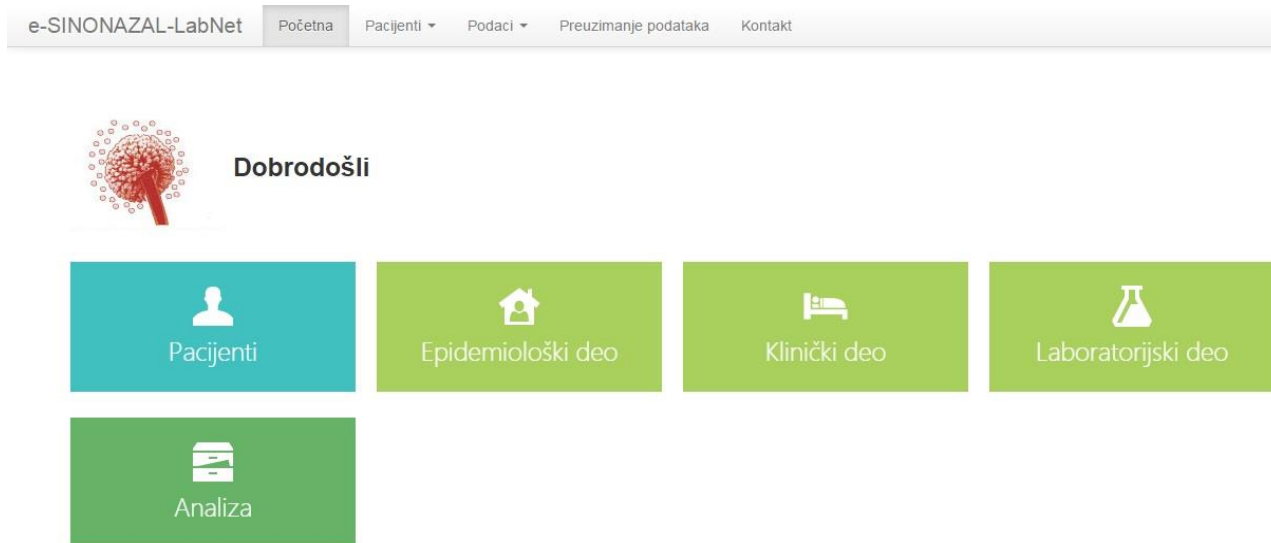
Algoritam **GRS<sub>indeks2</sub>** je primenjen za sve HRS pacijente (n=112) kod kojih su izvršena mikološka ispitivanja u cilju detekcije gljiva u sinusima i postavljanja laboratorijske dijagnoze GRS, a u cilju evaluacije nove metode (Sn, Sp, PPV i NPV).

#### 4.3.6. Softver za predikciju GRS i praćenje pacijenata sa HRS/GRS e-SINONAZAL-LabNet

Na osnovu definisanog algoritma za predikciju GRS i podataka iz literature, formirana je *online* baza podataka sa softverom za personalizovanu dijagnostiku GRS i praćenje pacijenata sa HRS/GRS (e-SINONAZAL-LabNet; MyCoMedLab Ltd, Beograd, Srbija).

Na osnovu algoritma program vrši predikciju GRS za pacijente za koje su uneti neophodni sociodemografski, klinički, alergološki i mikrobiološki podaci.

Optimalan cilj koji će se postići daljim razvojem programa je da na jednostavan način prikuplja podatke i olakša mikrobiologu i kliničkom lekaru pravilnu interpretaciju nalaza gljiva u sinusima.



Slika 24. E-SINONAZAL-LabNet

#### 4.4. Evaluacija metode za indukciju sinonazalnog sekreta (ISNS) u cilju detekcije gljiva

##### 4.4.1. Prevalencija FESS-a kod HRS+NP pacijenata u odnosu na opštu populaciju

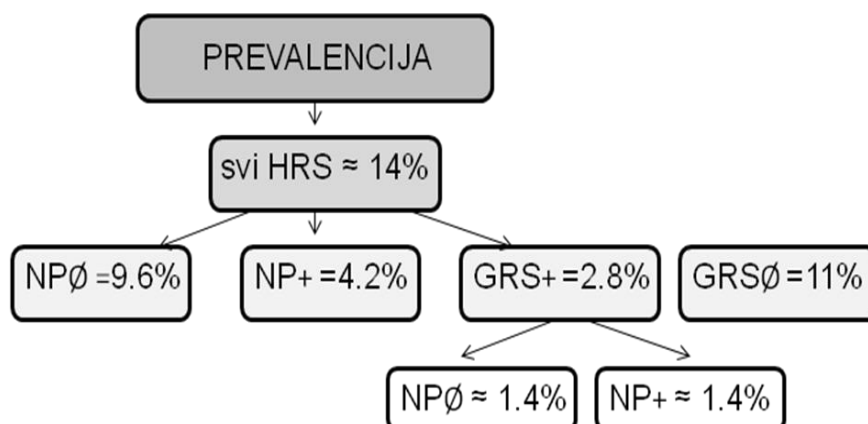
Prevalenciju za pacijente sa FESS-om nije bilo moguće izračunati s obzirom da u ovu grupu nisu konsektivno uključivani pacijenti u periodu izvođenja studije. Od svih pacijenata operisanih putem FESS-a koji su uključeni u studiju, 44.2% (19/43) su predstavljali pacijenti sa rekalcitrantnim HRS+NP (grupa reFESS).

##### 4.4.2. Prevalencija HRS i GRS u odnosu na opštu populaciju

Za evaluacije nove metode ISNS u cilju detekcije gljiva kod HRS pacijenata izvršeno je određivanje prevalencije HRS u našoj sredini i određivanje Sn, Sp, PPV i NPV.

Od ukupno 985 pacijenata ambulantno lečenih na Klinici za Alergologiju i imunologiju KCS, tokom 8 meseci trajanja studije (od 01.03. do 01.06.2013. i od 01.03. do 01.08.2014. godine) u studiju su uključena 136 konsektivna pacijenta sa klinički potvrđenom dijagnozom HRS. Na osnovu ovih podataka je pokazano da je prevalencija HRS u našoj opštoj populaciji 13.8%. Imajući u vidu da se kod dela HRS pacijenata javljaju i NP, određena je prevalencija HRS+NP u našoj opštoj populaciji koja je iznosila 4.2%.

Na osnovu rezultata prikazanih u delu 1 rezultata, određena je i prevalencija HRS<sub>F+</sub> u našoj opštoj populaciji, koja je iznosila 2.8%. Pokazano je da polovina HRS<sub>F+</sub> pacijenata ima NP (1.4%) (grafikon 9).



**Grafikon 9. Prevalencija HRS, NP i GRS u odnosu na opštu populaciju**

#### **4.4.3. Performanse i ispitivanje tačnosti metode za obradu tkiva NP do jednoćelijske suspenzije u cilju detekcije gljiva kod operisanih pacijenata**

Evaluacija metode obrade tkiva NP do jednoćelijske suspenzije u cilju detekcije gljiva kod HRS+NP pacijenata nije određena putem Sn, Sp, PPV i NPV, s obzirom da paralelno sa ovom metodom nije rađena druga referentna metoda koja bi služila za poređenje i određivanje performansi. Međutim, pokazano je da je korišćenje novo-primenjene metode za obradu tkiva NP do jednoćelijske suspenzije pokazalo visok "*recovery rate*", posebno kod pacijenata sa reFESS-om, obzirom da je ovom metodom pokazano prisustvo gljiva kod 42.1% reFESS pacijenata, što je bilo statistički značajno više nego kod pacijenata sa pFESS-om (8.3%).

#### **4.4.4. Performanse i ispitivanje tačnosti metode ISNS u cilju detekcije gljiva kod neoperisanih pacijenata**

Performanse i tačnost metoda ISNS za detekciju gljiva su ispitane određivanjem Sn, Sp, PPV i NPV.

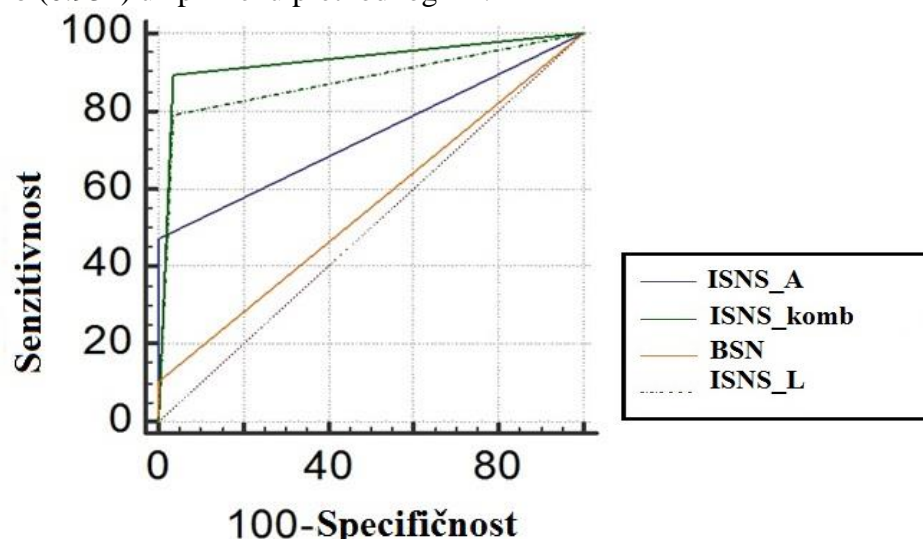
##### **4.4.4.1. Senzitivnost (Sn) i specifičnost (Sp) metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS**

Poređenjem Sn i Sp metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (zlatni standard) pokazana je najbolja kumulativna Sn (89%) i Sp (96%) za ISNS\_komb, uz primenu prethodnog PT sluznice nosa (tabela 43).

**Tabela 43. Performanse (Sn i Sp) metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS**

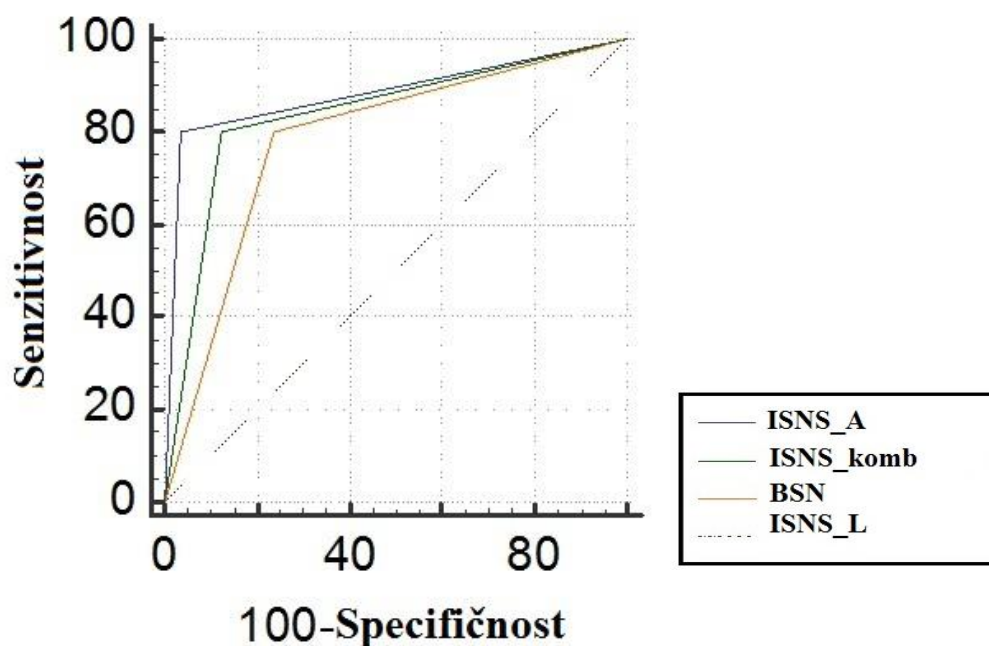
Sn i Sp metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS				
Metoda	HRS <sub>PT-</sub> (n=65)		HRS <sub>PT+</sub> (n=47)	
	Sn (%)	Sp (%)	Sn (%)	Sp (%)
	CI%	CI%	CI%	CI%
<b>BSN</b>	80 (44-96)	76 (62-86)	10 (2-34)	100 (84-100)
<b>ISNS_L</b>	80 (44-96)	96 (86-99)	78 (53-93)	96 (79-99)
<b>ISNS_A</b>	80 (44-96)	96 (86-99)	73 (56-86)	100 (62-100)
<b>ISNS_komb</b>	80 (44-96)	87 (74-94)	<b>89</b> <b>(65-98)</b>	<b>96</b> <b>(79-99)</b>

U cilju vizuelizacije dobijenih rezultata Sn i Sp je urađen grafički prikaz primenom ROC krive (grafikon 10 i 11). Dobijene su sledeće AUC (*area under curve*) vrednosti: (i) BSN bez PT 0.790, (ii) BSN sa PT 0.154, (iii) ISNS\_L bez PT 0.782, (iv) ISNS\_L sa PT 0.803, (v) ISNS\_A bez PT 0.820, (vi) ISNS\_A sa PT 0.492, (vii) ISNS\_komb bez PT 0.801 i (viii) ISNS\_komb sa PT 0.932. Dobijene AUC vrednosti pokazuju da najveću površinu iznad krive zauzima ISNS\_komb (0.932) uz primenu prethodnog PT.



**Grafikon 10. ROC kriva za ISNS\_A, ISNS\_L, BSN i ISNS\_komb sa pretretmanom u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (n=47)**





**Grafikon 11. ROC kriva za ISNS\_A, ISNS\_L, BSN i ISNS\_komb bez pretretmana u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (n=65)**

#### **4.4.4.2. Pozitivna (PPV) i negativna prediktivna vrednosti (NPV) metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS**

Poređenjem PPV i NPV metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (zlatni standard) pokazana je najbolja kumulativna PPV (94%) i NPV (93%) za ISNS\_komb, uz primenu prethodnog PT sluznice nosa (tabela 44).

**Tabela 44. Performanse (PPV i NPV) metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS**

PPV i NPV metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS				
Metoda	HRS <sub>PT-</sub> (n=65)		HRS <sub>PT+</sub> (n=47)	
	PPV (%) CI%	NPV (%) CI%	PPV (%) CI%	NPV (%) CI%
<b>BSN</b>	38 (18-61)	95 (83-99)	100 (19-100)	62 (46-75)
<b>ISNS_L</b>	80 (44-96)	96 (86-99)	93 (67-99)	87 (69-95)
<b>ISNS_A</b>	80 (44-96)	96 (86-99)	100 (84-100)	47 (25-70)
<b>ISNS_komb</b>	53 (27-77)	96 (85-99)	<b>94</b> <b>(70-99)</b>	<b>93</b> <b>(75-98)</b>

#### 4.4.4.3. Poređenje senzitivnosti (Sn) i specifičnosti (Sp) metoda ISNS za detekciju gljiva i kliničke dijagnoze GRS

Poređenjem razlika Sn i Sp kliničke i laboratorijskih metoda za dijagnozu GRS pokazano je da statistički značajna razlika postoji između kliničke dijagnoze GRS i (i) BSN bez PT ( $p=0.007$ ), (ii) BSN sa PT ( $p=0.000$ ) i (iii) ISNS\_A sa PT ( $p=0.02$ ), što ukazuje na nisku PPV ovih metoda. Najmanja statistički značajna razlika u dijagnostici GRS je pokazana između kliničke dijagnoze GRS i ISNS\_komb sa PT (tabela 45).

**Tabela 45. Poređenje senzitivnosti i specifičnosti kliničke i laboratorijskih metoda za dijagnozu GRS**

Metoda	HRS <sub>PT-</sub> (n=65)				HRS <sub>PT+</sub> (n=47)			
	BSN	ISNS_L	ISNS_A	ISNS_komb	BSN	ISNS_L	ISNS_A	ISNS_komb
<b>Klinička dijagnoza GRS</b>	*0.007	<b>0.1</b>	<b>0.9</b>	<b>0.1</b>	*0.000	<b>0.375</b>	*0.02	<b>1</b>

\*Statistički značajna razlika (p vrednosti; McNemar test) koja ukazuje da se dijagnoza uspostavljena laboratorijskom metodom i dijagnoza uspostavljena kliničkim kriterijumima statistički značajno razlikuju

#### 4.4.5. Primena metode za indukciju sinonazalnog sekreta (ISNS) i detekcija gljiva i interpretacija u fiziološkim i patološkim stanjima

Nalaz gljiva u gornjem RT kod HRS pacijenata zahteva pravilnu interpretaciju. Interpretacija zavisi od primenjenih metoda za detekciju gljiva i od kliničkih i epidemioloških podataka. Primenom rutinske metode za detekciju gljiva (BSN), novo-formiranih metoda (ISNS\_L i ISNS\_A) i algoritma za kliničku predikciju GRS moguće je pravilno interpretirati nalaz gljiva u fiziološkom i patološkim stanjima (tabela 46).

**Tabela 46. Interpretacija nalaza gljiva/fungi (F) u fiziološkim i patološkim stanjima**

<b>FIZIOLOŠKO STANJE</b>	
<b>Kolonizacija (mikrobiom)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• F+ u BSN, negativan ISNS_L i ISNS_A</li> <li>• &lt;5 pozitivnih kliničkih kriterijuma za predikciju GRS</li> </ul>
<b>PATOLOŠKO STANJE</b>	
<b>FRS - alergija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x pozitivan ISNS_L, negativan ISNS_A</li> <li>• ↑Eo u krvi i/ili ↑specifična anti-gljivična IgE At i/ili ↑ukupna IgE At i/ili SPT+ na inhalatorne alergene</li> <li>• &lt;5 pozitivnih kliničkih kriterijuma za predikciju GRS</li> </ul>
<b>FRS -infekcija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pozitivan samo ISNS_A ili 2x pozitivan ISNS_L ili ISNS_komb</li> <li>• Pozitivan nalaz gljiva u jednoćelijskoj suspenziji NP</li> <li>• ≥ 5 pozitivnih kliničkih kriterijuma za predikciju GRS</li> </ul>

## **5. DISKUSIJA**

HRS predstavlja inflamaciju sinonazalne mukoze multifaktorijalne etiologije koji čini jedno od najčešćih hroničnih oboljenja danas. Iako je predmet istraživanja brojnih studija u poslednje dve decenije, njegova različita prezentacija, etiologija i tačna patogenezna predstavljaju i dalje predmet debate. Smatra se da država godišnje potroši 5.8 milijardi dolara na lečenje HRS (Anand i sar., 2004). U ovaj iznos nisu uključeni individualni troškovi pacijenta za lečenje HRS, kao ni troškovi vezani za smanjenu radnu produktivnost i odsustvovanje sa posla (Benninger i sar., 2015).

Prosečna zastupljenost HRS u različitim studijama je oko 15% (Pleis i sar., 2010), dok je za Evropu pokazana 10.9% prevalencija HRS (Hastan i sar., 2011). Autori iz Kanade su objavili epidemiološke rezultate prevalencije HRS u ovoj zemlji koja iznosi 9.1% (Chen i sar., 2003), u Kini 7% (Kim i sar., 2011), dok u Brazilu prevalencija HRS iznosi 5.5% (Pilan i sar., 2012). U našoj studiji, od 985 pacijenata lečenih na Klinici za Alergologiju i Imunologiju KCS, tokom šest meseci, ispitano je 136 konsektivnih pacijenata sa dijagnozom HRS, dijagnostikovanom po EPOS kriterijumima (Fokkens i sar., 2012), što čini 14% prevalenciju HRS u Srbiji (grafikon 9). Zastupljenost HRS u Srbiji je nešto viša od prosečne za Evropu (Hastan i sar., 2011), mada je multinacionalna evropska studija iz 2011. koja je obuhvatila 19 centara iz 12 zemalja Evrope pokazala da se pojedinačne prevalencije razlikuju i kreću se od 6.7% u Helsinkiju do 27.1% u Krakovu (Hastan i sar., 2011). Očigledno je da prevalencija HRS ima različitu geografsku distribuciju, što se objašnjava različitim vremenskim uslovima, vlažnošću vazduha, socio-ekonomskim statusom stanovništva, ali i razvijenošću dijagnostičkih metoda.

Prevalencija HRS između polova se razlikuje, pa je tako u studiji Chen i saradnika, pokazano da je prevalencija HRS kod pacijenata ženskog pola 5.7%, dok je kod pacijenata muškog pola nešto niža i iznosi 3.4% (Chen i sar., 2003). Slične rezultate dobili su i Pilan i saradnici koji su u svojoj studiji imali oko 55% žena sa HRS (Pilan i sar., 2012). U istraživanju koje je objavio Smith sa saradnicima (Smith i sar., 2005) bilo je 38% ispitanika muškog i 62% ženskog pola. Međutim, rezultati drugih autora pokazuju suprotne rezultate, pa je u studiji Johansson i saradnika prevalencija HRS bila značajno viša kod muškaraca nego kod žena (M:Ž odnos 2:1.3) (Johansson et al. 2003). Prethodne studije ne navode isključenje naučne pristrasnosti pri odabiru pacijenata koji su ušli u studiju, obzirom da nije navedena frekvencija polova u populaciji za koju je računata procentualna zastupljenost HRS. Kod 985 pacijenata lečenih na Klinici za Alergologiju i Imunologiju KCS, od kojih su 14% činili ispitanici u studiji, odnos polova je bio skoro jednak (M:Ž odnos 1.2:1), a razlika u

zastupljenosti HRS između polova nije pokazana ni u ispitivanoj grupi (M:Ž odnos 1.1:1) (tabela 14).

HRS je oboljenje radno aktivnog dela populacije, što je potvrđeno brojnim istraživanjima gde je pokazano da se prosečan uzrast pacijenata sa HRS kreće od 34 godine (Bhattacharyai sar., 2010) do 39.8 godina (Pilan i sar., 2012). Rezultati naših istraživanja pokazuju da je prosečan uzrast pacijenata sa HRS 38.4 godina (tabela 14), što je u skladu sa ovim podacima. Sa druge strane, pojedini autori navode populaciju od >50 godina kao najčešće zastupljenu među pacijentima sa HRS, obzirom da je ovo često oboljenje sa kasnom manifestacijom simptoma, što prati hronicitet, a samim tim i viši prosečan uzrast pacijenata sa HRS (Hastan i sar., 2011).

HRS+NP predstavlja posebnu formu HRS, sa prisustvom NP u sinusima i/ili nosnom hodniku. Prema novijim istraživanjima NP ima oko 25-30% bolesnika sa HRS (Bhattacharyya i sar., 2010; Johansson et al. 2004), odnosno 4.2% opšte populacije i 6.7% populacije astmatičara (Settipane i sar., 1977). Međutim, rezultati epidemioloških istraživanja o HRS+NP se značajno razlikuju, pa neki autori navode značajno nižu prevalenciju. U studiji sprovedenoj u Švedskoj, Johanson i saradnika (Johansson i sar., 2004) objavljeno je da prevalencija HRS+NP iznosi 2.7% ukupne populacije. Slični rezultati dobijeni su u studiji autora iz Francuske gde je 2.1% ispitanika imalo HRS+NP (Klossek i sar., 2005), dok studija sprovedena u Koreji navodi zastupljenost 0.5% ovog hroničnog oboljenja u populaciji (Min i sar., 1996). U našoj studiji je 30.1% pacijenata sa HRS pripadalo grupi HRS+NP (tabela 23), 18.1% su imali NP u srednjem nosnom hodniku, a 11.9% van srednjeg nosnog hodnika što ukazuje na viši gradus NP. Pokazano je da su pacijenti sa HRS+NP češće muškarci, srednjih godina (Fokkens i sar., 2012; Peric i sar., 2013), što je potvrđeno i našom studijom gde je M:Ž odnos pacijenata sa HRS+NP iznosio 2.3:1, a prosečan uzrast oko 37 godina (Barać i sar., 2015).

Imajući u vidu da je u našoj studiji grupa pacijenta odustala od druge faze istraživanja (n=24) izvršeno je ispitivanje povezanosti njihovih sociodemografskih karakteristika i karakteristika pacijenata koji su nastavili drugu fazu kako bi se utvrdilo da li postoji razlika u sociodemografskim karakteristikama. U odnosu na grupe HRS<sub>PT+</sub> i HRS<sub>PT-</sub>, za grupu pacijenata koji su odustali od druge faze studije je pokazana statistički značajna razlika u trajanju bolesti i mestu stanovanja. Grupi koja je odustala od druge faze studije je činilo pretežno seosko stanovništvo sa kraćim trajanjem HRS i slabijim subjektivnim tegobama, što predstavlja verovatni razlog odustajanja od druge faze studije (tabela 17).

Poznato je da HRS ima snažan negativan uticaj na kvalitet života (QoL) pacijenata (Hopkins i sar., 2009). Iako simptomi HRS nisu životno ugrožavajući, značajno snižavaju QoL pacijenata (Van Oene, i sar., 2007). U poređenju sa drugim hroničnim oboljenjima, pokazan je značajno lošiji skor QoL za ocenu telesnog bola i socijalnog funkcionisanja pacijenata sa HRS u poređenju sa anginom, infarktom miokarda, hroničnom opstruktivnom bolesti pluća ili bolom u leđima (Gliklich i Metson, 1995; Gordts i sar., 1996). Savremena dijagnostička sredstva poput endoskopije nosa i CT-a paranazalnih sinusa omogućila su bolju procenu težine bolesti i odgovora na lečenje. Ipak, popravljjanje QoL je za samog bolesnika najvažniji pokazatelj uspešnosti u lečenju. Rezultati merenja QoL pacijenata prikazuju uticaj simptoma HRS na svakodnevni život pacijenta i koreliraju sa težinom oboljenja (Durr i sar., 2001; Khalid i sar., 2004; randell i sra., 2000; Van Agthoven i sar., 2001). QoL je takođe način da se izmere posledice HRS ili efekat terapije. Međutim, brojna istraživanja su pokazala da između objektivnih instrumenata za procenu težine bolesti (endoskopski i CT nalaz) i QoL ne postoji korelacija (Holbrook i sar., 2005; Hopkins i sar., 2006; Zheng i sar., 2010). Ovo ne umanjuje vrednost pojedinih pomenutih metoda, već ukazuje na činjenicu da one zapravo mere različite aspekte HRS.

Za procenu stepena težine simptoma koriste se skale različitog raspona intenziteta. U našoj studiji, za merenje QoL korišćena je VAS skala specijalizovana za subjektivnu ocenu simptoma HRS i SNOT-22 specijalizovani upitnik za HRS. Mereno VAS skalom, 68.4% pacijenata je subjektivno ocenilo svoje simptome kao „težak HRS“, što je potvrđeno i objektivnijim SNOT-22 upitnikom. Dominantni simptomi mereni VAS skalom su bili glavobolja i nazalna kongestija (začepljen/otečen nos). U istraživanju Solera i saradnika (Soler i sar., 2008) na VAS skali je zabeležen najveći intenzitet za simptome glavobolje i zamaranja, a zatim za nazalnu kongestiju i hiposmiju. U ovoj studiji, kao i u našoj, glavobolja je bila simptom sa najvećom frekvencom, ali ujedno i jedini simptom bez statistički značajnog poboljšanja postoperativno. Prosečne vrednosti svih evaluiranih simptoma su bile umerenog intenziteta, jer se istraživanje odnosilo na klinički heterogenu grupu bolesnika sa HRS+/-NP. Međutim, treba istaći da su zamaranja i glavobolja u ovom istraživanju po intenzitetu bili ispred hiposmije i nazalne kongestije. Ovo potvrđuje da individualni pristup i analiza pacijentovih subjektivnih tegoba može biti od ključnog značaja za prognozu HRS i praćenje terapijskog efekta.

U našoj studiji, dominantni simptomi po intenzitetu mereni SNOT-22 skorom su pripadali dimenziji nazalnih simptoma ( $23.48 \pm 15.64$ ) i orofaringealni simptomi ( $17.42 \pm 5.93$ )

(tabela 22), što odgovara podacima iz literature (Browne i sar., 2006; Hopkins i sar., 2009; Zheng i sar., 2010). Statistički značajna razlika je pronađena između HRS+NP i HRS-NP grupa, gde je pokazan viši SNOT-22 skor kod pacijenata bez NP za grupu orofaringealnih simptoma. NP pretežno dovode do simptomatologije vezane za hiposmiju/anosmiju, osećaja pritiska u predelu paranazalnih sinusa i osećaja zapušenosti nosa (Van Agthoven i sar., 2001; Settipane i sar., 1997; Serrano i sar., 2005; Kakoi i Herade, 1997). Konstantna inflamacija mukoze sinusa i obimna produkcija mucina kod pacijenata sa HRS-NP dovodi do sekrecije sadržaja iz sinusa kako nazalno tako i u orofarinksu, što se može detektovati zadnjom rinoskopijom (Hopkins i sar., 2007). Ovakva klinička manifestacija objašnjava lošiji skor SNOT-22 za orofaringealne simptome dobijen kod HRS-NP pacijenata. Sistemske simptome (telesni bol i telesne tegobe) su i HRS+NP i HRS-NP pacijenti najređe ocenili kao „teške“. Ovi simptomi se daleko češće viđaju kod drugih hroničnih stanja, te se može reći da ovi simptomi nisu karakteristični za bolesnike sa HRS i nemaju visok prognostički i dijagnostički značaj.

U EPOS dokumentu se navodi da rezultati CT i rinoskopskog nalaza dobro koreliraju (Smith i sar., 2005), međutim, brojni autori su pokazali u svojim studijama da je korelacija između CT, rinoskopskog nalaza i QoL skora nezadovoljavajuća (Holbrook i sar., 2005; Hopkins i sar., 2007; Zheng i sar., 2010). Zheng i saradnici su pokazali da su CT paranazalnih sinusa i rinoskopski skor HRS loši prediktori pacijentovog oporavka i satisfakcije QoL nakon FESS-a (Zheng i sar., 2010), dok se skor QoL upitnika pokazao kao dobar prediktor ishoda FESS-a i uticaja na QoL pacijenta nakon operacije (Gliklich i Metson, 1995). Stewart i saradnici (Stewart i sar., 2000) ističu da bolesnici sa lošijim preoperativnim CT skorom imaju veći stepen poboljšanja postoperativno, dok Deal i sar (Deal i sar., 2004) nisu potvrdili takvu korelaciju. Oni ističu da HRS+NP pacijenti imaju lošiji preoperativni CT skor i ne postižu isti stepen simptomatskog poboljšanja kao HRS-NP pacijenti. Takođe, Kountakis sa saradnicima (Kountakis i sar., 2004) nije pronašao korelaciju između CT skora i stepena simptomatskog poboljšanja posle FESS-a.

Pokazano je da, kada se težina HRS meri rezultatima CT ili endoskopskog nalaza, pacijenti sa HRS+NP imaju viši skor koji ukazuje na težu kliničku sliku u odnosu na HRS-NP pacijente (Bhattacharyya, 1997). Sa druge strane, mereno instrumentima za QoL pacijenata sa HRS (VAS i SNOT-22), pokazano je da pacijenti iz grupe HRS+NP imaju niži skor, što ukazuje na lakšu kliničku sliku, osim za simptome vezane za nazalnu kongestiju (Soler i Smith, 2008). Kennedy (Kennedy i sar., 1992) ističe prognostički značaj rinoskopskog



nalaza za revizionu hirurgiju kod HRS, a Vleming (Vleming i sar., 1990) ističe da endoskopski nalaz često perzistira i pored simptomatskog poboljšanja, naročito kod kliničkog oblika sa NP. Dominantni simptomi HRS u pogledu prevalencije i intenziteta su nazalna opstrukcija, postnazalna sekrecija i facijalna kongestija (Hopkins i sar., 2009). Hiposmija je izraženija kod HRS+NP, a glavobolja i facijalni bol kod HRS-NP (Nair i sar., 2011).

Način i intenzitet kojim HRS utiče na QoL pacijenata i njegovu fizičku i mentalnu produktivnost je daleko važnije od rezultata CT skora koji može da ukazuje na neznatne promene (Schalek i sar., 2010). Međutim, u našoj studiji je pokazana razlika između rezultata subjektivne ocene težine simptoma (VAS skala) gde je pokazana prosečna subjektivna ocena kao "težak HRS" dok se ocena HRS kod istog pacijenta razlikovala, a najčešće je bila ocenjena nižom (umereni/lak HRS) objektivnijom skalom (SNOT-22) i CT i rinoskopskim skorom (tabela 22 i 23). Prethodne studije su publikovale oprečne rezultate po pitanju značaja Lund McKey skora i njegove korelacije sa kliničkim nalazom i težinom HRS (Lund i sar., 1995; Basu i sar., 2005; Hoolbrok i sar., 2005; Dudvarski i sar., 2008). Lund McKay skor, sadrži parametre koji nisu pokazali korelaciju sa rinoskopskim skorom i QoL (Lund i sar., 1995). Stoga smo u studiji kreirali novi pojednostavljeni CT Skor za procenjivanje ispunjenosti maksilarnih sinusa, izdvojivši sledeće 2 varijable kao značajne za procenu težine HRS putem CT-a (Bradley i sar., 2005): (i) debljina mukoze maksilarnih sinusa i (ii) ispunjenost maksilarnih sinusa. Ostiomeatalni kompleks je uzet kao parametar obzirom da je najčešće mesto dreniranja i ventilacije frontalnih, maksilarnih i prednjih etmoidalnih ćelija. Posebna pažnja data je maksilarnim sinusima, obzirom da su maksilarni sinusi najčešća lokalizacija HRS, i s obzirom na prirodnu anatomiju i dreniranje sadržaja iz sinusa (Ford i sar., 2011).

Ovakav skor je pokazao dobru povezanost sa rinoskopskim skorom i QoL, pogotovo za pacijente sa HRS bez NP i GRS. Evaluacija značaja pojednostavljenog CT skora za procenu ispunjenosti maksilarnih sinusa u budućnosti bi mogla da doprinese formiranju novog CT skora sa većim značajem za dijagnozu i prognozu HRS u odnosu na postojeće. Najveći doprinos bi imala studija sa zdravom kontrolnom grupom i poređenje CT nalaza zdrave grupe i pacijenata sa HRS, međutim zbog neetičnosti ovakvog postupka u našu studiju nije uključena kontrolna grupa, što predstavlja manu i ograničenje studije.

Takođe, različita jačina korelacije je pokazana između poboljšanja sinonazalnih tegoba i rezultata rinoskopskog pregleda (Giger i sar., 2004; Wright i Agrawal, 2007). Wright i saradnici su pokazali lošu korelaciju između rinoskopskog skora, CT (Lund McKay) skora i

sinonazal-simptom upitnika (SSQ/*Sinus Symptom Questionnaire*) nakon 1, 3 i 6 meseci posle FESS-a (Wright i Agrawal, 2007). Studije koje su evaluirale efekat nehirurškog lečenja su takođe pokazale da ne postoji korelacija između rinoskopskog skora i SSQ (Birch i sar., 2001). Skorašnja studija Mace i saradnika prikazuje rezultate povezanosti između rinoskopskog skora i QoL pacijenata nakon FESS-a, praćenjem 102 pacijenta preoperativno i nakon 12 meseci od operacije. Nije pokazana povezanost između rezultata korišćenih QoL upitnika, rinoskopske ocene težine HRS i Lund McKay skora (Mace i sar., 2010). Zaključuje se da prognoza, ocena težine HRS i procena postoperativnog oporavka ipak ne može biti donešena na osnovu samo jednog od scoring sistema (rinoskopskog) bez korelacije sa QoL i CT skorom.

Zbog prethodno navedenih problema u značaju postojećih scoring sistema, na osnovu kliničkog iskustva i evaluacije prethodnih studija, formiran je modifikovan rinoskopski scoring sistem koji je korišćen u studiji. Rinoskopski skor su determinisali klinički i anamnestički podaci vezani za HRS. Skor sumira dobijene podatke o: (i) težini HRS - dužina trajanja tegoba (glavobolja/bol u predelu sinusa, nazalna drenaža, otežano disanje), dužini korišćenja lekova (antibiotici, topikalni kortikosteroidi, antihistaminici), intenzitetu simptoma, prethodnim operacijama sinusa i uzrast u kom su počele tegobe i (ii) rinoskopskom pregledu - prisustvo NP/edema/sekreta (leva i desna strana). Rinoskopski skor sumira intenzitet najčešćih tegoba vezanih za HRS za koje se u dosadašnjim istraživanjima pokazano da koreliraju sa težinom HRS, podatak o dužini HRS i prethodnim terpijskim postupcima i rinološki nalaz kojim se ocenjuje izgled i ispunjenost paranazalnih sinusa (Soler i Smith, 2010; Schalek i sar., 2010). Ovakva rinoskopska ocena je pokazala snažnu korelaciju sa težinom HRS ocenjenom QoL upitnicima i CT nalazom, posebno kod pacijenata sa GRS.

Iako pojedini autori navode da ne postoji povezanost između CT skora i kliničke i subjektivne procene težine HRS, ova kombinacija je od najvećeg dijagnostičkog značaja i evaluacija i modifikacija postojećeg skora bi mogla da pomogne lekarima u razumevanju i boljoj proceni težine HRS i time omogućiti donošenje preciznijih odluka o terapiji. Buduća istraživanja na ovom polju bi trebalo da budu usmerena u pravcu evaluacije i modifikacije postojećih CT skorova, i ispitivanja korelacije CT skora sa kliničkim nalazom i subjektivnim simptomima (VAS skala) u cilju formiranja dijagnostičkog protokola koji bi lekarima olakšao donošenje procene o težini HRS i odluke o terapiji.

Kao važan prognostički faktor pokazala se pozitivna porodična anamneza na prisustvo HRS+/-NP. Alexiou i sar (Alexiou i sar., 2011) su proučavali 100 pacijenata sa HRS, kao i

102 zdrave osobe i pokazali da 13.3% pacijenata sa HRS imaju pozitivnu porodičnu anamnezu, dok je kod svih pacijenata iz kontrolne grupe porodična anamneza bila negativna. U studiji koju su sprovedeli Rugina i sar. (Rugina i sar., 2002), više od polovine bolesnika sa HRS+NP (52%) je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu o HRS+NP. Ovaj anamnestički podatak nije dobijen od ispitanika u našoj studiji, što je mana studije jer bi mogao da da smernice za donošenje zaključaka o uticaju genetički izmenjenog imunskog odgovora u patogenezi HRS.

O imunopatološkoj osnovi HRS govori i histološki sastav izmenjene sluznice hronično inflamiranih sinusa. Histopatološke karakteristike NP obuhvataju skvamoznu metaplaziju delova respiratornog epitela sa hiperplazijom bazalnih ćelija. Lamina propria inflamatornih NP se karakteriše sa četiri pojave: edem, ekstenzivna eozinofilija (hipereozinofilija), ekstenzivna limfocitoza, kao i prisustvo degenerisanih, cistično izmenjenih žlezda, ispunjenih mukusom. Prethodne imunohistohemijske studije su pokazale da su medijatori zapaljenske reakcije TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , VCAM-1, kao i eotaksin prisutni u većini NP, preciznije u njihovim endotelnim ćelijama kapilarnih krvnih sudova, fibroblastima, makrofagima, limfocitima i u Eo strome polipa (Bernstein i sar., 2001). Pojedini autori smatraju da pojačana lokalna genska ekspresija TNF- $\alpha$  predstavlja preduslov za razvoj ovog hroničnog zapaljenskog oboljenja (Bernstein i sar., 2001). Za pokretanje procesa nakupljanja Eo u tkivu NP posebno je značajan odnos koji se uspostavlja između TNF- $\alpha$  i VCAM-1. U fibroblastima koji leže u stromi NP (Warfel i sar., 2008; Oho i sar., 2008; Saji i sar., 2000). Uloga VCAM-1 je pre svega u regulisanju procesa transendotelijalne migracije Eo, što je neophodno za njihovo inicijalno nakupljanje u tkivu NP (Saji i sar., 2000; Yoshifuku i sar., 2007). Sa druge strane, Eo koji se akumuliraju u tkivu NP mogu sami da produkuju TNF- $\alpha$ , čime se regrutuju i privlače novi Eo (Liu i sar., 2007). Takođe, TNF- $\alpha$  može povećati sekreciju hemokina u fibroblastima, pre svega eotaksina, koji privlače sve veći broj Eo u laminu propriu NP. Tako se hronični zapaljenski proces u NP održava i pojačava u svom intenzitetu a broj Eo povećava (Sawa i sar., 2007; Wang i sar., 2008). Rezultati Eo u komori ukazuju da je 11% naših ispitanika sa HRS imalo pozitivan nalaz Eo u krvi, dok je 19.1% imalo visoko pozitivan nalaz Eo u krvi  $>500\text{mm}^3$ . Zapremina Eo se kretala od 1 do  $1733\text{ mm}^3$ . Pokazano je da je kod pacijenata sa astmom izmerena značajno viša zapremina Eo. Tako, je kod pacijentkinje sa 15-godišnjim trajanjem HRS, astmom i rekalcitrantnim HRS pokazana izuzetno visoka zapremina Eo u krvi ( $1733\text{ mm}^3$ ), pet puta viša od gornje granice referentnih vrednosti. U ostalim slučajevima sa astmom, zapremina Eo u krvi se

pokazala kao nešto niža od navedenog slučaja, međutim i dalje veoma visoka u odnosu na referentne vrednosti (975, 850 i 790 mm<sup>3</sup>). U sva tri slučaja radilo se o pacijentima sa astmom, hronicitetom i prisustvom rekalitrantnog HRS. Studija Solera i saradnika je bila fokusirana na poređenje QoL pacijenata nakon FESS-a sa i bez eozinofilije. Iako je u obe grupe pokazan napredak u QoL nakon FESS-a, kod pacijenata sa eozinofilijom je pokazan niži procenat poboljšanja simptoma u odnosu na preoperativni period (Soler i sar., 2010). Ovi nalazi ukazuju da je prisustvo Eo inflamacije važan parametar u prognozi težine bolesti, što može biti od izuzetnog značaja u donošenju terapijske odluke i praćenju toka terapije HRS. Kountakis i Baudoin u svojim studijama nisu uspeali da otkriju povezanost između zapremine Eo i težine HRS simptoma (Kountakis i sar., 2004; Baudoin i sar., 2006). U drugoj studiji, Soler je sa saradnicima pokazao da prisustvo eozinofilije u mukozni sinusa korelira sa težinom HRS prikazanom CT nalazom, endoskopijom i rezultatima testa za procenu mirisa i olfaktornih funkcija "*Smell Identification test*". Suprotno ovim nalazima, nije pokazana korelacija prisustva eozinofilije sa rezultatima dva QoL upitnika ili sa SF-36 opštim zdravstvenim upitnikom. Dalje, ova studija nije pokazala značajnu korelaciju između QoL rezultata i bilo koje vrste ćelijskih, stromalnih i epitelijlnih markera inflamacije (Soler i sar., 2009) iako je u našoj studiji pokazano da zapremina Eo u krvi može biti značajan pokazatelj težine HRS i dijagnostički parametar za HRS+NP i HRS-NP.

Pokazano je da su ukupna IgE At, kao i Eo, često udruženi sa HRS i da im koncentracija zavisi od ekstenzivnosti procesa, ali i atopijske konstitucije pacijenta (Baudoin i sar., 2006). U našoj studiji je pokazano da je 18.4% pacijenata sa HRS imalo visok nivo ukupnih IgE At, što je u skladu sa podacima iz literature (Szczeplik i sar., 2000). Obzirom da nisu razjašnjeni patofiziološki mehanizmi nastanka HRS+NP i HRS-NP i tip hipersenzitivnosti po kojoj se odvija nastanak ovih oboljenja, pored koncentracije ukupnih IgE At, važno je ispitati i značaj i koncentraciju specifičnih IgE At na inhalatorne alergene. U našoj studiji određena je koncentracija specifičnih IgE At na smešu gljivičnih alergena *A. fumigatus*, *P. notatum*, *C. cladosporioides* i *A. alternata* i pokazano je da je 24% pacijenata sa HRS imalo neku od klasa od 3-6 specifičnih anti-gljivičnih IgE At (tabela 24). Iako su komercijalno dostupni samo određeni gljivični alergeni i testiranja na njih, ukrštena reaktivnost između različitih vrsta i rodova povećava relevantnost i značaj specifičnih IgE At na smešu gljivičnih alergena. Termin ukrštena reaktivnost se odnosi na antigensku sličnost različitih alergena i takvo deljenje epitopa između gljivičnih rodova je dobro poznato (Bisht i sar., 2002). Brojni autori su do sada objavili rezultate koji ukazuju na visok stepen IgE

ukrštene reaktivnosti gljivičnih determinanti između rodova *Alternaria*, *Stemphylium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Spondilocladium*, *Dreschera* (Hoffman i sar., 1981), *Epicoccum* (Bisht i sar., 2002) i *Curvularia* (Gupta i sar. 2002). Pokazano je i da različite vrste unutar jednog roda dele slične epitope, posebno u okviru rodova *Aspergillus* i *Alternaria* (Vijay i sar., 1979). Iz tog razloga, visok stepen sličnosti između alergena koje pripadaju različitim rodovima i vrstama ukazuje da ispitivanje na komercijalno dostupne alergene SPT (*C. herbarum*, *A. alternata*, *P. notatum*, *A. fumigatus*) ima mnogo veći značaj, jer pozitivni rezultati SPT ne ukazuju samo na prisustvo hipersenzitivnosti na pojedinačni alergen već ukazuju na generalnu preosetljivost pacijenta na inhalatorne gljivične alergene. Dalja istraživanja na polju identifikacije gljivičnih alergenskih determinanti - epitopa, bi moglo da ima značajne implikacije na razvoj imunoterapije u lečenju gljivičnih oboljenja respiratornog trakta.

U našoj studiji je pokazano da su inhalatorni alergeni (SPT) bili pozitivni kod 81/136 (59.6%) pacijenata, od toga 1-2 alergena kod 52/136 (38.2%) pacijenata, a 3 ili više alergena kod 29/136 (21.3%) pacijenata. Kod ispitanika su polen (41.9%) i grinje (18.4%) bili dominantni alergeni. Najčešće pozitivni inhalatorni alergeni su bili: iz grupe polena *Olea europea* (14.7%) i *Phleum pratense* (13.2%), iz grupe plesni *Alternaria* (11.8%) i iz grupe grinja *Dermatophagoides pteronyssinus* (11.8%) (tabele 24 i 25).

U velikoj multicentričnoj studiji koja je obuhvatila oko 52.000 odraslih pacijenata starosti između 18 i 75 godina, sprovedene u 12 zemalja, dokazana je snažna povezanost astme sa HRS. Povezanost HRS i astme je bila značajnija u grupi pacijenata obolelih istovremeno od HRS i alergijskog rinitisa (Jarvis i sar., 2012). Astma je nađena u 26% obolelih od HRS+NP (Moloney, 1977). Sa druge strane, 7% astmatičara je imalo HRS-NP (Larsen i sar., 1991). U našoj studiji, zastupljenost astme je bila 41.9% među svim HRS pacijentima, odnosno 54.8% među HRS+NP pacijentima (tabela 15). Astma je jedan od najvažnijih prognostičkih parametara za HRS. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je osobi oboleloj od HRS potrebno između 9 i 13 godina kako bi razvila NP u sinusima. Sa druge strane, potrebne su u proseku samo dve godine da bi se razvili NP kod astme udružene sa AI (Szczeplik i sar., 2000). U oko 10% pacijenata, NP se razvijali simultano sa progresijom bronhijalne astme, dok se u ostalih 90% slučajeva razvije prvo HRS+NP, a nakon toga kao posledica hroniciteta razvije se astma (Rugina i sar., 2002). Žene sa HRS+NP imaju 1.6 puta veću verovatnoću da razviju bronhijalnu astmu (Settipane i Shafee, 1977).

Utvrđeno je da astma, AI, hipersenzitivnost na inhalatorne alergene i prisustvo NP predstavljaju faktore rizika za lošije objektivne postoperativne rezultate i pojavu rekalcitrantnog HRS. Bez obzira na odlične subjektivne rezultate lečenja, Kennedy i saradnici ističu da je kod 44.9% bolesnika endoskopski zabeležena rezidualna bolest posle prosečnog vremena praćenja od 18 meseci (Kennedy i sar., 1992). Studija je obuhvatila 120 bolesnika, a od toga 85 bolesnika (71%) je pripadalo re-FESS grupi. Dakle, veliki broj bolesnika u ovoj studiji je bio otporan na medikamentozno i hirurško lečenje. Robinson i saradnici (Robinson i sar., 2007) ističu da posle FESS-a 57-74% bolesnika sa HRS ima poboljšanje u endoskopskom skor. U zavisnosti od intenziteta simptoma, kvaliteta života, prisustva komorbiditeta, lokalizacije i veličine NP, potrebno je proceniti klinički značaj recidiva odnosno koji su pacijenti kandidati za re-FESS. Re-FESS je u našoj pilot studiji zabeležen u 44.2% pacijenata (Barać i sar., 2015), što je u skladu sa podacima iz literature koji navode zastupljenost od 44.9% (Kennedy i sar., 1992) i 44.7% (Dudvarski, 2013) kod pacijenata sa HRS. Kod pacijenata sa re-FESS-om utvrđeno je prisustvo brojnih faktora komorbiditeta, a pre svega astme (38.8%) i AI (25.9%) (Dudvarski, 2013) što je u skladu sa rezultatima naše pilot studije gde je najčešći faktor komorbiditeta bila astma i AI (Barać i sar., 2015). Takođe, dužina trajanja HRS i hronicitet su od velikog značaja za ishod terapije, tok bolesti i prognozu. U našoj studiji, prosečno trajanje HRS je bilo oko 12 godina, statistički značajnije duže u grupi HRS+NP (oko 14 godina) u odnosu na HRS-NP grupu (oko 9 godina). Do sad je nekoliko studija pokazalo da postoji povezanost između hroniciteta HRS, prisustva NP i pozitivnog nalaza gljiva u NP/mucinu (Ponikau i sar., 1999; Barać i sar., 2015).

Dalje, može se pretpostaviti da ni prisustvo određene gljive nije okidač za nastanak HRS/GRS, nego koncentracija gljivičnih alergena koja je neophodna za razvoj ovih oboljenja. Scheuller i saradnici su u prospektivnoj studiji sa 19 HRS pacijenata i 19 zdravih kontrola pokazali da ne postoji značajna razlika u količini gljivičnog DNK u kliničkom materijalu iz sinusa između ove dve grupe, odbacivši time teoriju da je kvantitet gljivičnih elemenata ključan za razvoj HRS (Scheuller i sar., 2005). Da li je porast gljivičnih alergena ključan za patogenezu HRS, do danas je predmet diskusije i rezultati studija su različiti. Za gljivu roda *Alternaria* je pokazano da se alergeni koje proizvodi značajno razlikuju u okviru različitih vrsta ovog roda i između gradivnih komponenti istog izolata (spore i hife). *Alternaria* spore pokazuju veliki broj različitih alergena, sa najčešće zastupljenim Alt-a1 alergenom. Nedavno je otkriveno da dolazi do germinacije gljivičnih spora u respiratornom traktu pacijenata sa HRS, posebno u mukusu, što dovodi do povećanog otpuštanja alergena

(Mitakakis i sar., 2000). Međutim, kako prisustvo mucina prethodi otpuštanju i porastu koncentracije gljivičnih alergena, malo je verovatno da su gljive uzročni patogeni HRS. Bazirano na ovim činjenicama, dolazi se do zaključka da gljive nisu inicijalni okidači za razvoj HRS, ali su uzročnici pogoršanja HRS, razvoja hroniciteta i NP (Barać i sar., 2015).

Epitel je prvo kontaktno mesto inhalatornih čestica (uključujući i gljive) i čoveka, i kao takav predstavlja kontakt između spoljašnje sredine i unutrašnjeg miljea sinusa. Pod normalnim okolnostima, epitel predstavlja prvu liniju odbrane od patogena, formirajući nepropustljivu i visoko regulisanu barijeru. Hroničnom inflamacijom sluznice mukoze sinusa i nosa narušava se prirodna mehanička barijera čime se omogućava kolonizacija na sluznici sinusa ubikvitarnih gljiva iz vazduha, što može da pokrene imunopatološki proces i vodi ka razvoju HRS. Smatra se da epitel upravlja inflamacijom i remodelovanjem disajnih puteva (Hackett i Knight, 2007) koje predstavlja patološki proces koji se dešava kod HRS i astme i podrazumeva epitelnu metaplaziju i oštećenje, zadebljanje subepitelne bazalne lamine, porast miofibroblasta, hipertrofiju i hiperplaziju glatkih mišića disajnih puteva, hiperplaziju žlezda u mukozi, angiogenezu i izmenjeno nakupljanje i stvaranje ekstracelularnog matriksa proteina (Pawankar i sar., 2007).

Epitelno oštećenje dokazano u uzorcima HRS pacijenata može biti rezultat Th2-zavisnog, antigen-posredovanog imunog odgovora koje na kraju rezultuje otpuštanjem toksičnog sadržaja eozinofilnih granula. Poslednja istraživanja su pokazala da česte gljive iz vazduha, posebno *A. alternata* i *A. fumigatus* produkuju proteaze koje se vezuju za receptor na ćelijama respiratornog epitela, leukocita i krvnih ćelja, aktivirajući time intracelularni signalni put koji između ostalog dovodi do produkcije hemokina, citokina, eikozanoida i metaloproteinaza (Kauffman i sar., 2000). Kako je epitelno oštećenje pronađeno kod skoro svih pacijenata sa HRS, može se pretpostaviti da slične unutrašnje epitelne abnormalnosti postoje kod predisponiranih osoba.

Godinama se smatало da je IgE posredovana hipersenzitivnost na gljive (I tip preosetljivosti), dokazana visokim nivoom specifičnih IgE At ili pozitivnim SPT na najčešće gljivične alergene, zadužena za razvoj patološkog procesa karakterističnog za neinvazivni GRS. Skorašnje studije su pokazale da je neinvazivni GRS mnogo češće zastupljen nego što se smatralo bazirano na nalazima pozitivnih izolata gljiva u nosu i sinusima skoro svih HRS pacijenata. Ukoliko je hipersenzitivnost na gljive neophodna za adekvatnu dijagnozu neinvazivnog GRS, kao što smatraju brojni autori, potrebno je razjasniti povišen nivoa specifičnih IgE At ili pozitivnog SPT na najčešće gljivične alergene kod pacijenata bez HRS

(Ponikau i sar., 2007). Brojni autori su ispitivali procenat hipersenzitivnosti na gljive kod pacijenata sa HRS, i pokazali da se kreće od 18% do 46% (Ponikau i sar., 1999; Taylor i sar., 2002; Ponikau i sar., 2007). U našoj studiji, ukupna hipersenzitivnost na gljive ispitivana SPT je iznosila 33.3%. Pojedinačna hipersenzitivnost je iznosila takođe 33.3% za *A. fumigatus*, ali bez statističkog značajne razlike između HRS<sub>F+</sub> i HRS<sub>F-</sub> grupa i 27.8% za *C. herbarum*, gde je pokazan statistički značaj kao češće pozitivan nalaz kod HRS<sub>F+</sub> grupe u odnosu na HRS<sub>F-</sub>. Zastupljenost hipersenzitivnosti na ostale gljivične alergene se nije pokazala kao statistički značajna i iznosila je 16.7% za *A. alternata* i 11.1% za *P. notatum*. Od ostalih inhalatornih alergena, statistički značaj je dala razlika u hipersenzitivnosti na alergene polena biljaka, 100% u HRS<sub>F+</sub> grupi i 65.5% u HRS<sub>F-</sub> grupi. *P. pratense* se pokazao kao najčešći pozitivan alergen od polena biljaka u HRS<sub>F+</sub> grupi (66.7%) sa statističkom značajnosti u odnosu na HRS<sub>F-</sub> grupu (27.6%). Pojedini autori su pokazali da ne postoji razlika u procentualnoj zastupljenosti hipersenzitivnosti na gljivične alergene između GRS pacijenata i zdravih kontrola (Ponikau i sar., 2007), dok su drugi pokazali značajno viši nivo specifičnih IgE At na gljivične alergene kod pacijenata sa HRS i eozinofilnim mucinom sa i bez gljiva u poređenju sa zdravim kontrolama (Pant i sar., 2005). Iako je nivo specifičnih IgE At bio viši kod HRS pacijenata sa eozinofilnim mucinom, trebalo bi napomenuti da nije pokazana značajna razlika u nivou specifičnih IgE At između HRS pacijenata sa i bez dokazane hipersenzitivnosti na gljive kožnim probama (Pant i sar., 2005). U našoj studiji, HRS<sub>F+</sub> pacijenti su statistički značajno češće imali pozitivna ukupna IgE At, kao i duplo višu prosečnu vrednost ukupnih IgE At (320 IU/ml) u odnosu na HRS-G grupu (oko 160 IU/ml). Takođe, srednja vrednost specifičnih IgE At na smešu gljivičnih alergena se značajno razlikovala između HRS<sub>F+</sub> i HRS<sub>F-</sub> grupa, gde je prosečna vrednost specifičnih IgE At bilo duplo veća u HRS<sub>F+</sub> grupi i iznosila oko 210 IU/ml, u odnosu na 130 IU/ml u HRS<sub>F-</sub> grupi. Pozitivan nalaz SPT na gljivične alergene nije uvek korelirao sa pozitivnim nalazom specifičnih IgE At. Za pojedina oboljenja izazvana hipersenzitivnošću na gljive, kao što je ABPA, poznato je da umereno pozitivan SPT nije indikator ovog oboljenja i da reflektuje samo prisustvo antigen specifičnih IgE At (kao što sve osobe sa atopijom mogu pokazati hipersenzitivnost na *A. fumigatus*) bez dokaza o parenhimalnim promena koje su neophodne za sigurnu dijagnozu ovog oboljenja (Terho i sar., 1995). Prema tome, prisustvo specifičnih IgE At nije dijagnostički kriterijum za razlikovanje neinvazivnog GRS od ostalih HRS pacijenata. Međutim, moglo bi da ukazuje na prisustvo generalne hipersenzitivnosti na gljive generalno, za šta se pretpostavlja da je u osnovi razvoja neinvazivnog GRS. Iako je SPT



značajno jeftiniji u odnosu na *in vitro* dijagnostičke testove, pojedini autori dovode u pitanje tačan sadržaj i količinu određenih gljivičnih alergena u ovim testovima (Esch i sra., 2004). Valies i saradnici su pokazali da koncentracija alergena u SPT u zavisnosti od proizvođača i vrste alergena može značajno varirati (Vailes i sar., 2001). Potrebno je da buduće studije evaluiraju značaj postojećih metoda za određivanje prisustva hipersenzivnosti na inhalatorne alergene u dijagnostici HRS. Determinacija panfungalnog antigena koji bi bio primenjiv za SPT bi bio od izuzetnog značaja.

Iako su ispitali osetljivost na mali broj gljiva (*A. alternata*, *A. fumigatus*, *C. herbarum* and *P. notatum*), Shin je sa saradnicima pokazao sličan nivo specifičnih IgE At u serumu kod 18 pacijenata sa HRS i 15 zdravih kontrola. IgE At na *A. alternata*, *A. fumigatus*, *C. herbarum* i *P. notatum* su bila prisutni u manje od 30% pacijenata uprkos prisustvu *Alternaria* antigena u uzorku nazalnog sekreta svih testiranih HRS pacijenata (n=36), ukazujući da hipersenzitivnost na gljive nije uzročnik pokretanja imunopatološkog procesa u razvoju HRS (Shin i sar., 2005). S obzirom da su istraživanja Pant i saradnika pokazala da neki pacijenti sa neinvazivnim FRS nemaju hipersenzitivnost na gljive koje su izolovane iz njihovog eozinofilnog mucina, ali imaju povišen nivo IgE At na druge gljive, postavlja se pitanje da li je prisustvo hipersenzitivnosti na gljive odgovorno za razvoj HRS (Pant i sar., 2005). Navedeni rezultate navode na razmišljanje da I tip preosetljivosti na gljive najverovatnije nije centralni imunopatološki proces u razvoju neinvazivnog FRS (DeShazo i Swain, 1995). Na osnovu prethodno analiziranih rezultata, pretpostavku o jedinstvenoj patogenetskoj ulozi hipersenzitivnosti na gljive u razvoju neinvazivnog FRS bi trebalo dobro preispitati.

S obzirom na to da je astma kao komorbiditet bila češće prisutna u grupi HRS<sub>F+</sub> u odnosu na HRS<sub>F-</sub> grupu, mogu se doneti dva zaključka, odnosno dve različite pretpostavke o značaju ove korelacije. Prva je da hronicitet HRS, uz konstantnu inflamaciju sluznice, hroničnu senzibilizaciju sluznice prisustvom inhalatornih alergena, i sekreciju mucina u orofarinks, dovodi do inflamacije i pokretanja imunopatološkog odgovora na sluznici donjih partija disajnih puteva što nakon više godina dovodi do astme. Druga pretpostavka se bazira na suprotnim činjenicama, da je imunopatološki odgovor kod HRS identičan onom kod astme, i da je analogan astmi i predstavlja samo manifestaciju ove imunopatološke reakciju u gornjim partijama disajnih puteva. Naredne studije bi trebalo da razjasne značaj povezanosti astme, HRS i GRS i da li je astma vezana za nastanak ovog oboljenja ili je posledica

njegovog hroniciteta. Zbog pokazane povezanosti, može se zaključiti prisustvo astme može biti važan prognostički i dijagnostički paramater za GRS.

Iako se smatra diskutabilnim, Ponikau i saradnici smatraju da su pored gljiva, Eo prisutni u tkivu mukoze sinusa skoro svih pacijenata sa HRS (Ponikau i sar., 1999). Pokazano je da je Eo inflamacija heterogena u bilo kom uzorku tkiva sa delovima sa i bez prisustva Eo (Ponikau i sar., 2007). Detaljna evaluacija jednog uzorka tkiva je ključna za izbegavanje lažno negativnih rezultata koje je pokazano u pojedinim studijama gde nije otkriveno prisustvo Eo u uzorku tkiva HRS pacijenata (Braun i sar., 2003; Ponikau i sar., 2007). Iako su gljive, s obzirom na njihovu ubikvitarnu prirodu, prisutne i kod HRS pacijenata i zdravih kontrola, eozinofilija tkiva je dokazana samo kod pacijenata sa HRS. U našoj studiji nisu hirurški uzimani uzorci mukoze sinusa, zbog čega nije urađen citološki pregled tkiva, ali je urađeno određivanje zapremine Eo u krvi pacijenata sa HRS pouzanim pregledom u komori. S obzirom da je u našoj studiji prosečna zapremina Eo u krvi bila duplo viša u grupi HRS<sub>F+</sub> (oko 350 mm<sup>3</sup>) u odnosu na HRS<sub>F-</sub> grupu (oko 170 mm<sup>3</sup>), može se pretpostaviti da su Eo uključeni u imunopatogenezu GRS i da njihova zapremina u krvi može biti važan prognostički i dijagnostički paramater za GRS, o čemu svedoče i druge studije. Korišćenjem Boyden-ove komore, Wei i saradnici su merili nivo eozinofilne migracije i Eo iz krvi pacijenata sa HRS i zdravih kontrola (Wei i sar., 2003). Procenat migracije je bio konstantno viši za Eo iz krvi pacijenata sa HRS. Međutim, prepisivanje ovog nalaza visokog nivoa Eo patogenezi HRS je diskutabilno, obzirom da je 9/10 pacijenata sa HRS imalo astmu, a 4/10 su bili atopičari. Iako je Wei sa saradnicima pokazao višu (ali s obzirom na veličinu grupe bez statističkog značaja) migraciju Eo kod pacijenata sa atopijom i u nazalnom mucinu i nazalnom tkivu, u odnosu na neatopičare, uloga astme nije uzeta u obzir (Wei i sar., 2003). Nekoliko studija je pokazalo da Eo kod pacijenata sa astmom (alergijskom i nealergijskom) pokazuju izmenjen fenotip, što se objašnjava činjenicom da Eo interaguju sa citokinima u perifernoj krvi, što rezultuje povećanom migracijom, adhezijom i degranulacijom (Hirotzu sar., 2014). Na osnovu ovih podataka, ostaje nejasno da li je pokazan porast migracije Eo kod HRS pacijenata posledica HRS ili je vezano za osnovno oboljenje (astmu i/ili atopiju).

Kako su pojedine studije pokazale da je procenat hipersenzitivnosti na gljive sličan kod HRS pacijenata i zdravih kontrola, fokus istraživanja je prebačen na uticaj IgG At u imunopatološkom procesu razvoja HRS. Shin i saradnici su pokazali značajno viši nivo IgG At na *A. alternata*, *A. fumigatus*, *C. herbarum* i *P. notatum* kod pacijenata sa HRS u odnosu na zdrave kontrole (Shin i sar., 2004). Interesantno i u skladu sa ovim rezultatima, Pant i

saradnici su pokazali visok nivo specifičnih IgG1 i IgG3 izotipova At na *A. alternata* i *A. fumigatus* kod HRS pacijenata sa eozinofilnim mucinom (n=30) u poređenju sa zdravim kontrolama (Pant i sar., 2005). U poređenju sa pacijentima sa alergijskim rinitisom (kada postoji dokazana hipersenzitivnost na gljive) ili HRS pacijentima bez eozinofilnog mucina, Pant i sar. su pokazali da su specifična IgG3 At na gljive bila značajno viša kod HRS pacijenata sa eozinofilnim mucinom, bez obzira na prisustvo gljiva ili hipersenzitivnosti na gljive. IgG2 i IgG4 izotipovi At su povišeni kod HRS pacijenata sa eozinofilnim mucinom u poređenju sa zdravim kontrolama, ali nije bilo razlike u poređenju sa pacijentima sa alergijskim rinitisom ili HRS pacijentima bez prisustva eozinofilnog mucina (Pant i sar., 2005). Pokazano je IgG2 i IgG4 koji ne aktiviraju sistem komplementa ili se ne vezuju dobro za Fc receptor, štite BALB/c miša od infekcije gljivom *Cryptococcus neoformans* (Beenhouwer, 2007). Iznenadjuće, ljudski IgG1 i IgG3 izotipovi At, koji aktiviraju sistem komplementa i vezuju se za sve tri klase Fc receptora i koji bi trebalo da su esencijalni za zaštitu organizma od infekcije At-posredovanim mehanizmom, nisu se pokazali kao protektivni dok je IgG1 čak smanjivao stopu preživljavanja (Beenhouwer, 2007). Danas, osim što je biološki marker za HRS pacijente sa eozinofilnim mucinom, tačan patogenetski značaj specifičnih IgG3 At na gljive nije utvrđen, ali se smatra da bi mogao da zauzme mesto IgE At koji su do sada smatrani At ključnim za imunopatološki proces HRS gljivične etiologije. Tokom studije nije bilo moguće realizovati određivanje nivoa specifičnih IgG At u krvi pacijenata sa HRS, što je mana ove studije ali i fokus budućih istraživanja.

Kako je poznato da su gljive ubikvitarni mikroorganizmi i podjednako zastupljeni na sluznici nosa i paranazalnih sinusa i HRS i zdravih pacijenata (Ponikau i sar., 1999), može se pretpostaviti da za razvoj HRS i GRS nije važno prisustvo ili odsustvo gljiva u sinusima, već prisustvo određene vrste gljiva koja je zadužena za razvoj oboljenja. U našoj studiji, od 47 ispitanika koji su ušli u drugu fazu studije u koju je bilo uključeno mikološko ispitivanje ISNS, kod 18 pacijenata (38.3%) je pokazano prisustvo gljiva u ISNS\_A/ISNS\_L/BSN (HRS<sub>F+</sub>). Najčešće zastupljene vrste su bile *A. fumigatus*, *C. cladosporioides*, *F. oxysporum* i *P. chrysogenum*. Korišćenjem nove metode za uzorkovanje i detekciju gljiva, Ponikau i saradnici (Ponikau i sar., 1999) su pokazali da je 2.7-3.2 različitih vrsta dobijeno iz jednog uzorka HRS pacijenta i 2.3-3.1 iz uzorka zdrave kontrole (Ponikau i sar., 1999; Braun i sar., 2003), sa rodovima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Candida* i *Alternaria* kao najprevalentnijim (Kim i sar., 2005; Braun i sar., 2003).

Primenom metode za uzorkovanje vazduha, testiran je sastav vazduha iz životnog i radnog prostora pacijenata na prisustvo spora gljiva. Prosečno, oko 3 različite vrste gljiva su izolovane iz uzorka vazduha po pacijentu. Analizom distribucije vrsta i rodova gljiva u uzorku vazduha iz životnog prostora pacijenata sa HRS pokazano je da je najčešći izolat iz vazduha *Aspergillus niger* (62/224, 27.7%) (grafikon 7 i 8, slika 23). Ni kod jednog od 28 HRS<sub>F+</sub> pacijenata se nije pokazalo da je isti izolat detektovan u uzorku ISNS i vazduha iz životnog/radnog prostora tog pacijenta. Iako nije bilo preklapanja u izolatima u kliničkom materijalu i uzorku vazduha, značaj ovih izolata iz vazduha se ne sme zanemariti zbog prisustva ukrštene reaktivnosti i deljenja epitopa između različitih gljivičnih rodova. Iako određena gljiva nije detektovana u kliničkom materijalu, ne znači da baš ta vrsta nije bila pokretač imunopatološkog procesa u razvoju GRS, a vrsta izolovana iz ISNS sekundarna kolonizacija nakon pokrenutog imunopatološkog odgovora i inflamacije sluznice (Horner i sar., 1995).

Analizom zastupljenosti bakterija u odnosu na način uzorkovanja pokazan je najveći procenat pozitivnog nalaza korišćenjem metode BSN bez PT (26.2%), ISNS\_A sa PT (21.3%) i ISNS\_L bez PT (20.8%) (grafikon 4). Analizom distribucije bakterija u sinusima korišćenjem metoda ISNS sa i bez PT pokazana je najveća zastupljenost bakterije *Staphylococcus aureus* (grafikon 5). Prisustvo *S. aureus* u nosu/sinusima pacijenata sa HRS, značaj i povezanost sa nalazom gljiva je predmet istraživanja brojnih studija (Sachse i sar., 2010; Hammad i sar., 2011). Tako je sada aktuelno gledište da su stafilokokni enterotoksini više modifikatori patološkog procesa nego stvarni etiološki faktori (Hammad i sar., 2011). Ovi egzotoksini su sposobni da indukuju snažno zapaljenje i produkciju Eo, kao i sintezu multiklonalnih IgE At, što dovodi do nagomilavanja visokih koncentracija ovih At u tkivu mukoze i razvoja HRS. Min i saradnici su pokazali da stafilokokni enterotoksini imaju snažan ciliostatički efekat u sluzokoži paranazalnih sinusa (Min i sar., 2010). Osim toga, visoka produkcija ovih toksina u krajnjem ishodu prouzrokuje izražen subepitelijalni edem, rupturu epitela i inflamatornu, dominantno Eo infiltraciju tkiva NP. S obzirom na visok procenat izolata *S. aureus* detektovanih u kliničkom materijalu iz sinusa u ovoj, ali i u drugim studijama, moguće je da je inflamacija mukoze izazvana ovom bakterijom, osnova za kolonizaciju sluznice nosa i sinusa gljivama i razvoj GRS.

Mnoge patogene bakterije kolonizuju mukozu nosa i paranazalnih sinusa, formirajući biofilm. Biofilm se sastoji od skupina bakterija i gljiva, uronjenih u jednu amorfnu masu, sastavljenu od ekstracelularnog glikokaliksa, koji produkuju bakterije, a koji je ispresecan

brojnim kanalima, kroz koje cirkuliše voda (Toth i sar., 2011; Zhang i sar., 2009). Mada to nije primarni etiološki faktor u nastanku ove bolesti, svakako može doprineti intenziviranju zapaljenske reakcije te bi u narednim istraživanjima trebalo obratiti pažnju ne samo na detekciju gljiva i bakterija, nego i na značaj njihove interakcije.

Dokazivanje prisustva gljiva u sinusima predstavlja veliki laboratorijski i klinički izazov, a posebno tumačenje značaja izolacije gljiva u fiziološkim i patološkim stanjima. Godinama su objavljivani kontradiktorni rezultati o zastupljenosti gljiva u sinusima pacijenata sa HRS. Poređenje procentualne zastupljenosti gljiva u sinusima pacijenata sa HRS i zdravih kontrola u različitim studijama dat je u tabeli 47. Međutim, mogućnost komparacije ovih rezultata se dovodi u pitanje s obzirom na razlike u korišćenim tehnikama. Do 1999. godine prisustvo gljiva u sinusima se smatralo retkim, međutim rezultati Ponikau i saradnika, su dali drugačije podatke u kojima je prisustvo gljiva u sinusima pacijenata sa HRS bilo 96% (202 od 210 pacijenata) i 100% u zdravim kontrolama (14 od 14 zdravih osoba) koristeći novo-formirani metod i protokol za lavažu sinusa, uzorkovanje i kultivisanje lavata (Ponikau i sar., 1999). Korišćenjem iste tehnike za nazalnu lavažu, slična, visoka prevalenca prisustva gljiva u sinusima je pokazana u dve evropske studije (Kennedy i sar., 1995; Braun i sar., 2003). Može se reći da je Ponikau sa saradnicima napravio značajan napredak u odnosu na prethodne tehnike uzorkovanja kliničkog materijal pri sumnji na GRS (BSN) kao i u odnosu na prethodne metode za deteciju gljiva i obradu kliničkog materijala (Ponikau i sar., 1999). Pokazano je da je značajno viši procenat pozitivnih kultura pokazan u uzorku sinonazalnog ispirka (49%) nego u uzorku brisa srednjeg meatusa (11.8%) (Jiang i sar., 2005). U studijama gde je kao metod detekcije gljiva korišćen PCR, pokazano je da je u uzorcima sinonazalnog ispirka pokazan značajno veći procenat gljiva (40%) nego u BSN (0%) (Catten i sar., 2001). Iako je Buzina sa saradnicima dokazao da postoji viši procenat pozitivnih gljivičnih kultura u uzorku sinonazalnog ispirka (91.3%) u poređenju sa uzorcima dobijenim FESS-om (84%), ukazujući da nazalni ispirak ima veći dijagnostički značaj od uzorka dobijenog FESS-om, uzorci u ovoj studiji su dobijeni iz dve različite grupe ispitanika primenom jedne od navedenih tehnika (Buzina i sar., 2003). U dve prethodno navedene studije, uzorci su uzimani od iste grupe pacijenata, čime se smanjuje mogućnost istraživačke pristrasnosti.

**Tabela 47.** Hronološki prikaz metodoloških studija o GRS

Studija	Godina	Zemlja	Tehnika uzorkovanja	Mesto uzotkovanja	Tehnika detekcije gljiva	Prisustvo gljiva kod HRS pacijenata (%)	Prisustvo gljiva kod zdravih kontrola (%)
<b>Katzenstein i sar.</b>	1983	SAD	Biopsija /FESS	Sinusi	HP pregled	6.2	
<b>Ponikau i sar.</b>	1999	SAD	Nazalna lavaža; Biopsija /FESS	Sinusi, Nosni kavum	Kultura	96	100
					HP pregled	81	
<b>Catten i sar.</b>	2001	SAD	Citološki bris	Nazalni septum, donje turbine	PCR	40	42
			Standardni bris		Nazalni septum, donje turbine	PCR	0
<b>Taylor i sar.</b>	2002	SAD	Biopsija /FESS	Sinusi	GMS bojenje; Fluorescein obeležena hitinaza	76 100	
<b>Buzina i sar.</b>	2003	Austrija	Nazalna lavaža, Biopsija /FESS	Nosni kavum, Sinusi	Kultura	91.3	91.3
					Kultura	84.0	
					GMS bojenje	70.2	
<b>Braun i sar.</b>	2003	Autstrija	Nazalna lavaža; Biopsija /FESS	Nosni kavum, Sinusi	Kultura	91.3	91.3
					HP pregled	75.5	
<b>Jiang i sar.</b>	2005	Tajvan	Bris, Nazalna lavaža	Srednji meatus Nosni kavum	Kultura Kultura	11.8 49	
<b>Kim i sar.</b>	2005	Južna Koreja	Nazalna lavaža	Nosni kavum	PCR Kultura	92.5 23.2	97.5 30.0
<b>Polzelhl i sar.</b>	2005	Nemačka	Nazalna lavaža	Nosni kavum	PCR Kultura	25 44	
<b>Kennedy i sar.</b>	2005	SAD	Nazalna lavaža, Mukus	Nosni kavum	Kultura HP pregled	77.4	
<b>Rao i sar.</b>	2006	SAD	Biopsija /FESS	Etmoidalna bula ili etmoidalni sinus	PCR Kultura	6.5 0	
<b>Murr i sar.</b>	2006	SAD	Biopsija /FESS	Srednji meatus	PCR	45.9	45.9

Skraćenice: SAD, Sjedinjene Američke države; GMS, gomori methenamin silver

Bazirano na prethodno navedenim studijama, iako ni jedna nije sprovedena idealno i rezultati se odnose na ispirak iz nazofarinksa i vestibuluma umesto iz sinusa (Ponikau i sar., 1999), nazalna lavaža se pokazala kao superiorna metoda za uzorkovanje kliničkog sadržaja iz sinusa, u odnosu na BSN.

Standardna mikrobiloška analiza nosa i sinusa u cilju detekcije gljiva i bakterija podrazumeva: (i) uzimanje BSN i (ii) zasejavanje na hranljive podloge i (iii) makroskopska i mikroskopska identifikacija izolovanog mikroorganizma (Rogers i sar., 2003). Bris, kao nesenzitivna i nespecifična metoda za detekciju gljiva u sinusima, a ujedno "zlatni standard", je vodeći problem u dijagnostici i terapiji GRS. Detekcija gljiva ovom metodom u cilju dijagnostike GRS je pokazala lošu korelaciju sa kliničkim i radiološkim nalazima, i nizak procenat izolovanih sojeva gljiva (Rogers i sar., 2003). BSN ima mogućnost uzorkovanja samo sadržaja sa površine sluznice nosnog kavuma, što je bez dijagnostičkog značaja, što su i pokazali rezultati naše studije. Kako je pokazano da je BSN nerelevantna metoda za dijagnostiku GRS, patohistološki preparati često lošeg kvaliteta zbog neadekvatnog uzorka, rinoskopski i CT znaci nespecifični, od velikog kliničkog značaja je svaki napredak u razvijanju novih metoda za detekciju gljiva u sinusima. Novina je uvedena sa publikacijom istraživanja Ponikau i saradnika (Ponikau i sar., 1999) koji je primenio metodu „ispiranja“ sinusa i kolekciju ispirka za mikološku analizu. Međutim, rezultati zahtevaju diskusiju, obzirom da je pozitivan nalaz gljiva otkriven kod 96% ispitanika i čak 100% zdravih kontrola (Ponikau i sar., 1999). Ovakav nalaz kod zdravih kontrola bez HRS, bi mogao da ukaže na propuste ove dijagnostike, s obzirom da se ispiranjem sluznice sinusa „pokupe“ gljive koje kolonizuju nos i sinuse, te je njihov klinički značaj diskutibilan. Prisustvo gljiva u ovakvom ispirku nosa i sinusa ukazuje na prisustvo „udahnutih“ spora gljiva, koje su se trepljaste ćelije zadržale, odnosno na fiziološko stanje. Mada, sa druge strane, ovo hronično prisustvo gljiva u nosu/sinusima može biti faktor rizika za razvoj patološkog stanja - HRS i GRS (Barać i sar., 2015). Ipak, ovo je i dalje na nivou pretpostavke i potrebne su dodatne studije na ovu temu, obzirom da prisustvo gljiva u ispirku ne ukazuje da je pokrenut imunopatološki proces njihovim prisustvom, šta više, nalaz može da ukaže na spore gljiva udahnute iz vazduha i zadržane na trepljastom epitelu nosa/sinusa. Prethodna „priprema“ kavuma nosa za lavažu, kao i ponavljanje postupka lavaže, smanjuje mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata i donošenja pogrešnih zaključaka. S toga je u našoj studiji ispitan značaj korišćenja PT i toalete nosa pre BSN, ISNS\_L i ISNS\_A. Osim toga, ISNS\_L je smatran pozitivnim ukoliko je na dva puta uzastopno ponovljenom nalazu u razmaku od 7 dana izolovan isti uzročnik. Takođe,

evaluiran je i ISNS\_komb, koji predstavlja istovremenu primenu ISNS\_A i ISNS\_L, te je smatran pozitivnim samo ukoliko je dobijem isti izolat na obe vrste uzoraka.

Evaluacija metode obrade tkiva NP do jednoćelijske suspenzije u cilju detekcije gljiva kod HRS+NP pacijenata nije određena putem Sn, Sp, PPV i NPV, s obzirom da paralelno sa ovom metodom nije rađena druga referentna metoda koja bi služila za poređenje i određivanje performansi. Međutim, pokazano je da je korišćenje novo-primenjene metode za obradu tkiva NP do jednoćelijske suspenzije pokazalo visok "*recovery rate*", posebno kod pacijenata sa reFESS-om, obzirom da je ovom metodom pokazano prisustvo gljiva kod 42.1% reFESS pacijenata, što je bilo statistički značajno više nego kod pacijenata sa pFESS-om (8.3%). Poređenjem Sn i Sp metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu GRS (zlatni standard) pokazana je najbolja kumulativna Sn (89%) i Sp (96%) za ISNS\_komb, uz primenu prethodnog PT sluznice nosa (tabela 43). Dobijene AUC (*area under curve*) vrednosti pokazuju da najveću površinu iznad krive zauzima ISNS\_komb uz primenu prethodnog PT. Poređenjem PPV i NPV metoda ISNS za detekciju gljiva u odnosu na kliničku dijagnozu FRS (zlatni standard) pokazana je najbolja kumulativna PPV (94%) i NPV (93%) za ISNS\_komb, uz primenu prethodnog PT sluznice nosa (tabela 44). Poređenjem razlika Sn i Sp kliničke i laboratorijskih metoda za dijagnozu GRS pokazano je da statistički značajna razlika postoji između kliničke dijagnoze FRS i (i) BSN bez PT ( $p=0.007$ ), (ii) BSN sa PT ( $p=0.000$ ) i (iii) ISNS\_A sa PT ( $p=0.02$ ), što ukazuje na nisku PPV ovih metoda. Najmanja statistički značajna razlika u dijagnostici GRS je pokazana između kliničke dijagnoze GRS i ISNS\_komb sa PT (tabela 45).

Na procenat gljivičnih izolata iz sinusa utiče kako metod uzorkovanja, o kome govore prethodno navedene studije, tako i metod za obradu uzoraka. Kao „zlatni standard“, do sada su korišćeni uzorci BSN koji su direktno zasejavani na hranljive podloge. U studiji je korišćen modifikovan protokol za obradu mukusa, dok je u pilot studiji korišćen novo-formiran protokol za obradu tkiva NP. Visok procenat izolacije gljiva iz UZ obrađenog ISNS\_A i iz obrađenog tkiva NP do jednoćelijske suspenzije govori u prilog značaja obrade uzoraka pre mikrobioloških analiza. Primenjene metode za obradu tkiva su jednostavne, jeftine i reproducibilne, a obzirom da značajno povećavaju senzibilnost standardnih mikoloških procedura, trebalo bi imati u planu sprovođenje većih studija i standardizaciju ovih protokola za uzorkovanje i obradu kliničko 47 je dat hronološki prikaz studija i metoda za detekciju gljiva u sinusima pacijenata sa HRS. Procenti pozitivnih nalaza se značajno razlikuju, u zavisnosti od korišćene metode. Za uzorke dobijene FESS-om viši procenat



pozitivnih izolata je dobijen PCR metodom (6.5%) u odnosu na kultivaciju na hranljivim podlogama (0%) (Rao i sar., 2006). Kultura se pokazala kao senzitivnija metoda za detekciju gljiva (84%) u odnosu na patohistološki preparat bojen *Grocott methenamine silver* (GMS) bojom (70.2%) (Buzina i sra., 2003), dok se metod detekcije fluorescein oboženom hitinazom pokazalo kao senzitivniji za dokazivanje gljiva u klliničkom materijalu iz sinusa (100%) od bojenja GMS bojom (76%) (Taylor i sar., 2002). Za uzorke dobijene nazalnom lavažom, PCR (44% i 92.5%) se pokazao kao superiorniji u odnosu na kulturu (25% i 23,2%) u studijama Polzehl i saradnika i Kim i saradnika, redom (Polzehl i sar., 2005; Kim i sar., 2005). Bazirano na ovim komparativnim studijama, za detekciju gljiva u materijalu iz nosa i sinusa, PCR je dokazano superiorniji od metode kultivacije na hranljivim mikološkim podlogama, iako treba obratiti pažnju i na studije koje su kultivacijom dokazale 100%, ili približno, pozitivnih uzoraka na prisustvo gljiva (Buzina i sar., 2003; Braun i sar., 2003; Ponikau i sar., 1999). Iako i PCR i kultivacija dokazuju prisustvo gljivičnih elemenata u uzorku, vijabilni gljivični elementi su za sada detektabilni samo putem kultivacije.

Nije poznato da li je vijabilnost gljiva zadužena za imunopatološki proces u patogenezi HRS, mada je Taylor sa saradnicima dokazao prisustvo gljivičnih hifa u mukusu sinusa kod 100% HRS pacijenata (Taylor i sar., 2002) pomoću metode fluorescein-obeženom hitinazom. Kako je hitin prisutan u ćelijskom zidu svih gljiva, ovaj rezultat najverovatnije ukazuje na veoma visoku senzitivnost ovog testa. Potrebno je da buduće studije potvrde ove rezultate.

Moglo bi se reći da tehnika kultivacije gljiva na hranljivim podlogama ima najveću verovatnoću da detektuje kontaminante, što može biti opravdano činjenicom da je procenat pozitivnih gljivičnih izolata kultivacijom u pojedinim studijama bio 100% (Ponikau i sar., 1999). Lackner i saradnici su pokazali da se gljive mogu detektovati u nazalnom mukusu neonatusa u 20% slučajeva. Nakon 4 meseca od rođenja, praćenjem istih pacijenata, kultivacijom je dokazano prisustvo gljiva u mukusu neonatusa u 17 od 18 beba (94%) (Lackner i sar., 2005). Činjenica da je mukus iz sinusa većine (80%) novorođenčadi bio negativan na prisustvo gljiva po rođenju, a skoro 100% nakon 4 meseca o rođenja korišćenjem istih metoda u istoj populaciji, govori protiv tvrdnji da je laboratorijska kontaminacija uzročnik pozitivnih kultura na prisustvo gljiva. Iako ovi dokazi ukazuju da je kontaminacija kulture u navedenim studijama sa visokim procentom pozitivnog nalaza gljiva malo verovatna, ipak se ne mogu isključiti geografske razlike ili kontaminacija vazduha sporama gljiva u bolnicama, posebno tokom uzorkovanja (Ferguson i sar., 2004).

U našoj studiji, kod operisanih pacijenata sa NP, primenom metode obrade tkiva do jednoćelijske suspenzije, dokazano je 13 izolata: *Aspergillus flavus* (8/13), *A. niger* (4/13) i *Alternaria* (1/13), a kod neoperisanih HRS pacijenata, primenom ISNS\_komb metode, dokazano je 57 izolata iz 6 rodova: *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*), *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria* i *Fusarium*.

Utvrđene vrste gljiva se nisu razlikovale u fiziološkim i patološkim stanjima, osim za *A. fumigatus* koji je značajno dominirao kod pacijenata sa AGRS.

Kako je mikologija nauka koja se intenzivno razvija poslednje dve decenije, tako se menjala terminologija i kriterijumi za dijagnozu GRS. Katzenstein je sa saradnicima 1983. godine izolovao *Aspergillus* iz mukusa paranazalnih sinusa pacijenata sa HRS+NP, i prvi put ga imenovao sa "alergijski *Aspergillus*-sinuzitis" zbog histološke sličnosti sa ABPA (Katzenstein i sar., 1983). Alergijski *Aspergillus*-sinuzitis je definisan kao oblik HRS koji karakteriše prisustvo "alergijskog mucina" - gustog, tamno prebojenog mukusa koji sarži aggregate nekrotičnih Eo, ćelijskog debrisa, oslobođenih eozinofilnih granula, epitelne ćelije respiratornog trakta, Charcot-Leyden-ove kristale i hife gljive roda *Aspergillus* („peanut-butter like“ mucin) (Katzenstein i sar., 1983). Kasnije je naziv oboljenja promenjen u "AGRS, nakon što su i druge gljive izolovane iz alergijskog mucina (Robson i sar., 1989). Bent i Kuhn su 1994. godine predložili 5 kriterijuma za dijagnozu AGRS, bazirano na kliničkim nalazima 15 pacijenata:

- (i) NP
- (ii) alergijski mucin
- (iii) CT nalaz koji ukazuje na HRS
- (iv) pozitivan nalaz gljiva u DMP kliničkog uzorka ili sa kulture
- (v) I tip hipersenzitivnosti dijagnostikovao na osnovu anamneze, serologije ili SPT (Kupferberg i sar., 1997).

DeShazo i Swain su 1995. godine u pregledu postojeće literature sa analizom 98 pacijenata sa AGRS pokazali da su 3/4 ovih pacijenata sa dijagnostikovanim AGRS bili atopičari. Ovim nalazom je pobijen kriterijum za AGRS Bent i Kuhn-a koji se odnosi na I tip preosetljivosti (DeShazo i Swan, 1995).

Iako je AGRS prethodno smatran oboljenjem sa niskom incidencom, Ponikau je sa saradnicima pokazao da je AGRS mnogo češći nego što se smatralo prethodno, objavivši studiju gde je bilo dokazano prisustvo gljiva kod gotovo svih ispitanih pacijenata sa HRS (96%) (Ponikau i sar., 1999). Obzirom da su svi ispitanici u studiji ispunili kriterijume za

AGRS modifikovane od strane deShazo i Swain-a (DeShazo i Swan, 1995), Ponikau je sa saradnicima predložio da termin AGRS koji ukazuje na imuni odgovor posredovan IgE At, bude zamenjen sa "eozinofilni gljivični rinosinuzitis" (EGRS) i da termin alergijski mucin bude zamenjen pojmom eozinofilni mucin (Ponikau i sar., 1999).

Ferguson je 2000. godine uradio pregled literature i prikazao nove slučajeve HRS histološki slične AGRS (kao što su prethodno opisali deShazo i Swain) (DeShazo i Swain, 1994), osim što je pokazano odsustvo gljivičnih hifa, i ovo stanje nazvao eozinofilni mucinozni rinosinuzitis (EMRS). Ferguson je 2000. godine dao pretpostavku da je AGRS alergijski odgovor predisponiranih osoba na prisustvo gljiva u sinusima, dok je EMRS rezultat sistemske disregulacije u imunom odgovoru pacijenta (Ferguson, 2004). U tabeli 48 su hronološki sumirani kriterijumi za dijagnozu AGRS i imena koja su korišćena za naziv ovog oboljenja. Iako većina autora u svojim studijama generalno koristi naziv AGRS za neinvazivni gljivični rinosinuzitis, trebalo bi imati na umu da kriterijumi korišćeni za dijagnizu AGRS variraju između studija, čime je otežavana interpretacija i poređenje rezultata. Smatra se da je broj dijagnostikovanih GRS putem ovih kriterijuma samo vrh ledenog brega te je od velikog značaja evaluacija postojećih kriterijuma za dijagnozu GRS i formiranje novog dijagnostičkog protokola.

**Tabela 48.** Hronološki prikaz studija o dijagnostičkim kriterijumima GRS

Kriterijum	Katzenstein i sar., 1983	Bent i Kuhn., 1996	DeShazo i Swain, 1995	Pokinau i sar., 1999	Ferguson, 2004
Pozitivan nalaz gljiva na kulturi	X	X	X	X	
I tip preosetljivosti		X			
Alergijski eozinofilni mucin	X	X	X	X	X
Rtg i CT nalaz HRS	X	X	X	X	X
NP	X	X	X		X
Naziv bolesti	<i>Aspergillus</i> GRS	AGRS	AGRS	EGRS	Eozinofilni mucin

U našoj studiji, primenom i evaluacijom kliničkih i alergološko-rinoloških kriterijuma izvršena je selekcija HRS pacijenata i određena je težina HRS. Na osnovu kriterijuma „dokazane“ gljive u sinusima i izvršene regresione analize izdvojeno je 10 kriterijuma koji vrše predikciju GRS ( $GRS_{index2}$ ):

- Težak HRS prema SNOT-22 testu (dimenzije: orofaringealni simptomi i nazalni simptomi)
- Težak HRS prema rinoskopsko-kliničkom nalazu
- Dugotrajan HRS ( $\geq 5$  godina)
- Odsustvo povoljnog efekta lokalne kortikosteroidne terapije primenjene  $\geq 3$  meseca
- NP-rekalcitrantni i/ili reFESS
- Izražene CT promene u sinusima ( $\geq 2/3$  zadebljanja sluznice, ispunjenost sinusa)
- Pozitivna reakcija na standardne IA (SPT+ za najmanje 3 IA, od toga za 1 gljivični IA)
- Visoko pozitivna specifična anti-gljivična IgE At klase 3-6 ( $> 3.5$  IU/ml)
- Visoko pozitivna ukupna IgE At ( $> 1000$  IU/ml)
- Visoko pozitivan broj Eo u krvi ( $> 500$  mm<sup>3</sup>)

Za svaki kriterijum je oformljen sistem bodovanja ( $index_0$ ;  $index_1$ ;  $index_2$ ) za definisanje „major“ ( $GRS_{index_2}$ ) i „minor“ kriterijuma ( $GRS_{index_1}$ ). Broj definisanih „major“ i „minor“  $GRS_{index}$  kriterijuma koji su neophodni za predikciju GRS je potrebno naknadno utvrditi kroz naredne studije. Nalaz gljiva u gornjem RT kod HRS pacijenata zahteva pravilnu interpretaciju koja zavisi od primenjenih metoda za detekciju gljiva i od kliničkih i epidemioloških podataka. Primenom rutinske metode za detekciju gljiva (BSN), novo-formiranih metoda (ISNS\_L, ISNS\_A i jednoćelijska suspenzija NP) i algoritma za kliničku predikciju GRS moguće je pravilno interpretirati nalaz gljiva u fiziološkim i patološkim stanjima (tabela 46).

Izvršena je klasifikacija nalaza gljiva u sinusima na fiziološki nalaz (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološki nalaz, a na osnovu: (i) pozitivnih nalaza gljiva u sinusima primenom metoda BSN, ISNS\_L, ISNS\_A i/ili ISNS\_komb i (ii) definisanog  $GRS_{index_2}$ :

- fiziološko stanje (kolonizacija/mikrobiom):
  - jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima BSN metode;
- patološko stanje:
  - jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima primenom metode obrade NP do jednoćelijske suspenzije ili ISNS\_A ili ISNS\_komb ili dva uzastopna pozitivna nalaza gljiva u sinusima ISNS\_L metodom.

Nakon razvijanja pouzdanih, senzibilnih i reproducibilnih metoda za pravilno uzorkovanje ISNS i dokazivanje gljiva u sinusima i evaluacije novo-formiranih metoda, potrebno je usmeriti istraživanja ka lečenju dokazanih GRS. U studiji Bent i Kuhn-a iz 1997. godine,

ispitana je osetljivost 22 gljivične kulture izolovane iz lavata sinusa 15 AGRS pacijenata, na 5 najčešćih antigljivičnih lekova (ketokonazol, amfotericin B/AmB, itrakonazol, nistatin i flukonazol). Ketokonazol i AmB su se pokazali kao najefikasniji, ne zavisno od ispitivane vrste gljiva (Bent i Kuhn, 1996). AmB se pokazao kao efikasan u lečenju većine najčešćih gljiva izolovanih iz nosa i paranazalnih sinusa (Wildfeuer i sar. 1998). Uprkos svojoj kliničkoj efikasnosti, sistemska terapija AmB je limitirana brojnim neželjenim dejstvima, uključujući groznicu, povraćanje, dijareju i neutropeniju, kao i toksični delovanje na jetru i bubrege. Lokalna primena ovog AM bi mogla imati efekta na lokalnu sluznicu nosa i paranazalnih sinusa, bez rizika za nastanak sistemskih neželjenih dejstava. Brojni autori su u novijim studijama pokušavali da daju odgovor na pitanje da li bi lokalna primena AM imala efekta na razvoj i težinu HRS.

Tokom 2002. godine, lekari u Mayo klinici, SAD, lečili su 51 pacijenta sa HRS AmB intranazalnom primenom (Ponikau i sar., 2007). Nakon 3 meseca terapije, 38/51 pacijenta (75%) su imali poboljšanje simptoma vezanih za HRS i bolji rinoskopski skor. Iako je kod 12/13 pacijenata pokazano poboljšanje u CT nalazu maksilarnih sinusa, trebalo bi obratiti pažnju na činjenicu da su smanjenje debljine mukoze i CT snimak maksilarnih sinusa, loše korelirali sa skorom subjektivnih skala za merenje intenziteta simptoma (Bhattacharyya i sar., 1997). Dodatno, samo je 13 od 51 pacijenta urađen kontrolni CT snimak, te treba uzeti u obzir moguću pristrasnost u selekciji ispitanika. Kako u studiju nije bila uključena "placebo" grupa, ostaje nejasno da li je lapaža sinusa AmB zaista imala terapijskog efekta. Naredne godine, sprovedena je još jedna klinička studija bez kontrolne grupe, koja je uključila lečenje 74 pacijenta sa lokalnim AmB tokom 4 nedelje, ispitivajući uticaj intranazalne primene AmB na stadijum NP (Wildfeuer i sar., 1998). Potpuno povlačenje NP je pokazano kod 29/74 pacijenta (39%). Međutim, ni jedan od pacijenata sa NP koji ispunjavaju kompletan nosni kavum nije pozitivno odreakovao na terapiju, sugerišući da je gradus NP i ekstenzivnost procesa ključna determinanta koju uslovljava ishod lečenja. Pored gradusa NP, važan prognostički paramater je i podatak o prethodnom FESS-u. Pacijenti sa FESS-om su pokazali bolji odgovor na terapiju nego pacijenti bez prethodnog uklanjanja inflamirane mukoze sinusa i/ili NP endoskopskom hirurškom intervencijom (Wildfeuer i sar., 1998). Ovo bi moglo da se objasni boljim prodorom leka u sluznicu nakon FESS-om otklonjene inflamirane mukoze i NP. Randomizirana, dvostruko slepa, placebo kontrolisana studija, koja je uključila 78 pacijenata sa HRS, nije pokazala značajno kliničko poboljšanje nakon 8-nedeljnog nazalnog korišćenja kapi sa AmB (Taylor i sar., 2002). Iako je pokazano da je

prodornost AmB putem kapi značajno lošija od prodornosti AmB putem nazalne lavaže pogotovo u kvadripedalnom položaju tela (Wildfeuer i sar., 1998), skale za merenje subjektivne ocene težine simptoma su pokazale da su se simptomi značajno pogoršali nakon primene nazalnog spreja sa AmB. Svi drugi klinički parametri, uključujući CT skor za merenje opacifikacije maksilarnih sinusa, QoL skorovi, rinoskopski/endoskopski skor i prisustvo gljiva u nazalnom lavatu, se nisu značajno razlikovali između lečene i placebo grupe. Nijedan od navedenih parametara nije ukazao na poboljšanje stanja u grupi pacijenata kod kojih su pre terapije izolovane gljive iz nazalnog lavata, a nakon ponovnog uzorkovanja nakon terapije AmB nisu bile detektovane.

Primarni korak ka lečenju GRS je pravilna dijagnostika. Za uspostavljanje tačne i pravovremene dijagnoze najvažnije je uvođenje, primena i evaluacija novih, pouzdanih, senzitivnih i reproducibilnih metoda za dokazivanje gljiva u sinusima, kao i formiranje kritirijuma za interpretaciju njihovog nalaza u fiziološkim i patološkim stanjima kod pacijenata sa HRS. Od velikog značaja su i formirani klinički algoritmi, laboratorijski protokoli i utvrđivanje faktora rizika za GRS čime je omogućeno dizajniranje novih istraživanja, a pre svega onih koja prate klinički tok GRS i primenu/efikasnost anti-gljivične lokalne terapije.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Primenom i evaluacijom kliničkih i alergološko-rinoloških kriterijuma je izvršena selekcija HRS pacijenata i određena težina HRS, a na osnovu kriterijuma „dokazane“ gljive u sinusima i izvršene regresione analize je izdvojeno 10 kriterijuma koji vrše predikciju GRS ( $GRS_{index2}$ ):

- Težak HRS prema SNOT-22 testu (dimenzije: orofaringealni simptomi i nazalni simptomi)
- Težak HRS prema rinoskopsko-kliničkom nalazu
- Dugotrajan HRS ( $\geq 5$  godina)
- Odsustvo povoljnog efekta lokalne kortikosteroidne terapije primenjene  $\geq 3$  meseca
- NP-rekalcitrantni i/ili reFESS
- Izražene CT promene u sinusima ( $\geq 2/3$  zadebljanja sluznice, ispunjenost sinusa)
- Pozitivna reakcija na standardne IA (SPT+ za najmanje 3 IA, od toga za 1 gljivični IA)
- Visoko pozitivna specifična anti-gljivična IgE At klase 3-6 ( $> 3.5$  IU/ml)
- Visoko pozitivna ukupna IgE At ( $> 1000$  IU/ml)
- Visoko pozitivan broj Eo u krvi ( $> 500$   $mm^3$ )

Za svaki kriterijum je oformljen sistem bodovanja ( $index0$ ;  $index1$ ;  $index2$ ) za definisanje „major“ ( $GRS_{index2}$ ) i „minor“ kriterijuma ( $GRS_{index1}$ ). Broj definisanih „major“ i „minor“  $GRS_{index}$  kriterijuma koji su neophodni za predikciju GRS je potrebno naknadno utvrditi.

2. Optimizovan je protokol za uzorkovanje i obradu tkiva (metoda obrade NP do jednoćelijske suspenzije) i sekreta/mucina (ISNS\_A, ISNS\_L i ISNS\_komb). Visok procenat nalaza gljiva je utvrđen primenom metode obrade NP do jednoćelijske suspenzije kod reFESS pacijenata (42.1%), ISNS\_L sa PT kod neoperisanih pacijenata (24.5%) i jednoćelijske suspenzije NP kod pFESS pacijenata (23.2%), a nizak kod neoperisanih pacijenata primenom ISNS\_A sa PT (10%) i kod neoperisanih pacijenata promenom BSN sa PT (5.3%).

3. U odnosu na 10 izdvojenih kriterijuma koji vrše predikciju GRS ( $GRS_{index}$ ) i rezultata metoda ISNS (odsustvo i prisustvo gljiva u sinusima) izvršena je evaluacija ISNS metoda. Najviše vrednosti Sp/Sn su pokazane za ISNS\_komb metod kada je primenjen PT (89%;



96%), a najviše PPV/NPV su pokazane za ISNS\_komb metod (94%; 93%) i ISNS\_L metod (93%; 87%) kada je primenjen PT.

4. Izvršena je klasifikacija nalaza gljiva u sinusima na fiziološki nalaz (kolonizacija/mikrobiom sinusa) i patološki nalaz, a na osnovu: (i) pozitivnih nalaza gljiva u sinusima primenom metoda BSN, ISNS\_L, ISNS\_A i/ili ISNS\_komb i (ii) definisanog GRS<sub>index2</sub>:

- fiziološko stanje (kolonizacija/mikrobiom):
  - jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima BSN metode;
- patološko stanje:
  - jedan pozitivan nalaz gljiva u sinusima primenom metode obrade NP do jednoćelijske suspenzije ili ISNS\_A ili ISNS\_komb;
  - dva uzastopna pozitivna nalaza gljiva u sinusima ISNS\_L metodom.

5. U vazduhu životnog prostora pacijenata je dokazano 224 izolata gljiva iz 9 rodova: *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*) *Penicillium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Chrysosporium* i *Ulocladium*. Najzastupljeniji su bili *A. niger* (62/224) i *Penicillium* spp. (29/224).

Kod operisanih pacijenata sa NP, primenom jednoćelijske suspenzije, dokazano je 13 izolata: *Aspergillus flavus* (8/13), *A. niger* (4/13) i *Alternaria* (1/13), a kod neoperisanih HRS pacijenata, primenom ISNS\_komb metode, dokazano je 57 izolata iz 6 rodova: *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*), *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria* i *Fusarium*.

Utvrđene vrste gljiva se nisu razlikovale u fiziološkim i patološkim stanjima, osim za *A. fumigatus* koji je značajno dominirao kod pacijenata sa AGRS.

6. U ovoj studiji su pokazane sledeće prevalencije: HRS (13.8%), NP (4.2%), GRS (2.8%), AGRS (1.5%), nealergijski GRS (1.3%) i invazivni GRS 0% kod grupe HRS pacijenata od kojih je formirana *online* baza sa programom za automatsku kategorizaciju GRS, personalizovanu dijagnostiku i praćenje (*e-SINONAZAL-LabNet*) (<http://beta.wings.rs/mikolab/web/>).

## **7. LITERATURA**

Alexiou A, Sourtzi P, Dimakopoulou K, Manolis E, Velonakis E. Nasal polyps: heredity, allergies, and environmental and occupational exposure. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2011, 40:58–63.

Alobid I, Cardelus S, Benitez P, Guilemany JM, Roca-Ferrer J, Picado C. Persistent asthma has an accumulative impact on the loss of smell in patients with nasal polyposis. *Rhinology* 2011, 49:519-24.

Ali MS, Hutton DA, Wilson JA. Major secretory mucin expression in chronic sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005, 133:423–8.

Anand VK. Epidemiology and economic impact of rhinosinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004, 113(5).

Arsenijević VA, Barać A, Pekmezović M, Stošović R, Pender I. Allergic fungal sinusitis--new aspects of clinical features, laboratory diagnosis and therapy. *Srp Arh Celok Lek* 2013,141(9-10):698-704.

Ahmad N, Alam MK, Shehbaz A, Khan A, Mannan A, Hakim SR, Bisht D, Owais M. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. *J Drug Target* 2005, 13(10):555-61.

Ashraf N, Bhattacharyya N. Determination of the "incidental" Lund score for the staging of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001, 125(5):483–6.

Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008, 8:34-8.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* 2008, 46(2):446-75.

Barać A, Pekmezović M, Tomić Spirić V, Trivić A, Marinković J, Pekić S, Arsić Arsenijević V. Chronic rhinosinusitis: association of recalcitrant nasal polyposis and fungal finding in polyp's single-cell suspension. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2015. DOI: 10.1007/s00405-015-3511-2

Barać A, Pekmezović M, Luković I. Bukvar medicinski značajnih gljiva. Centar za inovacije u mikologiji. Beograd, 2012.

Basu S, Georgalas C, Kumar BN, Desai S. Correlation between symptoms and radiological findings in patients with chronic rhinosinusitis: an evaluation study using the Sinonasal

Assessment Questionnaire and Lund-Mackay grading system. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005, 262(9):751-754.

Bauchau S, Durham R. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 2004, 24(5):758-764.

Beenhouwer DO, Yoo EM, Lai CW, Rocha MA, Morrison SL. Human immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but not IgG1 or IgG3, protect mice against *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* 2007, 75(3):1424-35.

Bergamini BM, Grillenzoni S, Andreoni AD, Natali P, Ranzi A, Bertolani MF. *Alternaria* spores at different heights from the ground. *Allergy* 2004, 59(7):746-52.

Bernstein JM. The molecular biology of nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001, 1:262-7.

Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006, 134(6):991-6.

Bent JP 3rd, Kuhn FA. Allergic fungal sinusitis/polyposis. *Allergy Asthma Proc* 1996, 17(5):259-68.

Benninger MS, Sindwani R, Holy CE, Hopkins C. Early versus Delayed Endoscopic Sinus Surgery in Patients with Chronic Rhinosinusitis: Impact on Health Care Utilization. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015.

Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992, 146(2):500-6.

Bhattacharyya T, Piccirillo J, Wippold FJ. Relationship between patient based descriptions of sinusitis and paranasal sinus CT. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997, 123(11):1189-1192.

Bhattacharyya N. The economic burden and symptom manifestations of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2003, 17(1):27-32.

Bhattacharyya N. A comparison of symptom scores and radiographic staging systems in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2005, 19(2):175-179.

Bhattacharyya N. The role of CT and MRI in the diagnosis of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010; 10(3):171-174.

Birch DS, Saleh HA, Wodehouse T, Simpson IN, Mackay IS. Assessing the quality of life for patients with chronic rhinosinusitis using the "Rhinosinusitis Disability Index". *Rhinology*. 2001 Dec;39(4):191-6.

Bisht V, Singh BP, Arora N, Gaur SN, Sridhara S. Antigenic and allergenic cross-reactivity of *Epicoccum nigrum* with other fungi. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002 Sep;89(3):285-91.

Blumstein GI, Tuft L. Allergy treatment in recurrent nasal polyposis: its importance and value. *Am J Med Sci* 1957;234:269-80.

Bunnag C, Pacharee P, Vipulakom P, Siriyananda C. A study of allergic factor in nasal polyp patients. *Ann Allergy* 1983;50:126-32.

Borish L. Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec;112(6):1021-31.

Baudoin T, Cupić H, Geber G, Vagić D, Grgić M, Kalogjera L. Histopathologic parameters as predictors of response to endoscopic sinus surgery in nonallergic patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 May;134(5):761-6.

Bousquet J, Demoly P, Jaffuel D, Chung KF, Michel FB, Godard P. Pharmacological specificities and modalities of prescriptions for corticoids for asthmatic adults. *Presse Med*. 1996 Dec 21;25(40):2025-30.

Bradley DT, Kountakis SE. Correlation between computed tomography scores and symptomatic improvement after endoscopic sinussurgery. *Laryngoscope*. 2005;115(3):466-9.

Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 May;31(5):472-7.

Braun H, Stammberger H, Buzina W, Freudenschuss K, Lackner A, Beham A. Incidence and detection of fungi and eosinophilic granulocytes in chronic rhinosinusitis. *Laryngorhinootologie*. 2003 May;82(5):330-40.

Buzina W, Braun H, Freudenschuss K, Lackner A, Habermann W, Stammberger H. Fungal biodiversity-as found in nasal mucus. *Med Mycol*. 2003 Apr;41(2):149-61.

Caplin I, Haynes JT, Spahn J. Are nasal polyps an allergic phenomenon? *Ann Allergy* 1971, 29:631-4.

Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* 1995, 78(3):264-9.

Catten MD, Murr AH, Goldstein JA, Mhatre AN, Lalwani AK. Detection of fungi in the nasal mucosa using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 2001, 111(3):399-403.

Chakrabarti A, Denning DW, Ferguson BJ, Ponikau J, Buzina W, Kita H, Marple B, Panda N, Vlaminck S, Kauffmann-Lacroix C, Das A, Singh P, Taj-Aldeen SJ, Kantarcioglu AS, Handa KK, Gupta A, Thungabathra M, Shivaprakash MR, Bal A, Fothergill A, Radotra BD (2009) Fungal rhinosinusitis: a categorization and definitional schema addressing current controversies. *Laryngoscope* 2009, 119(9):1809-18.

Chen Y, Dales R, Lin M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope* 2003, 113:1199–1205.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, 10th ed. M2-A10. 2009 CLSI, Wayne, PA.

Cohen NA, Widelitz JS, Chiu AG, Palmer JN, Kennedy DW: Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2006, 134:601–604.

Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2001, 91(3):492-7.

Cruz A, Saenz de Santamaría M, Martínez J, Martínez A, Guisantes J, Palacios R. Fungal allergens from important allergenic fungi imperfecti. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1997, 25(3):153-8.

Silva Cde B, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Braz J Infect Dis* 2008, 12(1):63-6.

Deal T, Kountakis S. Significance of nasal polyps in chronic rhinosinusitis: symptoms and surgical outcomes. *Laryngoscope* 2004, 114: 1932–5.

DeConde AS, Mace JC, Smith TL. The impact of comorbid migraine on quality-of-life outcomes after endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* 2014, 124(8):1750-5.

DeShazo RD, Swain RE. Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995, 96(1):24-35.

DeShazo RD, Chaplin K, Swain RE. Fungal sinusitis. *N Engl J Med* 1997, 337:254-259.

Dudvarski Z, Pender I, Đukić V, Janošević Lj, Mikić A. The analysis of clinical characteristics of the chronic rhinosinusitis: complicated and uncomplicated form. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008, 265(8): 923–7.

Durr DG, Desrosiers MY, Dassa C. Impact of rhinosinusitis in health care delivery: the Quebec experience. *J Otolaryngol* 2001, 30(2):93-7.

Drake-Lee AB. Histamine and its release from nasal polyps: preliminary communication. *J R Soc Med* 1984, 77:120-4.

Drettner B, Johansson P, Kumlien J. Experimentally induced sinusitis: the importance of vasomotor regulation. *Arch Otorhinolaryngol* 1989, 246:315–7.

Ebbens FA, Georgalas C, Rinia AB, van Drunen CM, Lund VJ, Fokkens WJ. The fungal debate: where do we stand today? *Rhinology* 2007, 45(3):178-89.

Einarsson R, Aukrust L. Allergens of the fungi imperfecti. *Clin Rev Allergy* 1992, 10(3):165-90.

Eloy P, Poirrier AL, De Dorlodot C, Van Zele T, Watelet JB, Bertrand B. Actual concepts in rhinosinusitis: a review of clinical presentations, inflammatory pathways, cytokine profiles, remodeling, and management. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011, 11(2):146-162.

English G. Nasal polyposis. In: GM E, editor. *Otolaryngology*. Philadelphia: Harper and Row; 1985. Chapter 19, p. 1-21.

Esch RE. Grass pollen allergens. *Clin Allergy Immunol* 2004, 18:185-205.

Ferguson BJ. Categorization of eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004, 12(3):237-242.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, Georgalas C, Goossens H, Harvey R, Hellings P, Hopkins C, Jones N, Joos G, Kalogjera L, Kern B, Kowalski M, Price D, Riechelmann H, Schlosser R, Senior B, Thomas M, Toskala E, Voegels R, Wang de Y, Wormald PJ. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012, 50(1):1-12.

Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl* 2007, 20:1–136.

Fokkens W, Lund V, Bachert C, Clement P, Hellings P, Holmstrom M, Jones N, Kalogjera L, Kennedy D, Kowalski M, Malmberg H, Mullol J, Passali D, Stammberger H, Stierna

- P; EAACI.EAACI position paper on rhinosinusitis and nasal polyps executive summary. *Allergy* 2005,60(5):583-601.
- Ford RL, Barsam A, Velusami P, et al. Drainage of the maxillary sinus: a comparative anatomy study in humans and goats. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2011, 40:70–4.
- Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald PJ. Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2009, 23(6):556-61.
- Friedman GC, Hartwick RW, Ro JY, Saleh GY, Tarrand JJ, Ayala AG. Allergic fungal sinusitis. Report of three cases associated with dematiaceous fungi. *Am J Clin Pathol* 1991, 96(3):368-72.
- Giger R, Dulguerov P, Quinodoz D, Leuba D, Landis BN, Lacroix JS, Friedrich JP. Chronic panrhinosinusitis without nasal polyps: long-term outcome after functional endoscopic sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004, 131(4):534-41.
- Gliklich RE, Metson R. The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995,113:104–109.
- Gordts F, Clement PA, Buisseret T. Prevalence of sinusitis signs in a non-ENT population. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1996, 58:315–319.
- Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008, 8: 205-217.
- Gupta R, Singh BP, Sridhara S, Gaur SN, Kumar R, Chaudhary VK, Arora N. Allergenic cross-reactivity of *Curvularia lunata* with other airborne fungal species. *Allergy* 2002, 57(7):636-40.
- Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Burden of allergic disease in the UK: secondary analyses of national databases. *Clin Exp Allergy* 2004, 34: 520-526.
- Greenberger PA, Patterson R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and the evaluation of the patient with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988, 81: 646-650.
- Hackett TL, Knight DA. The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007, 7(1):63-8.
- Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, Bousquet PJ, Brozek G, Bruno A, Dahlén SE, Forsberg B, Gunnbjörnsdóttir M, Kasper L, Krämer U, Kowalski ML, Lange B, Lundbäck B, Salagean E, Todo-Bom A, Tomassen P, Toskala E, van Drunen CM, Bousquet J, Zuberbier T, Jarvis D, Burney P: Chronic rhinosinusitis in Europe - an underestimated disease. A GA(2) LEN study. *Allergy* 2011, 66(9):1216–1223.



Havas TE, Motbey JA, Gullane PJ. Prevalence of incidental abnormalities on computed tomographic scans of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988, 114(8):856-859.

Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy* 2011, 66:579-87.

Hens G, Vanaudenaerde B. M. Bullens D. M. A., Piessens M., Decramer M., Ceuppens J. L., Hellings P. W., Dupont L. J.. Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: united airway disease beyond the scope of allergy. *Allergy* 2008, 63: 261–267

Heinz-Otto Peitgen, Hartmut Jürgens, Dietmar Saupe, *Chaos and Fractals - New Frontiers of Science*, Springer Science, 2004.

Hirotsu M, Shiozawa A, Ono N, Miwa M, Kikuchi K, Ikeda K. Fungal extracts detected in eosinophilic chronic rhinosinusitis induced cytokines from the nasal polyp cells. *Laryngoscope* 2014, 124(9):347-353.

Hoffman DR, Kozak PP Jr, Gillman SA, Cummins LH, Gallup J. Isolation of spore specific allergens from *Alternaria*. *Ann Allergy* 1981, 46(6):310-6.

Holbrook EH, Brown CL, Lyden ER, Leopold DA. Lack of significant correlation between rhinosinusitis symptoms and specific regions of sinus computer tomography scans. *Am J Rhinol* 2005, 19(4):382-387.

Hopkins C, Gillett S, Slack R, Lund VJ, Browne JP. Psychometric validity of the 22-item Sinonasal Outcome Test. *Clin Otolaryngol* 2009, 34(5):447-54.

Hopkins C, Browne JP, Slack R, Lund V, Brown P. The Lund-Mackay grading system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007, 137(4):555-561.

Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal Allergens. *Clin Microbiol Rev* 1995, 8:161-179.

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T. Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice. *Respir Res* 2005, 6:106

Jani AL, Hamilos DL: Current thinking on the relationship between rhinosinusitis and asthma. *J Asthma* 2005, 42:1–7.

Jarett, L., A. C. Sonnenwirth. 1980. *Gradwohl's and parasitic infections*, 7th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Jarvis D, Newson R, Lotvall J, Hastan D, Tomassen P, Keli T. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy* 2012, 67:91-8.

Jiang RS, Su MC, Lin JF. Nasal mycology of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2005, 19(2):131-3.

Jones CA, Voaklander DC, Johnston DW, Suarez-Almazor MEJ. Health related quality of life outcomes after total hip and knee arthroplasties in a community based population. *Rheumatol* 2000, 27(7):1745-52.

Jones NS, Carney AS, Davis A. The prevalence of allergic rhinosinusitis: a review. *J Laryngol Otol* 1998, 112:1019-30.

Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde population-based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003, 112:625-9.

Johansson SGO, Bieber T, Dahl R. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the nomenclature review committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113:832-836.

Kakoi H, Hiraide F. A histological study of formation and growth of nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 1987, 103:137-44.

Katzenstein AL, Sale SR, Greenberger PA. Allergic Aspergillus sinusitis: a newly recognized form of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1983, 72(1):89-93.

Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis* 2000, 30(1):14-8.

Kenny TJ, Duncavage J, Bracikowski J, Yildirim A, Murray JJ, Tanner SB. Prospective analysis of sinus symptoms and correlation with paranasal computed tomography scan. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001, 125(1):40- 43

Kennedy Dw, Gwaltney JM, Jones JG. Medical management of sinusitis: educational goals and management guidelines. The International conference on Sinus Disease. *Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 1995, 16:22-30.

Kennedy DW. Prognostic factors, outcomes and staging in ethmoid sinus surgery. *Laryngoscope* 1992, 102:1-18.

- Kern R. Allergy: a constant factor in the etiology of so-called mucous nasal polyps. *J Allergy* 1993, 4:483.
- Khalid AN, Quraishi SA, Kennedy DW. Long-term quality of life measures after functional endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol* 2004, 18(3):131-6.
- Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS. Carum copticum and Thymus vulgaris oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus* spp. *Braz J Microbiol* 2014, 45(2):523-31.
- Kim YS, Kim NH, Seong SY, Kim KR, Lee GB, Kim KS: Prevalence and risk factors of chronic rhinosinusitis in Korea. *Am J Rhinol Allergy* 2011, 25(3):117–121.
- Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. *Allergy* 2005, 60:233-7.
- Kohiyama CY, Yamamoto Ribeiro MM, Mossini SA, Bando E, Bomfim Nda S, Nerilo SB, Rocha GH, Grespan R, Mikcha JM, Machinski M Jr. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem* 2015, 173:1006-10.
- Kountakis SE, Arango P, Bradley D, Wade ZK, Borish L. Molecular and cellular staging for the severity of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2004, 114: 1895–1905.
- Krause HF. Allergy and chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003,128:14-6.
- Kupferberg SB, Bent JP 3rd, Kuhn FA. Prognosis for allergic fungal sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997, 117(1):35-41.
- Kurup VP. Immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2000, 42(4):225-37.
- Lackner A, Stammberger H, Buzina W, Freudenschuss K, Panzitt T, Schosteritsch S, Braun H. Fungi: a normal content of human nasal mucus. *Am J Rhinol* 2005, 19(2):125-9.
- Larsen PL, Tos M. Origin of nasal polyps. *Laryngoscope* 1991, 101:305-12.
- Larsen K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. 1997. Settignano G LV, Bernstein JM, Tos M, editors. Rhode Island: Oceanside Publications.
- Lanza DC, Kennedy DW. Adult rhinosinusitis defined. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997, 117:1–7.

Licorish K, Novey HS, Kozak P, Fairshter RD, Wilson AF. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Imm* 1985, 76(6):819-25.

Lopez-Diaz TM, Flannigan B. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Int J Food Microbiol* 1997, 35(2):129-36.

Lui LY, Bates ME, Jagjour NN, Busse WW, Bertics PJ, Kelly EA. Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 2007, 179:4840-8.

Lund, V.J. Rhinosinusitis. *Br.J.Hosp.Med* 1997, 57:308-312.

Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993, 31:183-4.

Lund VJ, Kennedy DW. Quantification for staging sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995, 104:17-21.

Mace JC, Michael YL, Carlson NE, Litvack JR, Smith TL. Correlations between endoscopy score and quality of life changes after sinus surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010, 136(4):340-6.

Malekzadeh S, McGuire JF: The new histologic classification of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003, 3(3):221-226.

Malling HJ, Skov PS. Penicillin allergy--anamnesis and verification. *Ugeskr Laeger* 1992, 154(6):322

Marple BF, Mabry RL. Allergic fungal sinusitis: learning from our failures. *Am J Rhinol* 2000, 14(4):223-6.

Michaels L, Lloyd G, Phelps P. Origin and spread of allergic fungal disease of the nose and paranasal sinuses. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2000, 25(6):518-25.

Millar J, Johnston A, Lamb D. Proceedings of the Scottish Society Thoracic Society: Allergic Aspergillosis of the maxillary sinuses. *Thorax* 1981, 36:710.

Min YG, Jung HW, Kim HS, Park SK, Yoo KY. Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: results of a nationwide survey. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996, 253:435-9.

Mitakakis TZ, Tovey ER, Xuan W, Marks GB. Personal exposure to allergenic pollen and mould spores in inland New South Wales, Australia. *Clin Exp Allergy* 2000, 30(12):173-9.

Moore, G.E., and Woods L.K., Culture Media for Human Cells - RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 and GEM1717. Tissue Culture Association Manual 1976, 3:503-508.

Moloney JR. Nasal polyps, nasal polypectomy, asthma, and aspirin sensitivity. Their association in 445 cases of nasal polyps. *J Laryngol Otol* 1977, 10:837-846.

Mfuna-Endam L, Zhang Y, Desrosiers MY. Genetics of rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011, 11:236–246.

Nair S, Dutta A, Rajagopalan R, Nambiar S. Endoscopic sinus surgery in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis: a comparative study. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2011, 63(1):50-5.

Ng CY, Balantyne JA, Brenkel IJ. Quality of life and functional outcome after primary total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 2007, 89B868-873.

Noone PG, Bali D, Carson JL, Sannuti A, Gipson CL, Ostrowski LE, Bromberg PA, Boucher RC, Knowles MR. Discordant organ laterality in monozygotic twins with primary ciliary dyskinesia. *Am J Med Genet* 1999, 82(2):155-60.

Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett Appl Microbiol* 2003, 37(2):185-7.

Ohori J, Ushikai M, Sun D, Nishimoto K, Sagara Y, Fukiwa T. TNF- $\alpha$  upregulates VCAM-1 and NF- $\kappa$ B in fibroblasts from nasal polyps. *Auris Nasus Larynx* 2007, 34:177-83.

Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, Rodrigues AG. Anti-Candida activity of essential oils. *Mini Rev Med Chem* 2009, 9(11):1292-1305.

Pang JT, Eskici O, Wilson JA. Nasal polyposis: role of subclinical delayed food hypersensitivity. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000, 122:298-301.

Pant H, Kette FE, Smith WB, Wormald PJ, Macardle PJ. Fungal-specific humoral response in eosinophilic mucus chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005, 115(4):601-6.

Pawankar, R. and M. Nonaka. Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007, 7(3):202-208.

Pepys J. Immunopathology of allergic lung disease. *Clin Allergy* 1973, 3:1-22.

Pekic S, Arsenijevic VA, Gazibara MS, Milojevic T, Pendjer I, Stojanovic M, Popovic V. What lurks in the sellar? *Lancet* 2010, 375(30):432.

Peric Aleksandar, Procena efekata preoperativne primene klaritromicina u lečenju nosno-sinusne polipoze. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu. Kragujevac, Srbija 2014.

Peric Mirjana, Komparativna analiza kliničkog u mikrobiološkog nalaza kod pacijenata sa proteznim stomatitisom. Doktorska disertacija. Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija 2014.

Pfaar O, Demoly P, Gerth van Wijk R, Bonini S, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Jacobsen L, Malling HJ, Mösges R, Papadopoulos NG, Rak S, Rodriguez del Rio P, Valovirta E, Wahn U, Calderon MA. Recommendations for the standardization of clinical outcomes used in allergen immunotherapy trials for allergic rhinoconjunctivitis: an EAACI Position Paper. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Allergy* 2014, 69(7):854-67.

Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014, 79(2):198-204.

Pleis JR, Ward BW, Lucas JW: Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2009. *Vital Health Stat* 2010, 249:1–207.

Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* 1999, 74:877-84.

Ponikau JU, Sherris DA, Kita H. The role of ubiquitous airborne fungi in chronic rhinosinusitis. *Clin Allergy Immunol* 2007, 20:177-84.

Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol* 2008, 22(1):1-6.

Piccirillo JF, Merritt MG Jr, Richards ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT20). *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002, 126(1):41-7.

Pilan RR, Pinna FR, Bezerra TF, Mori RL, Padua FG, Bento RF, Perez-Novato C, Bachert C, Voegels R. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology* 2012, 50(2):129-38

Polzehl D, Weschta M, Podbielski A, Riechelmann H, Rimek D. Fungus culture and PCR in nasal lavage samples of patients with chronic rhinosinusitis. *J Med Microbiol* 2005, 54(1):31-7.

Portnoy J, Pacheco F, Ballam Y, Barnes C. Separation of *Alternaria* into protein and carbohydrate fractions with phenyl sepharose. *J Allergy Clin Immunol* 1991, 87(4):789-93.

Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117(2):450-6.

Ragab S, Scadding GK, Lund VJ, Saleh H. Treatment of chronic rhinosinusitis and its effects on asthma. *Eur Respir J* 2006, 28(1):68-74.

Randell AG, Nguyen TV, Bahlerao N, Silverman SL, Sambrook PN, Eisman JA. Deterioration in quality of life following hip fracture: a prospective study. *Osteoporosis Int* 2000, 13:296-302.

Ramadan HH, Fornelli R, Ortiz AO, et al. Correlation of allergy and severity of sinus disease. *Am J Rhinol* 1999, 13:345-7.

Rains BM, Mineck CW. Treatment of allergic fungal sinusitis with high-dose itraconazole. *Am J Rhinol* 2003, 17(1):1-8.

Rao AK, Mathers PH, Ramadan HH. Detection of fungi in the sinus mucosa using polymerase chain reaction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006, 134(4):581-5.

Rios, JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol* 1988, 23:127-49.

Robinson JL, Griest S, James KE, Smith TL. Impact of aspirin intolerance on outcomes of sinus surgery. *Laryngoscope* 2007, 117(5):825-30.

Rogers CA. Indoor fungal exposure. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003, 23(3):501-18.

Rugina M, Serrano E, Klossek J, Crampette L, Stoll D, Bebear JP. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France: the ORL group experience. *Rhinology* 2002, 40:75-9.

Sabouraud, R. Syphilol. *Ann Dermatol* 1892, 3:1061.

Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells *in vitro*. *Allergy* 2010, 65:1430-7.

Salvin RG, Cannon RE, Friedman WH, Palitang E, Sundaram M. Sinusitis and bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1980, 66:250-7.

Saji F, Nonaka M, Pawankar R. Expression of RANTES by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  stimulated nasal polyp fibroblasts. *Auris Nasus Larynx* 2000, 27:247-52.

Sawa Y, Sugimoto Y, Ueki T, Ishikawa H, Sato A, Nagato T, et al. Effects of TNF-alpha on leukocyte adhesion molecule expression in cultured human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem* 2007, 55:721-33.

Schalek P, Otruba L, Hahn A. Quality of life in patients with chronic rhinosinusitis: a validation of the Czech version of SNOT-22 questionnaire. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010, 267(3):473-5.

Sun S, Gao Y, Ling X, Lou H. The combination effects of phenolic compounds and fluconazole on the formation of ergosterol in *Candida albicans* determined by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2005, 336(1):39-45.

Sasama J, Sherris DA, Shin SH, Kephart GM, Kern EB, Ponikau JU. New paradigm for the roles of fungi and eosinophils in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005, 13:2-8.

Schwartz HJ, Thompson JS, Sher TH, Ross RJ. Occult sinus abnormalities in the asthmatic patients. *Arch Intern Med* 1987, 147:2194-6.

Serrano E, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Klossek JM, Chanal I, et al. Nasal polyposis in France: impact on sleep and quality of life. *J Laryngol Otol* 2005, 119:543-9.

Settipane GA, Chafee FH. Nasal polyps in asthma and rhinitis. A review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1977, 59:17-21.

Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps, 1997. Settipane G LV, Bernstein JM, Tos M, editors. Rhode Island: Oceanside Publications.

Shin SH, Heo WW. Effects of unilateral naris closure on the nasal and maxillary sinus mucosa in rabbit. *Auris Nasus Larynx* 2005, 32:139-43.

Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald PJ. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy* 2010, 24(3):169-74.

Smith TL, Mendolia-Loffredo S, Loehrl TA, Sparapani R, Laud PW, Nattinger AB. Predictive factors and outcomes in endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005, 115(12):2199-205.

Soler ZM, Mace J, Smith TL. Symptom-based presentation of chronic rhinosinusitis and symptom-specific outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol* 2008, 22(3):297-301.



Soler ZM, Smith TL. Quality-of-life outcomes after endoscopic sinus surgery: how long is long enough? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010, 143(5):621-5.

Starzyk J, Gruszecki M, Tutaj K, Luchowski R, Szlajak R, Wasko P, Grudzinski W, Czub J, Gruszecki WI. Self-association of amphotericin B: spontaneous formation of molecular structures responsible for the toxic side effects of the antibiotic. *J Phys Chem B* 2014, 118(48):13821-32.

Stewart MG, Donovan DT, Parke RB, Bautista MH. Does the severity of sinus computed tomography findings predict outcome in chronic sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000, 123(1):81-84.

Swärd-Nordmo M, Almeland TL, Aukrust L. Variability in different strains of *Cladosporium herbarum* with special attention to carbohydrates and contents of two important allergens (Ag-32 and Ag-54). *Allergy* 1984, 39(5):387-94.

Szczeklik A, Nizakowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network of Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J* 2000, 16:432-6.

Taylor MJ, Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Gaffey TA, Kephart G, Kita H. Detection of fungal organisms in eosinophilic mucin using a fluorescein-labeled chitin-specific binding protein. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002, 127(5):377-83.

Telmesani LM. Prevalence of allergic fungal sinusitis among patients with nasal polyps. *Ann Saudi Med* 2009, 29(3):212-214.

Terho E, Frew AJ. Type III allergy skin testing. Position statement for EAACI Subcommittee on Skin Tests and Allergen Standardization. *Allergy* 1995, 50(5):392-6.

Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 124:37-42.

Tomassen P, Van Zele T, Zhang N, Perez-Novo C, Van Bruaene N, Gevaert P, Bachert C. *Proc Am Thorac Soc* 2011, 8(1):115-20.

Toth L, Csomor P, Sziklai I, Karosi T. Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011, 268(10):1455-62.

Tosun F, Hidir Y, Saracli MA, Caliskaner Z, Sengul A. Intranasal fungi and chronic rhinosinusitis: what is the relationship? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007, 116:425-9.

Vailes LD, Perzanowski MS, Wheatley LM, Platts-Mills TA, Chapman MD. IgE and IgG antibody responses to recombinant Alt a 1 as a marker of sensitization to *Alternaria* in asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2001, 31(12):1891-5.

Van Agthoven M, Fokkens WJ, van de Merwe JP, van Marijke BE, Uyl-de Groot CA, Busschbach JJ. Quality of life of patients with refractory chronic rhinosinusitis: effects of filgrastim treatment. *Am J Rhinol* 2001, 15:231–237.

Van Oene CM, van Reij EJ, Sprangers MA, Fokkens WJ. Quality-assessment of disease-specific quality of life questionnaires for rhinitis and rhinosinusitis: a systematic review. *Allergy* 2007, 62(12):1359-71.

Vennwald I, Henker M, Klemm E, Seebcher C. Fungal colonization of the paranasal sinuses. *Mycoses* 1999, 42:33-36.

Vercelli D, Geha RS. Regulation of IgE synthesis: from the membrane to the genes. *Springer Semin Immunopathol* 1993, 15(1):5-16.

Vissers JL, van Esch BC, Hofman GA, Kapsenberg ML, Weller FR, van Oosterhout AJ. Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113(6):1204-10

Vijay HM, Huang H, Young NM, Bernstein IL. Studies on *Alternaria* allergens. I. Isolation of allergens from *Alternaria tenuis* and *Alternaria solani*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1979, 60(3):229-39.

Vleming M, Vries N. Endoscopic paranasal sinus surgery-results. *Am J Rhinol* 1990,4:13-17

Wang M, Shi P, Chen B, Zhang H, Gian J, Chen X. The role of superantigens in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008, 70:97-103.

Warfel JM, D'Agnillo F. Anthrax lethal toxin enhances TNF-induced endothelial VCAM-1 expression via an IFN regulatory factor-1-dependent mechanism. *J Immunol* 2008, 180:7516-24.

Wei JL, Kita H, Sherris DA, Kern EB, Weaver A, Ponikau JU. The chemotactic behavior of eosinophils in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2003, 113(2):303-6.

Wensing M, Vingerhoets E, Grol R. Functional status, health problems, age and comorbidity in primary care patients. *Qual Life Res* 2001, 10:141–148.

Weschta M, Rimek D, Formanek M, Polzehl D, Podbielski A, Riechelmann H. Topical antifungal treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a randomized, double-blind clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113(6):1122-8.

Wildfeuer A, Seidl HP, Paule I, Haberreiter A. In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses* 1998, 41(7-8):309-19.

Wright ED, Agrawal S. Impact of perioperative systemic steroids on surgical outcomes in patients with chronic rhinosinusitis with polyposis: evaluation with the novel Perioperative Sinus Endoscopy (POSE) scoring system. *Laryngoscope* 2007, 117(11):1-28.

Zhang Z, Han D, Zhang S, Han Y, Dai W, Fan E, et al. Biofilms and mucosal healing in postsurgical patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2009, 23(5):506-11.

Zheng Y, Zhao Y, Lv D, Liu Y, Qiao X, An P, Wang D. Correlation between computed tomography staging and quality of life instruments in patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2010, 24(1):41-5.

Yang YC, Lee HS, Lee SH, Clark JM, Ahn YJ. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura:Pediculicidae). *Int J Parasitol* 2005, 35(14):1595-600.

Yoshifuku K, Matsune S, Ohori J, Sagara Y, Fukuiwa T, Kurono Y. IL-4 and TNF- $\alpha$  increases the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration. *Rhinology* 2007, 45:235-41.

## **8. PRILOZI**

Prilog 1.       INFORMACIJA ZA PACIJENTE I OBRAZAC PRISTANKA ZA  
UČESTVOVANJE U ISTRAŽIVANJU

Naziv istraživanja: EVALUACIJA METODE INDUKCIJE SINONAZALNOG SEKRETA ZA DOKAZIVANJE GLJIVICA U SINUSIMA U FIZIOLOŠKIM I PATOLOŠKIM STANJIMA KOD PACIJENATA SA HRONIČNIM RINOSINUZITISIMA

U studiju su uključeni samo pacijenti koji daju dobrovoljni pristanak za učešće u istraživanju. Vi ste zamoljeni da učestvujete u istraživanju jer ispunjavate kriterijume potrebne za studiju.

### **Cilj istraživanja**

Glavni cilj istraživanja je da se ispita zastupljenost gljiva kod pacijenata sa sinuzitisom, da se uspostave dijagnostički kriterijumi, uvede pouzdana dijagnostička metoda za dijagnozu gljivičnih rinosinuzitisa i da se odredi pravovremena i pravilna terapija.

### **Plan istraživanja**

Istraživanje uključuje pacijente sa hroničnim rinosinuzitisima (HRS) i nazalnim polipima (NP) (ispitivana grupa) i pacijente bez HRS i NP (kontrona grupa). Pacijentima bi bila postavljena pitanja vezana za kliničke i laboratorijske podatke, kao i za opšte zdravstvene podatke. Zatim bi se pacijentima uzimao bris sluznice nosa, koji bi se analizirao na prisustvo gljiva i bakterija. Pacijent bi zatim inhalirao sterilan fiziološki hipertoni rastvor tokom 10 minuta. Sav medicinski materijal koji dolazi u kontakt sa pacijentom je sterilan.

Zatim bi se pacijentima sa HRS radila lavaža sadržaja iz sinusa sa direktnim izbacivanjem lavata na mikrobiološku hranljivu podlogu i aspiracija sadržaja iz sinusa, pomoću tankog katetera, pri čemu bi se vršila kolekcija aspirata. Procedura traje 15 minuta.

### **Rizik**

Kako su navedene procedure neinvazivne, ne postoji rizici vezani za njih.

## **Korist**

Želimo da ispitamo da li u gljive u značajnom broju uzročnici HRS i NP, te će Vaša uloga u tome, kao ispitanika, biti veoma velika. Doprinosite razvoju nove dijagnostičke metode i protokola, kao i razvoju lokalnih AM koji bi izlečili Vaše tegobe, kao i tegobe pacijenata sa istom ili sličnom problematikom.

## **Tajnost podataka**

Posebna pažnja biće posvećena očuvanju tajnosti podataka o pacijentima iz studije. Svi rezultati biće registrovani u kompjuterskoj bazi podataka, putem posebnog šifrovanog sistema. Identitet svakog ispitanika biće poznat samo lekaru koji sprovodi istraživanje.

## **Dobrovoljno učestvovanje i uslovi povlačenja iz istraživanja**

Vaše učesće u studiji je potpuno dobrovoljno. Ispitanici moraju biti svesni činjenice da se u svakom trenutku mogu povući iz istraživanja iz bilo kog razloga, a da pritom ne ugroze svoje buduće lečenje.

## **Pristanak pacijenta**

U okviru gore ponuđenog opisa „Plana istraživanja“ kao i dodatnog dokumenta „*Informacija za pacijente*“, opisan je postupak izvođenja istraživanja, kao i njegovi potencijalni rizici i koristi. Pročitao/la sam informaciju za pacijente, ona mi je bila razumljiva i pružila mi je dovoljno informacija o ispitivanju u kome bih učestvovao/la. Imao/la sam priliku da postavim pitanja vezana za ovo ispitivanje i dobio/la sam zadovoljavajuće odgovore.

Dobrovoljno pristajem na sve procedure navedene u planu istraživanja. Ne odričem se svojih zakonskih prava potpisom ovog informisanog pristanka. Dobiću potpisani primerak ovog informisanog pristanka.

Ime i prezime pacijenta

Redni broj ispitanika

Datum rođenja

-----

-----

-----\*

*Popunjava pacijent*

# A1

## SUBJEKTIVNA VIZUELNO ANALAGONA SKALA (VAS) TEŽINA SINONAZALNIH SIMPTOMA

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

JMBG: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Broj telefona: \_\_\_\_\_

1. Začepljen/otečen nos 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



2. Sekrecija iz nosa (niz ždrelo ili nozdre) 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



3. Smanjen osećaj mirisa ili potpuni izostanak mirisa 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



4. Bol/pritisak u paranasalnim šupljinama 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



5. Glavobolja 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



6. Ukupna ocena težine simptoma 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



## A2

## Upitnik - KVALITET ŽIVOTA SNOT-22\*

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

JMBG: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Broj telefona: \_\_\_\_\_

		Bez tegoba	Veoma slabe tegobe	Slabe tegobe	Umerene tegobe	Izražene Tegobe	Nepodnošljive tegobe
1.	Kijanje	0	1	2	3	4	5
2.	Curenje iz nosa	0	1	2	3	4	5
3.	Kašalj	0	1	2	3	4	5
4.	Vlažan nos	0	1	2	3	4	5
5.	Prisustvo vodenastog sekreta u nosu	0	1	2	3	4	5
6.	Prisustvo gustog sekreta u nosu	0	1	2	3	4	5
7.	Vrtoglavica	0	1	2	3	4	5
8.	Osećaj punoće u ušima	0	1	2	3	4	5
9.	Bol u ušima	0	1	2	3	4	5
10.	Bol ili pritisak na nekom delu lica	0	1	2	3	4	5
11.	Isprekiđan san	0	1	2	3	4	5
12.	Noćno buđenje zbog otežanog disanja	0	1	2	3	4	5
13.	Poteškoće vezane za spavanje	0	1	2	3	4	5
14.	Osećaj umora prilikom buđenja	0	1	2	3	4	5
15.	Iscrpljenost/zamor	0	1	2	3	4	5
16.	Smanjena produktivnost tokom dana	0	1	2	3	4	5
17.	Smanjena koncentracija	0	1	2	3	4	5
18.	Anksioznost (nervozna)	0	1	2	3	4	5
19.	Loše raspoloženje	0	1	2	3	4	5
20.	Neprijatan miris iz nosa	0	1	2	3	4	5
21.	Smanjen osećaj mirisa	0	1	2	3	4	5
22.	Blokada/otežano disanje na nos	0	1	2	3	4	5
<b>Ukupan SNOT-22 skor</b>							



# A3

## A DEO - ALERGOLOGIJA

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

JMBG: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Broj telefona: \_\_\_\_\_

### Alergologija (Position Paper EPOS 2012. Rhinol Suppl. 2012 1-298)

1. Skin prick test	0	negativan	<input type="checkbox"/>
	1	pozitivan na _____	<input type="checkbox"/>

2. Ukupan IgE	0	<100 U/ml	<input type="checkbox"/>
	1	100-500 U/ml	
	2	>500 U/ml	
	3	>1000 U/ml	

3. Eozinofili	0	0-350 mm <sup>3</sup>	<input type="checkbox"/>
	1	>350 mm <sup>3</sup>	

4. Metaholinski test	0	negativan	<input type="checkbox"/>
	1	pozitivan	

5. Hipersenzitivnost na Aspirin	0	ne	<input type="checkbox"/>
	1	da	

## B

## ORL

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

JMBG: \_\_\_\_\_

Broj telefona: \_\_\_\_\_

1. Dužina trajanja tegoba (u nedeljama)													
1a. Glavobolja/bol u predelu sinusa				1b. Nazalna drenaža				1c. Otežano disanje					
0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3		
0	1-4	4-12	>12	0	1-4	4-12	>12	0	1-4	4-12	>12		
2. Dužina korišćenja lekova (u nedeljama)													
2a. Antibiotici				2b. Topikalni kortikosteroidi				2c. Antihistaminici					
0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3		
0	1-4	4-12	>12	0	1-4	4-12	>12	0	1-4	4-12	>12		
3. Intenzitet simptoma													
0				1				2					
bez simptoma				umereni (povremeno)				izraženi (svakodnevno)					
4. Prethodna operacija sinusa/polipa													
0				1				2					
ne				da, jednom				da, više od jednog puta					
5. Uzrast u kome su počele tegobe													
0				1				2					
>7. godine				od 7.-18. godine				>18. god.					
1a. Polipi levo						1b. Polipi desno							
0	1		2			0	1		2				
odsutni	u srednjem nosnom hodniku		izvan srednjeg nosnog hodnika			odsutni	u srednjem nosnom hodniku		izvan srednjeg nosnog hodnika			a	<input type="checkbox"/>
											b	<input type="checkbox"/>	
2a. Edem levo						2b. Edem desno							
0	1		2			0	1		2				
odsutni	slabo izražen		jako izražen			odsutni	slabo izražen		jako izražen			a	<input type="checkbox"/>
											b	<input type="checkbox"/>	
3a. Sekret levo						3b. Sekret desno							
0	1		2			0	1		2				
odsutni	bistar, serozan		gust, mukopurulentan			odsutni	bistar, serozan		gust, mukopurulentan			a	<input type="checkbox"/>
											b	<input type="checkbox"/>	
4a. Kruste levo						4b. Kruste desno							
0	1		2			0	1		2				
odsutne	slabo izražene		jako izražene			odsutne	slabo izražene		jako izražene			a	<input type="checkbox"/>
											b	<input type="checkbox"/>	

**C**

**RADIOLOGIJA**

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

Uputna dijagnoza: \_\_\_\_\_

JMBG: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Broj telefona: \_\_\_\_\_

**1. Ocuvanost kontinuiteta zida sinusa**

<input type="checkbox"/>	<b>Frontalni sinus levo</b>		<b>Frontalni sinus desno</b>		<input type="checkbox"/>
	0	1	0	1	
	Ne	Da	Ne	Da	
<input type="checkbox"/>	<b>Etmoidalni sinus levo</b>		<b>Etmoidalni sinus desno</b>		<input type="checkbox"/>
	0	1	0	1	
	Ne	Da	Ne	Da	
<input type="checkbox"/>	<b>Maksilarni sinus levo</b>		<b>Maksilarni sinus desno</b>		<input type="checkbox"/>
	0	1	0	1	
	Ne	Da	Ne	Da	
<input type="checkbox"/>	<b>Sfenoidalni sinus levo</b>		<b>Sfenoidalni sinus desno</b>		<input type="checkbox"/>
	0	1	0	1	
	Ne	Da	Ne	Da	

**2. Debljina zida sinusa**

<input type="checkbox"/>	<b>Etmoidalni sinus</b>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<b>Sfenoidalni sinus</b>	<input type="checkbox"/>
	<b>Frontalni sinus</b>	<input type="checkbox"/>
	<b>Maksilarni sinus</b>	<input type="checkbox"/>

**3. Densitet (gustina) zida sinusa izražena u Haunsfeldovim jedinicama (HU)**

<b>Frontalni sinus levo</b>		<b>Frontalni sinus desno</b>	
Minimalna		Minimalna	
Maksimalna		Maksimalna	
Prosečna		Prosečna	
<b>Etmoidalni sinus levo</b>		<b>Etmoidalni sinus desno</b>	
Minimalna		Minimalna	
Maksimalna		Maksimalna	
Prosečna		Prosečna	
<b>Maksilarni sinus levo</b>		<b>Maksilarni sinus desno</b>	
Minimalna		Minimalna	
Maksimalna		Maksimalna	
Prosečna		Prosečna	
<b>Sfenoidalni sinus levo</b>		<b>Sfenoidalni sinus desno</b>	
Minimalna		Minimalna	
Maksimalna		Maksimalna	
Prosečna		Prosečna	

## D

## MIKROBIOLOGIJA

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

JMBG: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Broj telefona: \_\_\_\_\_

1. Prisustvo gljiva u direktnom mikroskopskom preparatu (DMP)		
0	1	2
negativan	suspektno prisustvo hifa	dokazano prisustvo hifa

2. Prisustvo Charcot Layd. kristala u DMP	
0	1
bez CL kristala	sa CL kristalima

3a. Kultura (bris leva nozdrva)				3b. Kultura (bris desna nozdrva)			
0	1	2	3	0	1	2	3
negativna	pozitivna na baterije	pozitivna na gljive	pozitivna i na bakterije i na gljive	negativna	pozitivna na baterije	pozitivna na gljive	pozitivna i na bakterije i na gljive

a 
b

4a. Kultura (inhalacija leva nozdrva)				4b. Kultura (inhalacija desna nozdrva)			
0	1	2	3	0	1	2	3
negativna	pozitivna na baterije	pozitivna na gljive	pozitivna i na bakterije i na gljive	negativna	pozitivna na baterije	pozitivna na gljive	pozitivna i na bakterije i na gljive

a 
b

5a. Kultura (aspirat levi sinus)				5b. Kultura (aspirat desni sinus)			
0	1	2	3	0	1	2	3
negativna	pozitivna na baterije	pozitivna na gljive	pozitivna i na bakterije i na gljive	negativna	pozitivna na baterije	pozitivna na gljive	pozitivna i na bakterije i na gljive

a 
b

6a. Prisustvo mucina u aspiratu (levi sinus)			6b. Prisustvo mucina u aspiratu (desni sinus)		
0	1	2	0	1	2
ne	da, nespecifičnog izgleda	da, specifičnog izgleda	ne	da, nespecifičnog izgleda	da, specifičnog izgleda

a 
b

Prilog 8. Upitnik E

# E

## EPIDEMIOLOGIJA

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

JMBG: 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Broj telefona: \_\_\_\_\_

### SOCIODEMOGRAFSKI PODACI

1. Pol		<input type="checkbox"/>
0	1	
M	Ž	

2. Uzrast							<input type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5	6	
16-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	>70	

3. Zanimanje (potencijalni kontakt sa alergenima/gljivama)		<input type="checkbox"/>
0	1	
Ne	Da	

4. Mesto stanovanja		<input type="checkbox"/>
0	1	
Grad	Selo	

5. Socio-ekonomski uslovi (prisustvo vlage/budi)		<input type="checkbox"/>
0	1	
Ne	Da	

6. Pridružena hronična oboljenja				<input type="checkbox"/>
0	1	2	3	
Nema	Astma(HOBP)/TBC	KVB	Maligne bolesti	

7. Cigarete			<input type="checkbox"/>
0	1	2	
Pušač	Nepušač	Bivši pušač	

8. Trajanje bolesti				<input type="checkbox"/>
0	1	2	3	
<5	5-10	10-20	>20	

## Prilog 9. Standardna operativna procedura za ELISA test za detekciju antitela

### Standardna operativna procedura/SOP

#### ELISA test za određivanje koncentracije At

1. Pipetirati po 100 $\mu$ l kalibratora, pozitivnih kontrola i razblaženih seruma u bunarčice. Inkubirati 30 minuta na sobnoj temperaturi (+25°C)
2. Isprati napravljenim wash-om, svaki bunarčić 3x korišćenjem 300  $\mu$ l wash-a za svaki bunarčić
3. Pipetirati 100 $\mu$ l enzim konjugata u svaki bunarčić. Inkubirati 30 minuta na sobnoj temperaturi (+25°C)
4. Isprati bunarčice 3x prethodno napravljenim wash-om
5. Pipetirati 100 $\mu$ l hromogena/supstrata u svaki bunarčić. Inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi (+25°C) (zaštiti od svetlosti)
6. Zaustaviti reakciju dodavanjem 100 $\mu$ l stopping solution
7. Očitati vrednosti u reader-u na 450/650 nm najkasnije 30 minuta od zaustavljanja reakcije
8. Nacrtati krivu po uputstvima proizvođača i po fabričkim kalibratorima, na kojoj će se očitavati vrednosti uzoraka pacijenata

## **9. BIOGRAFIJA**

Dr Aleksandra (Milan) Barać, rođena je 03. juna 1985. u Sremskoj Mitrovici, Republika Srbija. Diplomirala je 16.06.2010. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu odbranom diplomskog rada pod nazivom "Laboratorijska dijagnoza bronhopulmonalne aspergiloze". Pripravnički lekarski staž u trajanju od 6 meseci je obavila u Kliničkom centru Srbije. Državni lekarski ispit je položila 01.03.2011. godine. Školske 2010/2011. godine upisala je prvu godinu doktorskih akademskih studija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, smer Fiziološke nauke.

Kandidatkinja je zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu od 01.01.2011. godine kao istraživač na naučno-istraživačkom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Značaj dokazivanja ranih laboratorijskih biomarkera za ishod invazivnih gljivičnih infekcija kod nas” (OI 175034). U periodu od 01.01.2012. godine do 01.04.2012. godine bila je angažovana kao generalni sekretar i član organizacionog odbora naučnog simpozijuma “3. Simpozijum o dijagnozi i terapiji gljivičnih oboljenja ljudi”.

Dobitnica je različitih priznanja za naučno-istraživački rad: nagrada OeAD i WUS Austria za naučno-istraživački boravak na Univerzitetu u Beču; “ECMM Young Travel Award” za najbolji rad na međunarodnom naučnom skupu „5th Trends in Medical Mycology“ u Valensiji, Španija; stipendija za studijski boravak na Univerzitetu u Nijmegenu, Holandija, za edukativni kurs “Laboratory diagnosis on Invasive Fungal Infections”; nagrada Evropskog udruženja rinologa (ERS) za usavršavanje u Londonu na Royal Free Hospital; nagrada AAF/OMI za usavršavanje u Salzburgu, Austrija; nagradu za "The best case presentation" AAF/OMI, Salzburg, Austrija; "Travel grant SCI" za SCI, Graz, Austria; nagrada skupštine grada Beograda za postignut uspeh u projektu “Lekar u zajednici“ i stipendija Ministarstva Omladine i sporta tokom studija. Učestvovala je u naučno-istraživačkom radu Istraživačke stanice “Petnica”.

Član je udruženja “MENSA”, ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases*), ERS (European Respiratory Society), ERS (European Rhinologic Society), ECMM (*European Confederation of Medical Mycology*), ISHAM (*International Society for Human and Animal Mycology*), SLD (Srpsko lekarsko društvo), DMMS (Društvo medicinskih mikologa Srbije) i Udruženja mikrobiologa Srbije.

Tečno govori engleski i nemački jezik. Kao autor i koautor objavila je 10 publikacija u vodećim naučnim časopisima od čega su 5 M21 kategorije i preko 30 apstrakata i radova u celini sa naučnih konferencija od internacionalnog značaja. Autor je knjige “Bukvar medicinski značajnih gljiva”, Centar za inovacije u mikologiji, Beograd 2012.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а АЛЕКСАНДРА БАРАЋ

број уписа ФН 07/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЕВАЛУАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ИНДУКЦИЈУ СИНОНАЗАЛНОГ СЕКРЕТА ЗА ДОКАЗИВАЊЕ ГРЊИЦИЦА У СИНУСИМА У ФИЗИОЛОШКИМ И ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНИМ РИНОСИНИТИСИМА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

у Београду, 04.08.2015.

А. Бараћ

Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада

Име и презиме аутора АЛЕКСАНДРА БАРАЋ

Број уписа ФН 07/10

Студијски програм ФИЗИОЛОШКЕ НАУКЕ

Наслов рада ЕВАЛУАЦИЈА МЕТОДЕ ИНДУКЦИЈЕ СИНОНАЗАЛНОГ СЕКРЕТА ЗА ДОКАЗИВАЊЕ  
МЪВВИЦА У СИНУСИМА У ФИЗИОЛОШКИМ И ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА  
КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХРОНИЧНИМ РИНОСИНУЗИТИСИМА

Ментор ПРОФ. ДР ВАЛЕНТИНА АРСИЋ АРСЕНИЋЕВИЋ

Потписани БАРАЋ АЛЕКСАНДРА

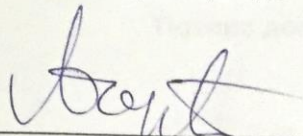
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04.08.2015.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"ЕВАЛУАЦИЈА МЕТОДЕ ИНДУКЦИЈЕ СИНОНАЗАЛНОГ СЕКРЕТА ЗА ДОКАЗИВАЊЕ ПЛЈИВИЦА У СИНОСИМА У ФИЗИОЛОШКИМ И ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА КРАЈ ПАЦИЈЕНТА СА ХРОНИЧНИМ РИНОСИНИЗИТИСИМА"  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 04.08.2015.

Потпис докторанда

