

Strokovni prispevek/Professional article

# DIAGNOSTIČNA VREDNOST RAZMAZA SPUTUMA IN ENDOTRAHEALNEGA ASPIRATA, OBARVANEGA PO GRAMU

DIAGNOSTIC VALUE OF SPUTUM AND ENDOTRACHEAL ASPIRATE GRAM STAIN

Viktorija Tomič, Jurij Šorli

Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Bolnišnica Golnik, 4204 Golnik

Prispelo 2001-07-23, sprejeto 2001-10-16; ZDRAV VESTN 2002; 71: 83-6

**Ključne besede:** sputum; endotrahealni aspirat; razmaz, obarvan po Gramu; okužbe spodnjih dihal

**Izvleček** – Izhodišča. Čeprav je mikroskopski pregled obarvanih razmazov kužnin v mikrobioloških laboratorijih že desetletja eden osnovnih diagnostičnih testov, so mnenja o uporabnosti razmaza respiratornih kužnin pri začetni obravnavi bolnikov z okužbami spodnjih dihal še vedno deljena. Zanimala nas je povednost mikroskopskega pregleda sputuma in endotrahealnega aspirata pri neselecionirani skupini bolnikov.

**Material in metode.** V sedemmesečnem obdobju smo pregledali 1739 sputumov in 88 aspiratov traheje. Vsem kužninam smo določili ustreznost za nadaljnjo kultivacijo glede na vsebnost celic ploščatega epitela in polimorfonuklearnih levkocitov. Izvide mikroskopskega pregleda razmazov, obarvanih po Gramu, smo primerjali s kulturo kužnin.

**Rezultati.** Zaradi neustreznosti smo zavrnili 48% sputumov. Ugotovili smo, da je občutljivost razmaza za *Streptococcus pneumoniae* 61%, za *Haemophilus* sp. 74% in za *Moraxella catarrhalis* 73%. Kadar so v razmazu prevladovale tipične oblike bakterij (npr. po Gramu pozitivni lancetni diplokokci), sta se kultura in izvid razmaza vedno ujemala.

**Zaključki.** Mikroskopski pregled razmaza sputuma in endotrahealnega aspirata, obarvanih po Gramu, je uporabna in potrebna preiskava.

## Uvod

Barvanje po Gramu lahko uporabimo tako pri bakterijskih kulturah kot tudi za neposredno barvanje kužnin. Že desetletja je mikroskopski pregled obarvanih razmazov kužnin eden osnovnih diagnostičnih testov v kliničnih mikrobioloških laboratorijih (1, 2). Mikrobiolog lahko posreduje zdravniku prve izsledke mikroskopskega pregleda že 20 minut po prejemu kužnine. Pregled razmazov sputumov, obarvanih po Gramu, in njihovo kulturo pogosto uporabljamo za diagnozo in zdravljenje okužb spodnjih dihalnih poti (3, 4). Kadar pregledujemo normalno sterilne vzorce (kri, likvor, plevralni izliv itd.), izsleditev bakterij navadno ni težavna, razen kadar je inokulum bakterij manjši od ločljivosti razmaza, obarvanega po Gra-

**Key words:** sputum; endotracheal aspirate; Gram stain; lower respiratory tract infections

**Abstract** – Background. For decades the microscopic examination of sample Gram stain has been one of the basic diagnostic procedures in the microbiology laboratory. Still opinions about usefulness of sputum and endotracheal aspirate Gram stains in initial management of patients with lower respiratory tract infections differ. We were interested in the value of sputum and endotracheal aspirate Gram stain in a nonselected group of patients.

**Material and methods.** During 7 months period we examined 1739 sputum samples and 88 endotracheal aspirates. The samples were evaluated for quality by determining the amount of squamous cells and leukocytes. We compared the Gram stain examination to culture results.

**Results.** Due to poor quality we rejected 48% of sputum samples. The sensitivity of Gram stain for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* sp. and *Moraxella catarrhalis* was 61%, 74% and 73%, respectively. Predominance of one typical bacterial morphotype (eg. Gram positive lancet-shaped diplococci) correlated perfectly with culture.

**Conclusions.** Examination of sputum and endotracheal aspirate Gram stain is useful procedure in patient management and in bacteriological culture evaluation.

mu. Pregledovanje kužnin, v katerih so bakterije normalno prisotne (sputum, bris kože ali žrela itd.), zahteva veliko več izkušenj. Sputum navadno sestavljajo vnetni eksudat iz spodnjih dihalnih poti, slina in drug material, pridobljen pri prehodu kužnine skozi žrelo in usta (npr. hrana). Zaradi tega so v sputumu poleg potencialno patogenih bakterij iz spodnjih dihal (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, enterobakterije) tudi bakterije iz zgornjih dihalnih poti. Mnenja o uporabnosti razmaza sputuma in endotrahealnega aspirata (EA) pri začetnem zdravljenju bolnikov s pljučnico, pridobljeno v domačem okolju, so še vedno deljena (5-8). Rezultati raziskav so pokazali omejeno občutljivost, vendar je pri diagnostiki pneumokokne pljučnice specifičnost običajno > 80% (9-11). Pri

obravnavi bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB) s sumom na pljučnico je diagnostična vrednost mikrobioloških in mikroskopskih preiskav po mnenju nekaterih avtorjev vprašljiva. Pri teh bolnikih so dihalne poti pogosto kolonizirane z bakterijami, ki so najpogostejši povzročitelji pljučnic, pridobljenih v domačem okolju (12). Vendar je primerjava kulture sputuma in vzorcev, pridobljenih z zaščiteno krtačko, pokazala, da so le pri 5% bolnikov s stabilno KOPB porasle potencialno patogene bakterije v koncentraciji > 10<sup>5</sup> CFU/ml. Če uporabimo kvantitativno kulturo izmečka, so tudi pri bolnikih s KOPB lažno pozitivni rezultati redki (12). V Laboratoriju za respiratorno bakteriologijo Kliničnega oddelka za pljučne bolezni in alergijo Golnik rutinsko pregledujemo razmaze vseh respiratornih kužnin, obarvane po Gramu. Ker nas je zanimala povednost mikroskopskega pregleda sputumov in EA pri neselekcioniirani populaciji bolnikov, smo pregledali naše rezultate za obdobje 7 mesecev (oktober 2000 – april 2001). Rezultate mikroskopskega pregleda razmazov, obarvanih po Gramu, smo primerjali z rezultati kvantitativne kulture sputumov in EA, ki jo uporabljamo v našem laboratoriju.

## Material in metode

Pregledali smo 1739 sputumov ter 88 EA bolnikov, ki so bili sprejeti v našo bolnišnico zaradi različnih bolezni dihal (pljučnica, akutno poslabšanje KOPB, poslabšanje astme itd.). Upoštevali smo samo EA, odvzete pri intubiranih bolnikih, hospitaliziranih na Oddelku za intenzivno nego in terapijo. Kadar smo v enem dnevu dobili dva vzorca sputuma istega bolnika, smo kakovostno slabšega zavrnil. Pri vseh vzorcih smo najprej ocenili makroskopsko gnojnost in jo označili z 0 (ni gnojnih delcev), +/-, +, ++, +++ (po laboratorijskem protokolu glede na količino prisotnega gnoja). Iz gnojnega dela sputuma smo naredili razmaz, ki smo ga pobarvali po Gramu po standardnem protokolu. Ustreznost vzorcev smo ugotavljali pri majhni povečavi (100-krat). Kontaminacijo z izločki zgornjih dihal nam kaže prisotnost celic ploščatega epitela, gnojnost pa ugotavljamo s prisotnostjo polimorfonuklearnih levkocitov. Vse sputume, ki so vsebovali več kot 10 celic ploščatega epitela, smo zavrnil in jih nismo obdelovali naprej. O zavrnitvi smo obvestili pristojnega zdravnika. Za določitev ustreznosti EA smo uporabili iste kriterije, vendar neustreznih vzorcev nismo zavrnil. Ustrezne vzorce smo nato pregledali pod mikroskopom z oljno imerzijo (1000-kratna povečava) in ocenili obliko in gostoto prisotnih bakterij. Gostoto posameznih oblik bakterij smo ocenili po modificirani shemi Guckiana in Christensena (13). Ustrezne sputume in EA smo nato homogenizirali z N-acetil L-cisteinom, redčili in cepili na obogateno krvni agar s 5% ovčje krvi (KA), čokoladni (ČA) in MacConkey agar (MCA), EA pa dodatno še v tioglikolatni bujon. Plošče KA in ČA smo inkubirali aerobno z dodatkom 5% CO<sub>2</sub>, MCA pa aerobno pri 37°C. Porasle bakterije smo identificirali s standardnimi postopki.

## Rezultati

Od 1739 prejetih sputumov smo zaradi neustreznosti zavrnil 829 vzorcev (48%). Med 83 EA smo pri osmih (11%) ugotovili več kot deset celic ploščatega epitela v vidnem polju pri majhni povečavi. V nobenem od teh neustreznih EA nismo izolirali potencialno patogenih bakterij. Pri mikroskopskem pregledu smo v 52 vzorcih sputumov in EA videli po Gramu pozitivne lancetne diplokoke, kar je kazalo na prisotnost *S. pneumoniae*. Pnevmonoki so dejansko porasli iz 54 vzorcev, od katerih smo v 21 razmazih, obarvanih po Gramu, videli po Gramu pozitivne koke in ne diplokoke. Občutljivost razmaza za pnevmokoke je bila 61%, specifičnost pa 98% (tab. 1). Kadar so v

razmazu prevladovali po Gramu pozitivni diplokozi, je bilo ujetje s kulturo popolno. Nekoliko večja občutljivost (74%) je bila v primeru bakterij *H. influenzae* in *H. parainfluenzae* (tab. 2). Število izolatov *M. catarrhalis* je bilo manjše kot pri pnevmokokih in hemofilusih. Izolirali smo 26 sevov *M. catarrhalis*, od katerih smo že v 19 razmazih, obarvanih po Gramu, videli značilne po Gramu negativne diplokoke. Občutljivost razmaza je bila 73%, specifičnost pa 99% (tab. 3). Pri vseh treh omenjenih bakterijah je bila pozitivna napovedna vrednost razmaza 63–80%, medtem ko je bila negativna napovedna vrednost zelo visoka (96–99%).

Tab. 1. Rezultati pregleda razmaza, obarvanega po Gramu, in kulture sputumov in EA v primeru *S. pneumoniae*.

Tab. 1. Results of Gram stain and culture of sputum and EA in case of *S. pneumoniae*.

	Razmaz + Gram stain +	Razmaz - Gram stain -
Kultura + / Culture +	33	21
Kultura - / Culture -	19	912

Tab. 2. Rezultati pregleda razmaza, obarvanega po Gramu, in kulture sputumov in EA v primeru *H. influenzae*.

Tab. 2. Results of Gram stain and culture of sputum and EA in case of *H. influenzae*.

	Razmaz + Gram stain +	Razmaz - Gram stain -
Kultura + / Culture +	93	32
Kultura - / Culture -	23	837

Tab. 3. Rezultati pregleda razmaza, obarvanega po Gramu, in kulture sputumov in EA v primeru *M. catarrhalis*.

Tab. 3. Results of Gram stain and culture of sputum and EA in case of *M. catarrhalis*.

	Razmaz + Gram stain +	Razmaz - Gram stain -
Kultura + / Culture +	19	7
Kultura - / Culture -	8	951

Tab. 4. Diagnostična vrednost razmaza sputumov in EA, obarvanih po Gramu.

Tab. 4. Diagnostic value of sputum and EA Gram stain.

	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>M. catarrhalis</i>
Občutljivost (%) / Sensitivity (%)	61	74	73
Specifičnost (%) / Specificity (%)	98	97	99
PNV (%) / PPV (%)	63	80	70
NNV (%) / NPV (%)	98	96	99

PNV – pozitivna napovedna vrednost, NNV – negativna napovedna vrednost  
PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value

## Razpravljanje

Sputum je najpogostejša kužnina iz dihalnih poti, ki pride v mikrobiološki laboratorij za obdelavo. Od vseh respiratornih kužnin je tudi najbolj zahtevna za interpretacijo. Že dolgo je razmaz sputuma, obarvan po Gramu, zdravnikom v pomoč pri izbiri začetne antibiotične terapije bolnikov z bakterijsko pljučnico (5).

Če želimo pravilno vrednotiti rezultate kultur sputuma in EA, moramo oceniti ustreznost teh vzorcev. Vzorca, ki vsebujejo več kot deset celic ploščatega epitela, niso iz spodnjih dihalnih poti, zato menimo, da je sporočanje rezultatov kulture ta-

kih neustreznih vzorcev zavajajoče in ekonomsko neupravičeno. To ugotavljajo tudi nekateri tuji avtorji (16). Trenutno ni standardiziranih kriterijev za oceno ustreznosti in za zavrnitev sputumov in EA, kar pa ne bi smelo biti razlog za neuporabo le-teh. V strokovni literaturi najdemo več različic teh kriterijev (5, 17–21). Kljub njihovi različnosti pa priporočajo nadaljnjo mikrobiološko diagnostiko le pri ustreznih vzorcih, neustrezne vzorce pa je treba zavrniti in o tem obvestiti pristojnega zdravnika. V našem laboratoriju upoštevamo najpogosteje uporabljan kriterij za ustreznost sputumov in EA, in sicer manj kot deset celic ploščatega epitela in več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov v vidnem polju pri 100-kratni povečavi (pregledamo najmanj 20 vidnih polj) (16). V 7-mesečnem obdobju smo na podlagi tega kriterija zavrnili 48% sputumov. Čeprav se naši rezultati skladajo z izkušnjami tujih laboratorijev (2), menimo, da bi bilo mogoče odstotek neustreznih sputumov nekoliko znižati z natančno razlago postopka odvzema, pri mnogih bolnikih bi bila potrebna aktivna pomoč zdravstvenega osebja. Od 83 EA le 11% ni zadostilo kriterijev ustreznosti, kar potrjuje, da je EA ustrežnejša kužnina od sputuma. Čeprav neustreznih EA nismo zavrnili, pa pri njihovi kultivaciji nismo izolirali potencialno patogenih bakterij, ampak le predstavnike običajne mešane flore sluznic zgornjih dihal (*S. viridans*, *Neisseria sp.*, koagulaza negativni stafilokoki), kar potrjuje naše prepričanje, da vzorci z več kot desetimi celicami ploščatega epitela niso iz spodnjih dihalnih poti in zato niso primerni za kultivacijo. Podobne ugotovitve zasledimo tudi pri tujih avtorjih (22). Zanimivo je, da večkrat opažamo neujemanje med mnenjem klinika, da je bil vzorec »gnojen«, in med dejansko mikroskopsko ugotovljeno gnojnostjo sputuma, kar opisujejo tudi drugi avtorji (23). Videz »gnojnosti« je lahko tudi posledica obilo delcev razpadlih celic, prisotnosti gliv, ostankov hrane ipd.

Razmaz, obarvan po Gramu, nam olajša in obenem omogoči bolj pravilno interpretacijo kultur sputumov in EA (24). Kolonije pnevmokokov je težko ali celo nemogoče ločiti od številnih kolonij bakterij iz skupine *S. viridans*, ki so najpogostejši predstavnik običajne mešane flore sluznic zgornjih dihal. Zato nam je bila prisotnost po Gramu pozitivnih diplokokov v razmazu večkrat pomembno vodilo, brez katerega pnevmokokov ne bi identificirali. Podobne izkušnje imamo tudi s hemofilusi, ki bi jih zgrešili, kadar jih prekrijejo kolonije enterobakterij oz. *P. aeruginosa*. B. Roson s sod. (5) opaža, da je preiskava sputuma povzročila število opredeljenih pljučnic, povzročenih s *H. influenzae*, še posebno če upoštevamo, da je *H. influenzae* bakteriemija redka.

Pri prevladovanju (> 75%) ene značilne bakterijske oblike v razmazu je verjetnost pravilne opredelitve povzročitelja velika (5). Kadar smo v razmazu videli več kot 25 (veliko) po Gramu pozitivnih diplokokov, po Gramu negativnih kokobacilov ali po Gramu negativnih diplokokov v večini pregledanih vidnih polj, se je izvid razmaza ujemal z izvidom kulture. Največ odstopanj smo opazili v primerih, kadar smo tipičen morfotip opazili malokrat (< 5/vidno polje) ali redko (< 1/vidno polje). Pri taki gostoti bakterij je zelo verjetna napačna ocena oblik bakterij. Ni pa izključena možnost, da bi z natančnejšimi metodami (dokaz antigena, molekularna diagnostika) celo potrdili izvid razmaza, obarvanega po Gramu. Večje neujemanje izvoda razmaza in kulture nas lahko opozori na težave oz. napačne pri kultivaciji ali na zamenjavo pri označevanju vzorcev. Kadar prevladuje v razmazu en značilen morfotip, verjamejo, da je ta podatek kliniku v pomoč pri odločanju o začetni antibiotični terapiji (24), čeprav so mnenja glede tega precej deljena (20). Gleckman s sod. (4) ugotavlja, da je razmaz, obarvan po Gramu, zanesljivo vodilo pri izbiri začetnega zdravljenja odraslih bolnikov z doma pridobljeno bakterijsko pljučnico, ki lahko izkašljajo ustrezen sputum in pri katerih ne gre za polimikrobno okužbo. Podobno Rosonova s sod. (5) ugotavlja, da je bilo v njihovi raziskavi več kot 95% bolnikov s prevla-

do po Gramu pozitivnih diplokokov v razmazu zdravljenih od začetka z enim antibiotikom. Kadar pri bolniku, ki ni prejel antibiotikov, v ustreznem izmečku z obilico polimorfonuklearnih levkocitov ne vidimo bakterij, je to lahko znak, da gre za atipičnega povzročitelja (16).

## Zaključki

Po našem mnenju je mikroskopski pregled razmaza sputuma in EA, obarvanih po Gramu, uporabna in celo potrebna preiskava zaradi več razlogov. Sputum je kužnina, ki jo bolnik navadno lahko odda brez večjih naporov. Za interpretacijo ne potrebujemo drage opreme in preiskava je relativno poceni. Rezultat mikroskopskega pregleda razmaza, obarvanega po Gramu, je lahko na voljo že 20 minut po prejemu kužnine. Čeprav so glede njegove vloge pri obravnavi bolnika mnenja deljena, pa je pregled razmaza vsekakor nujno potreben za ovrednotenje ustreznosti sputuma in EA, od česar je odvisna nadaljnja usoda vzorca. Neustrezne sputume moramo zavrniti in o tem takoj obvestiti klinika. Verjetno bi bilo treba enako ukrepati tudi pri EA (25). Če pa neustreznih EA ne zavrnemo, je potrebna pri interpretaciji izvidov kulture posebna previdnost in posvet z zdravnikom. Zaradi težavnosti in zahtevnosti mikroskopskega pregledovanja razmazov primarno nestabilnih vzorcev naj to preiskavo opravlja izkušen mikrobiolog (1). Hiter izvid razmaza, obarvanega po Gramu, je zdravniku lahko v pomoč pri obravnavi bolnika.

## Literatura

- Church D, Melnyk E, Unger B. Quantitative Gram stain interpretation criteria used by microbiology laboratories in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4266–8.
- Nagendra S, Bourbeau P, Brecher S, Dunne M, Larocco M, Doern G. Sampling variability in the microbiological evaluation of expectorated sputa and endotracheal aspirates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2344–7.
- Heineman HS, Chawla JK, Lofton WM. Misinformation from sputum cultures without microscopic examination. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 518–27.
- Gleckman R, de Vita J, Hibert D, Pelletier C, Martin R. Sputum Gram stain in community-acquired bacteremic pneumonia. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 846–9.
- Roson B, Carratala J, Verdaguier R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Prospective study of the usefulness of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 869–74.
- Lentino JR, Lucks DA. Nonvalue of sputum culture in the management of lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 758–62.
- American Thoracic Society. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity and initial antibiotic therapy. *Am Rev Resp Dis* 1993; 148: 1418–26.
- Theerthakarai R, El-Halees W, Ismail M, Solis RA, Anees Khan M. Nonvalue of the initial microbiological studies in the management of non-severe community-acquired pneumonia. *Chest* 2001; 119: 181–4.
- Rein MF, Gwaltney JM, O'Brien MO, Jennings RH, Mandell GL. Accuracy of Gram's stain in identifying pneumococci in sputum. *JAMA* 1978; 239: 2671–3.
- Fein A, Grossman R, Ost D, Farber B, Cassiere H. Diagnosis and management of pneumonia and other respiratory infections. Professional Communications Inc., 1999: 35–51.
- Leeper KV. Severe community-acquired pneumonia. *Sem Resp Infect* 1996; 11: 96–108.
- Salo P, Leinonen M. Microbiological investigations. *Sem Resp Infect* 1999; 14: 128–34.
- Guckian JC, Christensen WD. Quantitative culture and Gram stain of sputum in pneumonia. *Am Rev Resp Dis* 1978; 118: 997–1005.
- Bartlett JG, Mundy LM. Community acquired pneumonia. *N Eng J Med* 1995; 333: 1618–24.
- Brown PD, Lerner SA. Community acquired pneumonia. *The Lancet* 1998; 352: 1295–302.
- Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 347–82.
- Tebbutt GM, Coleman DJ. Evaluation of some methods for the laboratory examination of sputum. *J Clin Pathol* 1978; 31: 724–9.
- Wilson LM. General principles of specimen collection and transport. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 766–77.

19. Örtquist A. Initial investigation and treatment of the patients with severe community-acquired pneumonia. *Sem Resp Infect* 1994; 9: 166–79.
20. European Respiratory Society Task Force. Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1998; 11: 986–91.
21. Mandell LA, Marrie TJ, Grossman RF, Chow AW, Hyland RH and the Canadian Working Group. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 383–421.
22. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50: 339–44.
23. Miller DL. A study for the examination of sputum in a field survey of chronic bronchitis. *Am Rev Resp Dis* 1963; 88: 473–83.
24. Boruchoff SE, Weinstein MP. Sputum cultures. Up to date, Ver. 9.1.
25. Morris AJ, Tanner DC, Reller LB. Rejection criteria for endotracheal aspirates from adults. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1027–9.

#### V tej številki so sodelovali:

Marija Bocak-Kalan, dr. med., specialistka pediatrija, Ljubljana  
 asist. dr. Borut Bratanič, dr. med., specialist pediater, Pediatrična klinika, KC Ljubljana  
 prof. dr. Vlijem Brumec, dr. med., specialist ginekologije in porodništva, Maribor  
 Miran Brvar, dr. med., specializant interne medicine, Center za zastropitve, KC Ljubljana  
 prof. dr. Jože Drinovec, dr. med., specialist internist, Krka Ljubljana  
 Doroteja Drobnič-Kovač, dr. med., specialistka splošne medicine, Enota Bežigrad, Zdravstveni dom Ljubljana  
 prim. Jurij Fürst, dr. med., Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije, Ljubljana  
 asist. dr. Simona Gaberšček, dr. med., specialistka internistka, Klinika za nuklearno medicino, KC Ljubljana  
 prof. dr. Eldar M. Gadžijev, dr. med., specialist kirurg, Oddelek za abdominalno in splošno kirurgijo, SB Maribor  
 prim. Vojka Gorjup, dr. med., specialistka internistka, Klinični oddelek za intenzivno interno emdicino, KC Ljubljana  
 akad. prof. dr. Matija Horvat, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za intenzivno interno medicino, KC Ljubljana  
 Marija Jamšek, dr. med., specialistka internistka, Center za zastropitve, KC Ljubljana  
 prof. dr. Mirko Jung, dr. med., specialist virolog, Thalwil/Zürich, Švica  
 prim. Bogdan Leskovic, dr. med., specialist internist, Ljubljana

prof. dr. Blaž Mlačak, dr. med., specialist internist, Zdravstveni dom Metlika  
 prim. asist. Martin Možina, dr. med., specialist internist, Center za zastropitve, KC Ljubljana  
 prof. dr. Marija Pečan, dr. med., specialistka anesteziologinja, Ljubljana  
 prim. doc. dr. Anton Prijatelj, dr. med., specialist medicine dela, Nova Gorica  
 Darja Radešček, dr. med., specialistka socialne medicine, Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto  
 prof. dr. Steven M. Strasberg, dr. med., specialist kirurg, I Barnes Hospital Plaza, St. Luis, ZDA  
 prim. mag. Jožica Šelb-Šemerl, dr. med., specialistka anesteziologinja, Inštitut za varovanje zdravja, Ljubljana  
 prof. dr. Jurij Šorli, dr. med., specialist interinist, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Bolnišnica Golnik  
 prim. Franc Štolfa, dr. stom., Celje  
 Andreja Tekavc-Golob, dr. med., specialistka pediatrija, Pediatrični oddelek, Splošna bolnišnica Maribor  
 prim. Dragan Terzić, dr. med., specialist psihiater, Psihiatrična klinika Ljubljana  
 Viktorija Tomič, dr. med., specialistka internistka, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Bolnišnica Golnik  
 Vladimir Valentinuzzi, dr. med., specialist kirurg, Kirurški oddelek, Splošna bolnišnica Šempeter pri Gorici