

# Distribucija rotavirusnih genotipova u trima regijama u Republici Hrvatskoj

---

Vrdoljak Pažur, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:335671>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Maja Vrdoljak Pažur**

**Distribucija rotavirusnih genotipova u  
trima regijama u Republici Hrvatskoj**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Maja Vrdoljak Pažur**

**Distribucija rotavirusnih genotipova u  
trima regijama u Republici Hrvatskoj**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2024.**

Disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“,  
Kliničkom bolničkom centru Split i Županijskoj bolnici Čakovec.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Goran Tešović, dr. med.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Goranu Tešoviću na dragocjenoj pomoći pri izradi ovog rada. Zahvaljujem također dr. sc. Mariji Gužvinec i prim. dr. sc. Ivi Butić na molekularnoj dijagnostici, prof. dr. sc. Vjekoslavu Krželju, prof. dr. sc. Ivi Iviću, prof. dr. sc. Mariji Tonkić, prim. Marini Payerl-Pal i prim. mr. sc. Mariji Hegeduš Jungvirth na pomoći u prikupljanju uzoraka, a prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji na pomoći oko statističke obrade podataka.

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD I SVRHA RADA</b> .....	1
1.1 Epidemiologija .....	3
1.1.1 Značaj bolesti .....	3
1.1.2 Dob.....	5
1.1.3 Sezonstvo .....	6
1.2 Građa i klasifikacija rotavirusa .....	7
1.2.1 Distribucija rotavirusnih genotipova.....	9
1.2.2 Evolucija i međuvrsni prijenos rotavirusa .....	11
1.3 Prijenos i patogeneza .....	12
1.4 Tijek infekcije .....	14
1.5 Klinička slika .....	14
1.5.1 Zaštitna imunost.....	15
1.5.2 Ocjenske ljestvice za procjenu težine kliničke slike.....	17
1.6 Bolničke (nozokomijalne) rotavirusne infekcije .....	18
1.7 Laboratorijska dijagnostika rotavirusne infekcije.....	21
1.8 Liječenje rotavirusnog gastroenteritisa.....	22
1.9 Prevencija rotavirusnog gastroenteritisa .....	22
1.9.1 Nespecifične mjere.....	22
1.9.2 Cijepljenje.....	23
1.9.2.1 Povijest .....	23
1.9.2.2 Trenutno dostupna cjepiva .....	25
1.9.2.3 Preporuke za cijepljenje i korist cjepiva .....	29
1.9.2.4 Utjecaj rotavirusnog cjepiva na distribuciju genotipova.....	30
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	31
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	32
3.1 Opći cilj: .....	32
3.2 Specifični ciljevi:.....	32
<b>4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	33
4.1 Ispitanici.....	33
4.2 Laboratorijska dijagnoza rotavirusnog gastroenteritisa i genotipizacija ..	34
4.3 Težina kliničke slike .....	34
4.4 Statistička analiza .....	36
<b>5. REZULTATI</b> .....	38
5.1 Opći pregled studije i glavni epidemiološki nalazi .....	38
5.2 Podioba dokazanih rotavirusnih infekcija prema dijelu godine i centru ...	47
5.3 Podioba detektiranih rotavirusnih genotipova prema dijelu godine .....	50
5.4 Težina bolesti: ocjenske ljestvice Vesikari i Clark .....	54
<b>6. RASPRAVA</b> .....	62
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	76
<b>8. SAŽETAK</b> .....	78
<b>9. ABSTRACT</b> .....	80
<b>10. POPIS LITERATURE</b> .....	81
<b>11. KRATKA BIOGRAFIJA</b> .....	109

## **POPIS OZNAKA I KRATICA:**

AGE – akutni gastroenteritis

ELISA - enzimski povezani imunosorbentni test

ESPID – Europsko društvo za pedijatrijsku infektologiju

GACVS - Globalni savjetodavni odbor za sigurnost cjepiva

GAVI – Globalni savez za cjepiva i imunizaciju

HBGAs - antigeni histo-krvne grupe

ICT – imunokromatografski test

IS - intususcepcija

NIP – nacionalni imunizacijski program

NRV AGE – nozokomijalni rotavirusni akutni gastroenteritis

NSP – nestrukturani protein

PCR – lančana reakcija polimerazom

qPCR - kvantitativna lančana reakcija polimerazom

RRV-TV - RotaShield®

RT-PCR - reverzna transkripcija-lančana reakcija polimerazom

RV – Rotavirus

RVGE – rotavirusni gastroenteritis

RV1 - Rotarix®

RV5 - RotaTeq®

SAD – Sjedinjene Američke Države

SŽS – središnji živčani sustav

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

VP – virusni protein

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Akutni gastroenteritis (AGE) jedan je od vodećih uzroka mortaliteta u male djece, a godišnje uzrokuje gotovo 500 000 smrtnih slučajeva globalno (1,2). Unatoč tendenciji smanjenja ukupnog broja slučajeva, rotavirus (RV) je i dalje glavni uzročnik morbiditeta i mortaliteta zbog AGE u djece mlađe od 5 godina – u 2016. godini procijenjeno je da je uzrokovao gotovo 260 milijuna epizoda AGE i jednu trećinu svih smrti zbog AGE (3). U razvijenim zemljama stope smrtnosti zbog rotavirusnog AGE (RVGE) značajno su niže u odnosu na slabije razvijene zemlje (3,4), no morbiditet je značajan, kao i troškovi u zdravstvenom sustavu (3,5).

Na temelju razlika u sekvencama gena koji kodiraju dva strukturna virusna proteina (VP) – VP7 i VP4, RV grupe A podijeljeni su u G (eng. *Glycosylated*), odnosno P (eng. *Protease sensitive*) tipove (6). Velika molekularno-epidemiološka istraživanja o distribuciji G i P tipova prije uvođenja rotavirusnih cjepiva pokazala su globalni značaj pet genotipova - G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8], no također je uočena velika raznolikost G/P kombinacija (7–9). Nove i neuobičajene antigenske G/P kombinacije nastavljaju se pojavljivati, od kojih su neke postale važne globalno, poput G12P[8] (10), a druge regionalno ili lokalno, poput G8P[6] u dijelovima Afrike ili G12P[6] u dijelovima Azije (11,12). Genomsko preslagivanje između najučestalijih G i P genotipova koji cirkuliraju na nekom području značajno pridonosi velikoj raznolikosti G/P tipova i dovodi do pojave neuobičajenih kombinacija (13). Osim toga, moguća je i razmjena genetskog materijala između humanih i životinjskih RV, što dodatno povećava vjerojatnost nastanka novih G/P kombinacija (14). Distribucija rotavirusnih G/P genotipova pokazuje geografske i vremenske fluktuacije. Naime, dominacija određenog genotipa može se značajno razlikovati od godine do godine te između pojedinih zemalja, pa čak i između regija unutar iste zemlje u jednoj godini (8,9,15). Zbog svega navedenog važno je sustavno pratiti molekularne značajke rotavirusa u ljudi i životinja, posebno zbog razvoja strategije aktivne imunizacije kod ljudi, ali i naknadnog praćenja njezine provedbe (16). Cijepljenje je najučinkovitiji način prevencije RVGE. Dva živa oslabljena oralna

rotavirusna cjepiva, RotaTeq (Merck Sharp & Dohme Corp., Whitehouse Station, New Jersey, SAD), peterovalentno (G1, G2, G3, G4, P[8]) humano-bovino reasortno cjepivo (RV5), i Rotarix (GSK Biologicals, Rixensart, Belgija), monovalentno (G1P[8]) humano cjepivo (RV1), preporučena su od 2009. godine za uvođenje u nacionalne imunizacijske programe globalno od strane Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (17). Nedavno su još dva cjepiva dodana na SZO listu prekvalificiranih cjepiva – Rotavac (Bharat Biotech International Ltd., Indija), koji sadržava humani G9P[11] soj, i Rotasil (Serum Institute of India Ltd., Indija), peterovalentno (G1, G2, G3, G4, G9) reasortno humano-bovino cjepivo (18). U Hrvatskoj rotavirusna cjepiva nisu dio NIP-a i preporučena su samo za djecu s povećanim rizikom za teži tijek bolesti (19). Prije uvođenja rotavirusnog cjepiva u NIP potrebno je procijeniti dobnu distribuciju i sezonske trendove rotavirusne infekcije, uključivo lokalne molekularno-epidemiološke značajke cirkulirajućih RV, da bi se stvorila učinkovita strategija za kontrolu bolesti (20,21).



## 1.1 Epidemiologija

### 1.1.1 Značaj bolesti

Akutni gastroenteritis jedna je od najčešćih bolesti u djece <5 godina i u zemljama s niskim prihodima jedan je od glavnih uzroka mortaliteta (22). Prema nekim procjenama, unatoč poboljšanju higijenskih uvjeta i boljoj dostupnosti rehidracijske terapije, AGE godišnje i dalje uzrokuje gotovo 500 000 smrti djece globalno (1,2).

Jedna od prvih epidemioloških studija o RV-u, provedena u Bangladešu, pokazala je da su djeca do 5. godine života u prosjeku imala 15-25 epizoda AGE, od čega je samo 3-5% bilo uzrokovano RV-om. Međutim, u skupini hospitalizirane djece s AGE, čak 20% bilo je uzrokovano RV-om, što je upućivalo na činjenicu da RV uzrokuje teže oblike bolesti u odnosu na druge infektivne uzročnike (23). Daljnji kontinuirani nadzor nad djecom hospitaliziranom zbog AGE, koji se i danas provodi u više od 60 zemalja, pokazao je da RV i globalno uzrokuje prosječno 36% (raspon 24-50%) hospitalizacija zbog AGE (24).

Prije uvođenja cjepiva, RV je godišnje uzrokovao 450 000 smrtnih slučajeva u djece <5 godina, što je činilo gotovo 40% mortaliteta zbog AGE i 5% cjelokupnog mortaliteta u djece <5 godina (25). Jedna velika studija iz prevakinalnog razdoblja (1986.-2000.) procijenila je da je RV globalno u djece < 5 g. uzrokovao prosječno 111 milijuna epizoda AGE koje su zahtijevale samo kućnu njegu, 25 milijuna posjeta bolnicama i 2 milijuna hospitalizacija. Drugim riječima, gotovo svako dijete do 5. godine života imalo je barem jednu epizodu RVGE, 1/5 zahtijevalo je posjet bolnici zbog RVGE, a 1/65 hospitalizaciju (26). U zadnjih pet desetljeća, koliko je proteklo od otkrića RV-a 1973. godine (27), procijenjena smrtnost zbog AGE u djece <5 godina dramatično je pala, s približno 3,6 milijuna 1986. godine do približno 500 000 2018. godine (28). Velikim dijelom taj pad posljedica je poboljšanja higijenskih uvjeta u slabije razvijenim zemljama, kao i veće dostupnosti oralne rehidracijske terapije, bolje edukacije roditelja, manje veličine obiteljskih zajednica, kasnijih trudnoća i dojenja (29). Procijenjeni broj smrti zbog RV u djece <5 godina u istom

razdoblju također je značajno pao te je 2018. procijenjena smrtnost zbog RV AGE bila 150 000 – 200 000 globalno (3), a udio RV u hospitalizacijama zbog AGE u djece <5 godina smanjen je s približno 40% na 20-25% (30,31).

Međutim, zanimljivo je da je u razdoblju 2005.-2015. godine pad mortaliteta zbog RVGE u djece <5 godina bio gotovo 44% brži nego pad ukupnog broja smrti zbog AGE, što je velikim dijelom posljedica uvođenja rotavirusnih cjepiva u NIP-ove brojnih zemalja (2). U prilog tomu govori i činjenica da je najoštrij pad broja smrti zbog RVGE, s 36% među svim AGE 2000. godine na 26% 2013. godine, zabilježen u Latinskoj Americi, gdje su gotovo sve zemlje uvele rotavirusno cjepivo u NIP (4). No, unatoč svemu, RV i dalje globalno ostaje vodeći uzročnik smrti zbog AGE, s procijenjenih 35% među svim smrtima zbog AGE u djece <5 godina (4) te je 2016. godine ukupno treći najčešći infektivni uzročnik smrti u djece < 5 godina, nakon malarije (517 000 smrti) i pneumokokne bolesti (359 000 smrti) (32). Smrtnost od RVGE najveća je u zemljama s niskim prihodima. U 2019. godini 50% cjelokupnog mortaliteta otpadalo je na samo četiri zemlje – Nigeriju, Čad, Niger i Pakistan, a gotovo  $\frac{3}{4}$  (70%) na samo deset zemalja. Ako se promatraju stope smrtnosti umjesto apsolutnih brojeva smrti, sedam zemalja ima stope veće od 100/100 000 djece <5 godina (Srednjoafrička Republika, Čad, Južni Sudan, Nigerija, Burkina Faso, Niger i Demokratska Republika Kongo) i sve se nalaze u subsaharskoj Africi (33). Ključni razlog zbog kojih se većina smrtnih slučajeva RVGE događa u slabije razvijenim zemljama, unatoč činjenici da je bolest česta i u razvijenim zemljama, je neadekvatan i nepravovremen pristup zdravstvenoj skrbi.

Dodatno, RVGE može imati teži tijek u zemljama s niskim prihodima zbog učestalih crijevnih koinfekcija i pothranjenosti. Cjelogodišnja transmisija virusa zbog klimatskih faktora također pridonosi većoj smrtnosti (34–36).

Osim činjenice da uzrokuje teže oblike bolesti u odnosu na druge patogene, još jedna bitna karakteristika rotavirusne infekcije je da je univerzalna. Za razliku od npr. kolere, šigeloze ili amebijaze, infekcija koje primarno pogađaju djecu u zemljama s niskim prihodima, RV je globalni uzročnik i u necijepljenim populacijama gotovo sva djeca do 24. mjeseca života imaju barem jednu epizodu RVGE (37). Razlog tomu je vrlo laka transmisija RV-a (feko-oralnim

putem s osobe na osobu i preko kontaminiranih predmeta) i otpornost na okolišne uvjete. Stoga se RV često naziva „demokratskim virusom“ jer pogađa različite ekonomske grupe, bez poštode nekog geografskog područja ili socijalne skupine (28).

U razvijenim zemljama s većim prihodima, poput SAD-a ili zemalja Zapadne Europe, smrtnost od RVGE je niska, no RV je svejedno povezan s težim tijekom AGE u odnosu na druge patogene te stvara značajne ekonomske troškove. Npr. u SAD-u je prije uvođenja rotavirusnog cijepljenja 80% djece starosti do 5 godina imalo barem jednu epizodu RVGE, a jedno od 70 djece iste dobi bilo je hospitalizirano zbog RVGE, što je godišnje stvaralo gotovo milijardu dolara direktnih i indirektnih troškova (38). U Njemačkoj (2012. godine) i Švedskoj (2015. godine) troškovi hospitalizacije bili su preko 2000 dolara za svako dijete hospitalizirano zbog RVGE (39,40). Osim direktnih troškova (troškovi medicinske skrbi za bolesno dijete), veliki ekonomski problem su i tzv. „indirektni troškovi“ zbog izostanka s posla roditelja ili skrbnika radi brige o bolesnom djetetu, što je prosječno 2.3-7.5 dana u zemljama Zapadne Europe (41). Nadalje, dodatni troškovi nastaju pojavom sekundarnih slučajeva zbog prijenosa virusa unutar obitelji koji se događa u barem 50% slučajeva (42,43). Prema jednoj švedskoj studiji čak 31% roditelja ili skrbnika čije je dijete hospitalizirano zbog RVGE razvije proljev, što dodatno uzrokuje barem još 4 dana izostanka s posla zbog vlastite bolesti, dodatno povećavajući troškove (40). Ekonomski teret zbog RVGE još je više izražen u slabije razvijenim zemljama, gdje može imati katastrofalne učinke. Primjer je Ruanda gdje trošak koji snosi obitelj zbog jedne RVGE hospitalizacije iznosi čak do 110% ukupnog mjesečnog prihoda (raspon 21-110%) (44), a udjeli su slični i u drugim slabije razvijenim afričkim zemljama (Libija – 32% ukupnog mjesečnog prihoda ili Kenija – 24% ukupnog mjesečnog prihoda) (45,46).

### **1.1.2 Dob**

Iako je rotavirusna infekcija univerzalna i do 5. godine života većina djece ima protutijela na RV (47), dob prve epizode RVGE razlikuje se između i unutar zemalja. Generalno, u zemljama s nižim prihodima medijan dobi prve RV

infekcije je 6-9 mjeseci (80% slučajeva u djece <1 godine), dok je u zemljama s višim prihodima vrijeme prve infekcije često pomaknuto na dob 2-5 godina, premda se većina prvih infekcija ipak događa u dojenačkoj dobi (65% <1 godine) (48). Slične rezultate pokazala je i najveća globalna studija o dobnoj distribuciji RVGE u prevakcinalnom razdoblju (49). U zemljama s visokim mortalitetom postoji tendencija prema mlađoj dobi za RVGE, a gotovo 70% hospitalizacija zbog RVGE događa se u dojenačkoj dobi. Medijan dobi težih RV infekcija, tj. onih koje su zahtijevale hospitalizaciju bio je 38 tjedana (raspon 25-58 tjedana) u zemljama s visokim mortalitetom, a 65 tjedana (raspon 40-107 tjedana) u zemljama s niskim ili vrlo niskim mortalitetom. Razlog tomu je vjerojatno veća izloženost rotavirusnoj infekciji i kraći intervali između ponovljenih infekcija u zemljama s visokim mortalitetom, kao i moguće dobno specifične razlike u ranom zbrinjavanju i liječenju RVGE (49).

### **1.1.3 Sezonstvo**

Globalno, postoje razlike u godišnjoj cirkulaciji RV-a. Još su 1990. godine Cook i suradnici pokazali da je rotavirusna infekcija sezonska u umjerenim klimama, s tipičnim vrhuncem broja slučajeva u zimskim mjesecima, dok je u toplijim područjima tropskih regija bolest cjelogodišnja, bez izraženog sezonstva (50). Pretpostavljeno je da je porast incidencije rotavirusnih infekcija u zimskim mjesecima u umjerenim klimama posljedica boljeg preživljenja virusa u hladnijim uvjetima s nižom vlagom, kao i učinkovitijeg prijenosa sasušenog kontaminiranog fekalnog materijala u takvim uvjetima (51). Međutim, kasnija istraživanja pokazala su da takva generalna podjela vjerojatno nije moguća jer brojne zemlje u tropskim područjima imaju jasan sezonski obrazac infekcije (52), dok neke zemlje s umjerenom klimom imaju cjelogodišnju cirkulaciju virusa (53,54). Nadalje, velika globalna pregledna studija iz prevakcinalnog razdoblja (1995.-2010.) pokazala je da je stupanj razvoja zemlje bolji prediktor sezonstva RV-a nego geografska širina ili lokalizacija. Naime, zemlje s nižim prihodima imale su manje sezonske varijacije u prevalenciji RV infekcije u odnosu na razvijenije zemlje, čak i nakon što su se uzeli u obzir lokalni klimatski i geografski čimbenici (35). Visoke stope transmisije virusa i visoke stope

nataliteta, faktori koji su česti u slabije razvijenim zemljama, dijelom objašnjavaju manje izraženo sezonsvo RV-a u tim zemljama (55). No, neke zemlje sa sličnom klimom, geografskom lokalizacijom i stupnjem razvoja imaju različite obrasce cirkulacije RV-a, što u konačnici znači da za sad ne postoji jedinstveno objašnjenje razlika u sezonsvu rotavirusne infekcije i vjerojatno neki lokalni, još nedefinirani faktori, kao i interakcije između domaćina i okoliša igraju ulogu (35).

Prema podacima EuroRotaNet-a, u Europi je rotavirusna infekcija sezonska, no vrhunci epidemija javljaju se u različitim mjesecima, što ovisi o geografskoj lokalizaciji. Tipično, epidemija se „širi“ od juga prema sjeveru i od zapada prema istoku, tj. najveći broj slučajeva prijavljuje se na jugu i zapadu Europe u kasnu zimu i rano proljeće, odnosno u proljeće (travanj/svibanj) na sjeveru i istoku Europe. Sličan trend zamijećen je i u SAD-u (56–59).

## 1.2 Građa i klasifikacija rotavirusa

Rotavirus je prvi put prepoznat kao patogen u ljudi kad je Ruth Bishop 1973. godine identificirala virus elektronskim mikroskopom u bioptatu duodenuma djeteta s AGE (27). Već prije rotavirusi su otkriveni kao uzročnici proljeva u miševa, majmuna i goveda, a kasnije i brojnih drugih vrsta sisavaca i ptica (60–63). Rotavirusi čine rod *Rotavirus*, jedan od 15 rodova virusne porodice *Reoviridae* koja je podijeljena u dvije potporodice: *Sedoreovirinae* (obuhvaća 6 rodova, od kojih je jedan *Rotavirus*) i *Spinareovirinae* (obuhvaća 9 rodova) (64). Naziv roda potječe od latinske riječi za kotač (lat. *rota*) zbog izgleda virusne čestice pod elektronskim mikroskopom (65). Na temelju serološke reaktivnosti i genetske varijabilnosti VP6 strukturnog proteina, dosad je opisano 9 vrsta unutar roda *Rotavirus* (RVA-D i RVF-J) (64). Vrste RVA, RVB, RVC i RVH mogu izazvati bolest kod ljudi, s tim da većinu infekcija uzrokuje vrsta RVA. RVA također može uzrokovati bolest kod drugih vrsta sisavaca (npr. svinja, goveda, konja, štakora, miševa i šišmiša) i ptica (npr. peradi) u kojih mogu uzrokovati proljev i zaostajanje u razvoju (66). Glavni rezervoar RVB su svinje, a opisan je i kao uzročnik sporadičnih epidemija AGE u odraslih ljudi (67,68).

RVC povremeno uzrokuje epidemije u ljudi, prvenstveno u djece, ali je također široko rasprostranjen među životinjama, prvenstveno svinjama (67,69). RVD, RVF i RVG dosad su opisani isključivo kao patogeni u ptica (70). RVH mogu zaraziti ljude, svinje i šišmiše (71). RVI su opisani u kućnih ljubimaca – pasa i mačaka (72,73), a RVJ tek su nedavno opisani u šišmiša (74). Vrsta RVE opisana je 1999. godine (75), no zbog izostanka daljnjih izolata uklonjena je s popisa vrsta 2019. godine (76).

Zrele rotavirusne čestice ukupnog su promjera oko 100 nm, a sastoje se od genoma koji je obavijen s tri omotača koja čine troslojnu kapsidu virusa ikozaedralnog oblika, i nemaju lipidnu ovojnici (65). Svaki od omotača izgrađen je od strukturnih virusnih proteina: unutarnji se sastoji od VP2, srednji od VP6, a vanjski omotač od VP7 i VP4 (6). Genom rotavirusa sastoji se od 11 segmenata dsRNA koji kodiraju šest strukturnih virusnih proteina (VP1-VP4, VP6, VP7) i šest nestrukturnih proteina (NSP) (NSP1-NSP6) (77). Veličina genoma iznosi 16 do 21 kbp, a svaki genomski segment je zastupljen u jednakom udjelu u virionu. Genomski segmenti su monocistronski, osim segmenta 11 koji kodira dva proteina (NSP5 i NSP6) (78).

Povijesno, VP6 bio je prvi rotavirusni protein koji se koristio za klasifikaciju. I VP2 i VP6 jako su imunogenični proteini rotavirusa, što omogućava laku detekciju protutijela nakon infekcije (79,80). VP6 ima različite epitope koji omogućavaju razlikovanje različitih subgrupa unutar RVA (SG I, SG II, SG I+II ili SG non-I, non-II) na temelju reaktivnosti s dva monoklona protutijela (MAbs) (80). Od 1989. godine primjenjivao se binarni klasifikacijski sustav temeljen na imunološkoj reaktivnosti i strukturi gena dva vanjska proteina, VP4 i VP7, koji neovisno izazivaju stvaranje neutralizacijskih protutijela (80). Inicijalno, rotavirusni tipovi razvrstani su u VP4, tj. P-serotipove, odnosno VP7, tj. G-serotipove, a dosad je prepoznato 14 serotipova G i 14 serotipova P (77). S obzirom da je serotipizacija zahtjevna i neprimjenjiva u svim laboratorijima, a uz sve brži razvoj molekularnih metoda, nadopunjena je i zamijenjena genotipizacijom (6,64,77). Za razliku od klasifikacije serotipova/genotipova G, za serotip/genotip P postoji dvojno nazivlje. Kada je serotip P poznat, označava se arapskim brojem (nakon kojeg katkad slijedi veliko slovo), a genotip P navodi

se odmah nakon oznake serotipa, u uglatim zagradama arapskim brojem (npr. P1A[8]) (6,77). Danas se teži upotrebi klasifikacijskog sustava koji obuhvaća svih 11 segmenata, kako bi se dobio bolji uvid u evoluciju i epidemiologiju rotavirusa. Naime, sekvenciranje genoma humanih i životinjskih rotavirusa pokazalo je postojanje brojnih neuobičajenih rotavirusnih sojeva, od kojih neki imaju miješane konstelacije dsRNA segmenata kao posljedice stalnih preslagivanja genoma. Ta proširena shema klasifikacije, temeljena na sekvenciranju genoma, označava se s Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, a predstavlja redom genomske segmente VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5, pri čemu je x broj genotipa (6,81).

### **1.2.1 Distribucija rotavirusnih genotipova**

Dosada je opisano ukupno 36 genotipova G i 51 genotip P RVA (82). Činjenica da RV ima segmentirani genom i da je stoga moguće preslagivanje genoma, teoretski omogućava kreiranje gotovo 800 različitih G i P kombinacija, dovodeći do stvaranja novih reasortnih RV-a (77,83).

Unatoč ogromnoj genetskoj i antigenskoj raznolikosti RV-a, globalno je prije uvođenja cjepiva samo mali broj G/P kombinacija uzrokovao većinu infekcija u ljudi. Kombinacije G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8] uzrokovale su 80-90% svih rotavirusnih infekcija u Sjevernoj Americi, Europi i Australiji (7,8,58), dok su u zemljama Afrike, Azije i Južne Amerike bili češći „neuobičajeni“ genotipovi poput G5, G6, G8 ili G12, kao i miješane infekcije (84–86).

U prevakcinalnom razdoblju dominacija genotipske kombinacije G1P[8] bila je tipična za zemlje gdje rotavirusno cjepivo nije uvedeno u NIP, premda se zastupljenost određenih genotipskih kombinacija ili genotipova mijenja ovisno o geografskoj lokalizaciji i iz sezone u sezonu (9). Nadalje postoje razlike u distribuciji genotipova između glavne rotavirusne sezone i izvansezonskog razdoblja, pri čemu je kombinacija G1P[8] dominantna u sezoni, a izvan sezone raste udio rjeđih kombinacija, kao i miješanih i netipabilnih genotipova, što je vjerojatno posljedica akumulacije homotipne zaštite prema G1P[8] na kraju sezone (87). Preslagivanje između najučestalijih genotipova G i P, koji stalno

kruže na nekom području, dovodi do pojave neuobičajenih kombinacija. Npr. genotipovi G1P[4] i G2[8] često cirkuliraju zajedno s genotipovima G1P[8] i G2P[4] (88).

Dosad je samo jedno istraživanje o distribuciji rotavirusnih genotipova uključivalo i Hrvatsku, i to samo Zagreb, tj. Središnju Hrvatsku. Rezultati su pokazali neuobičajeno niski udio „čestih“ rotavirusnih genotipova (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8]) (59.9%) u odnosu na druge zemlje Središnje i Jugoistočne Europe, premda je G1P[8] bio najčešći genotip (21.8%).

„Neuobičajene“ G/P kombinacije također su bile česte (8%), a G8P[8] činio je čak 6,8% uzoraka, a najčešći je bio u dojenačkoj dobi. Neobično je bio visok i udio miješanih infekcija (8,1%), što je tipično za tropske i subtropske zemlje (89). Istraživanja distribucije rotavirusnih genotipova koja bi obuhvatila druge regije Hrvatske dosad nisu provedena.

Praćenje pojave novih rotavirusnih genotipova je od iznimnog značenja zbog stalne evolucije rotavirusa (preslagivanja genoma, točkaste mutacije, međuvrtni prijenos rotavirusa), a pogotovo nakon uvođenja rotavirusnih cjepiva, zbog potencijalne zamjene cirkulirajućih genotipova kao posljedice imunološkog selektivnog pritiska cjepiva (90). Istraživanja u nekim zemljama koje su uvele rotavirusno cjepivo u NIP, poput Australije, Brazila i Belgije, pokazala su da je možda cjepivo pridonijelo promjenama predominantnih genotipova, premda bi te promjene mogle biti i posljedica prirodnih varijacija u distribuciji genotipova (91,92). Stoga je prije i nakon uvođenja rotavirusnih cjepiva u NIP nužno praćenje molekularno-epidemioloških značajki cirkulirajućih genotipova kako bi se procijenilo omogućuje li cjepivo zaštitu protiv heterotipnih genotipova koji nisu uključeni u cjepivo te kako bi se procijenio eventualni učinak cjepiva na zamjenu cirkulirajućih genotipova. Nadalje, detekcija neuobičajenih i novih tipova rotavirusa, pogotovo onih koji nastaju preslagivanjem genoma humanih i životinjskih sojeva, nužna je za procjenu „prikladnosti“ postojećih rotavirusnih cjepiva (93).



## 1.2.2 Evolucija i međuvrski prijenos rotavirusa

Nekoliko različitih mehanizama pridonosi vrlo dinamičnoj evoluciji rotavirusa, a najvažniji su točkaste mutacije koje nastaju kontinuirano zbog pogreškama sklone rotavirusne RNA polimeraze (94) i genomsko preslagivanje, koje je često uključeno u zoonotsku transmisiju (13,95,96).

U životinja, kao i u ljudi, RV su vodeći uzročnici virusnog proljeva, pogotovo u intenzivnim farmskim uzgojima diljem svijeta gdje uzrokuju značajne ekonomske gubitke (78). Općenito, RV su specifični za domaćina, stoga je većina životinjskih RV oslabljena u heterolognom domaćinu (čovjeku), što je kasnije iskorišteno i u proizvodnji cjepiva (77,97). Stoga, kada RV izravno prijeđu vrsnu barijeru, uglavnom nisu sposobni učinkovito inficirati ili se širiti u novom domaćinu (96). No, ako dva različita soja rotavirusa (npr. životinjski ili humani soj) inficiraju istu stanicu, može doći do razmjene genomskih segmenata čime nastaju reasortanti koji posjeduju dsRNA segmente obaju roditeljskih virusa. Stjecanjem humanih genomskih segmenata životinjski RVA počinju se učinkovito širiti u novom domaćinu (96). Štoviše, infekcija humano-animalnim reasortantima u ljudi može uzrokovati težu kliničku sliku nego infekcija „klasičnim“ RVA, vjerojatno zbog slabije imunosti na te emergentne sojeve, ali moguće i zbog veće virulencije kao posljedice genetskog preslagivanja (98). Procijenjena učestalost humano-animalnih reasortanata je oko 2% među genotipiziranim humanim sojevima RVA (99). Neki od humano-animalnih reasortanata postali su važni i globalno. Npr. za neuobičajene genotipove G9P[8] i G12P[8], koji su postali emergentni tijekom kasnih 1990-ih i ranih 2000-tih godina, pokazalo se da je genomski segment VP7 vjerojatno svinjskog podrijetla, a drugi površinski antigeni i genotipska konstelacija humanog podrijetla (88). Genotip G10P[11], koji je čest patogen na indijskom potkontinentu, ima segmente NSP1 i NSP3 humanog, a ostale segmente goveđeg podrijetla (96,100). Iz svega navedenog slijedi da je zoonotski potencijal RV-a velik i pridonosi velikoj genetskoj raznolikosti RA-a u ljudi te je potreban stalni nadzor i u ljudi i u životinja zbog moguće pojave novih genotipova od globalnog ili regionalnog značenja (81,101).

### 1.3 Prijenos i patogeneza

Rotavirusi se izlučuju u velikoj koncentraciji ( $10^{12}$  virusnih čestica u jednom gramu stolice tijekom akutne bolesti) u stolici zaražene djece nekoliko dana prije i nekoliko dana nakon klinički manifestne bolesti, a samo nekoliko viriona dovoljno je da izazove bolest u domaćina (102). Uz navedeno, rotavirusi su jako otporni na različite okolišne uvjete (npr. temperaturu i pH), što pridonosi velikoj infektivnosti i učinkovitoj transmisiji (103). Rotavirusi se primarno prenose feko-oralnim putem, uključujući direktan, bliski kontakt među osobama, kao i prijenos preko zaraženih površina (104). Prijenos preko kontaminirane hrane ili vode je moguć, ali rijedak (105). Zbog kratkog vremena inkubacije (<48h), eksplozivne prirode rotavirusnih epidemija i velike učestalosti respiratornih simptoma u oboljelih od rotavirusne infekcije, pretpostavljeno je da se virus može prenositi i kapljičnim putem (106), no takav način prijenosa ostaje nedokazan. Izlučivanje virusa u stolici traje prosječno 10 dana, no neke studije pokazale su da čak trećina imunokompetentne djece izlučuje virus i duže od 20 dana (107).

Ciljne stanice za RV su zreli enterociti smješteni u proksimalne dvije trećine tankog crijeva (108). Inicijalna interakcija virusa i domaćina događa se vezanjem virusnog VP4 antigena za stanične receptore domaćina koji uključuju različite sijaloglikane (npr. gangliozidi GM1 i GD1a) i antigene histo-krvne grupe (eng. *histo-blood group antigens*, HBGAs) koji su kompleksni karbohidrati smješteni na površini eritrocita i epitela probavnog, mokraćnog i respiratornog sustava (109,110). Genetske razlike u ekspresiji HBGAs utječu na varijacije u epidemiologiji rotavirusa i infekciji različitim genotipovima (111). Npr. genotipovi P[8] i P[4] dominantno se vežu na Lewis b i H-tip 1 antigene (112), genotipovi P[9], P[14], i P[25] vežu se na tip A antigene (113), dok se P[11] selektivno veže na tip-2 prekursorški glikan (114).

Rotavirusna infekcija uglavnom je ograničena na sluznicu tankog crijeva, iako postoje dokazi o umnažanju virusa i u lamini propriji, regionalnim limfnim čvorovima i udaljenim ekstraintestinalim mjestima, što je rijetkost u imunokompetentnih osoba (77). Patogeneza RVGE je multifaktorska (115). Jedan mehanizam je masivna nekroza crijevnog epitela zbog ekstenzivne

virusne replikacije, što dovodi do vilozne atrofije, gubitka mikrovila, infiltracije mononuklearnim upalnim stanicama te posljedično do gubitka enzima četkaste prevlake, poput maltaze i laktaze (27). U konačnici zbog malapsorpcije nutrijenata, elektrolita i tekućine raste osmotski tlak u lumenu crijeva i razvija se proljev (77,116). Drugi mehanizam je proizvodnja virusnog enterotoksina NSP4 koji se veže za epitelne stanice crijeva (117) i putem fosfolipaza C signalnog puta inducira sekreciju klorida u lumen crijeva (118). Visoka koncentracija klorida u lumenu crijeva nadalje stvara osmotski gradijent koji uzrokuje pomak vode u lumen i razvoja sekretornog proljeva (119). Treći mehanizam je aktivacija autonomnih živčanih završetaka putem serotonina koji se oslobađa iz enterokromafinih stanica tankog crijeva djelovanjem enterotoksina NSP4, što u konačnici povećava pokretljivost crijeva (120). Oslobađanje serotonina također ima ulogu i u razvoju povraćanja, stimulacijom aferentnih završetaka vagalnog živca i posljedično struktura moždanog debla koje kontroliraju povraćanje (121). Prema dosadašnjim spoznajama, ekstraintestinalno širenje rotavirusa je često, potvrđeno detekcijom rotavirusne dsRNA, rotavirusnih antigena ili (rijetko) infektivnih viriona u serumu ili drugim tjelesnim tekućinama i tkivima (122,123), no pravo kliničko značenje u imunokompetentnih osoba ostaje nedefinirano. Neka istraživanja su pokazala da su antigenemija/viremija u tijeku rotavirusne infekcije povezana s težom kliničkom slikom, pogotovo u vidu visine vrućice, broja povraćanja ili pojave konvulzija, no točan mehanizam ostaje nepoznat (124). Osim u serumu, RV je također detektiran u brojnim ekstraintestinalnim sijelima, uključujući središnji živčani sustav (SŽS) koji je najčešće mjesto ekstraintestinalnih manifestacija, zatim jetru, srce, mokraćni mjehur, pluća, bubrege, testise (122,125). Tropizam RV za neurone u SŽS vjerojatni je patogenetski mehanizam neuroloških manifestacija rotavirusne infekcije, a putevi virusne diseminacije iz crijeva u SŽS vjerojatno uključuju vezanje RV za specifične stanične receptore (HBAGs, sijaličnu kiselinu, integrine..) i posljedično prelazak krvno-moždane barijere, a retrogradni aksonalni transport također je jedan od predloženih mehanizama (126). U imunokompromitiranih osoba RV se može umnažati u jetri, bilijarnom sustavu i gušterači i biti povezan s bilijarnom atrezijom i pankreatitisom (127).

## 1.4 Tijek infekcije

Rotavirusna infekcija može biti simptomatska ili asimptomatska, što ovisi o brojnim čimbenicima virusa i domaćina. Dob je glavni čimbenik od strane domaćina koji utječe na klinički ishod rotavirusne infekcije (115). Tako je rotavirusna infekcija u zdrave, terminske novorođenčadi obično asimptomatska ili blažeg tijeka, vjerojatno zbog zaštite koju pružaju transplacentarno prenesena majčina protutijela (128). Pad titra majčinih protutijela obično koincidira s dobi u kojoj je najveći rizik za teži tijek bolesti, a taj rizik zadržava se otprilike do pete godine života, kada je zbog razvoja imunosti nakon doticaja s RV manja vjerojatnost razvoja (teške) infekcije (115). Općenito, vrijedi pravilo da iako djeca mogu više puta imati RVGE, prva infekcija u dobi nakon tri mjeseca života nosi najveći rizik od težeg tijeka bolesti i dehidracije (47,129,130). Odrasle osobe također mogu razviti kliničku sliku RVGE, premda je vjerojatnost teže bolesti mala, i obično je vezana uz infekciju neobičnim genotipom virusa ili ekspoziciju velikoj infektivnoj dozi (77). Drugi čimbenici domaćina koji povećavaju rizik za teži oblik bolesti su pothranjenost (131), izostanak dojenja, mala porođajna težina, pohađanje kolektiva, drugo dijete u kućanstvu mlađe od 24 mjeseca (132), potom čimbenici od strane majke (mlađa dob, pušenje) i muški spol (133). Više studija istaknulo je prematuritet kao važan rizični čimbenik za teži tijek bolesti (132,133). Djeca ili odrasli koji su imunokompromitirani zbog primarne imunodeficijencije (T-stanične ili kombinirane), maligne bolesti ili su primatelji hematopoetskih matičnih stanica ili solidnog organa, imaju veći rizik za težu kliničku sliku RVGE, produženi tijek bolesti (134–136), kao i za razvoj određenih ekstraintestinalnih manifestacija (127).

## 1.5 Klinička slika

Inkubacija RVGE je kratka, najčešće 18-36 sati (137). Klinički spektar varira od blagog AGE kratkog trajanja do teškog proljeva s povraćanjem i visokom

vrućicom, što u konačnici može dovesti do elektrolitskog disbalansa, dehidracije, hipovolemijskog šoka i smrti (138). Bolest obično počinje naglo, povraćanjem i vrućicom, a nakon 24-48h obično se pojavljuju učestale vodenaste stolice (77). Čak jedna trećina djece s RVGE ima vrućicu  $>39^{\circ}\text{C}$  (139). Povraćanje obično traje  $<24$  h, a proljev se najčešće smiruje nakon 3-7 dana (140). RVGE se klinički ne može sa sigurnošću razlikovati od akutnog AGE druge etiologije. No, u oboljelih od RVG češće su prisutna sva tri simptoma (povraćanje, proljev, vrućica) i bolest je obično težeg tijeka u usporedbi s AGE uzrokovanim drugim virusima (141,142). Vjerojatnost prijenosa virusa među drugim članovima kućanstva je jako velika i u rasponu je od 15% (143) do 28% (142). Asimptomatske stope transmisije također su visoke, a prema rezultatima jedne studije iznose čak 22% (142).

Sve je više dokaza da je rotavirusna infekcija sistemska, a opisane su i brojne ekstraintestinalne manifestacije, kao i moguća povezanost s autoimunim bolestima poput celijakije, šećerne bolesti ili miastenije gravis (126). Konvulzije su najčešća ekstraintestinalna manifestacija rotavirusne infekcije. Radi se uglavnom o benignim konvulzijama koje se javljaju s učestalošću 4-8% u oboljelih od RVGE (126), uz uredne neuroradiološke nalaze, dobru prognozu i bez potrebe za specifičnim liječenjem antiepilepticima (144). Druge neurološke manifestacije uključuju febrilne konvulzije, encefalopatiju, akutni cerebelitis, tranzitornu akutnu mlohavu paralizu, opsoklonus-mioklonus sindrom, a opisane su i brojne druge ekstraintestinalne manifestacije rotavirusne infekcije poput neonatalnog nekrotizirajućeg enterokolitisa, akutnog artritisa, vaskulitisa, pankreatitisa i brojnih drugih, čija je točna incidencija nepoznata (126).

### **1.5.1 Zaštitna imunost**

Velázquez i suradnici u svom istraživanju 1996. godine pokazali su da prirodna rotavirusna infekcija štiti od narednih infekcija RV-om. Štoviše, zaštita raste s brojem rotavirusnih infekcija (relativni rizik 0.62, 0.40 i 0.34 nakon prve, druge, odnosno treće infekcije), a težina narednih infekcija je manja nego težina prve. Nadalje, dvije prirodne RV infekcije, bilo simptomatske ili asimptomatske, prema rezultatima istraživanja, pružale su 100%-tnu zaštitu od umjereno teške ili teške

sljedeće rotavirusne infekcije. Naredne infekcije češće su bile uzrokovane drugim G-tipom upućujući primarno na homotipnu zaštitu (47). Iznimno je bitno za istaknuti da i simptomatska i asimptomatska rotavirusna infekcija gotovo jednako štite od narednih infekcija, a ta je činjenica bila ključna za razvoj rotavirusnih cjepiva s idejom da cjepivo „oponaša“ prvu asimptomatsku infekciju (47,145).

Točni efektorni mehanizmi zaštitne imunosti protiv rotavirusne infekcije nisu do kraja poznati, no zna se da i nespecifična (prirođena) i specifična (i humoralna i stanična) imunost sudjeluju u kontroli i zaštiti od rotavirusne infekcije (115).

Humoralna imunost predmet je najvećeg broja istraživanja koja su pokazala da RV pobuđuje stvaranje lokalnih (sluzničkih) IgA protutijela, kao i sistemskih protutijela razreda IgA i IgG (146), a čini se da su specifična sistemska IgA i IgG protutijela u visokom titru ( $>1:200$ ) povezana sa zaštitom od narednih rotavirusnih infekcija. Slično tomu, značajna povezanost postoji između visine IgA titrova i učinkovitosti rotavirusnih cjepiva (147). Protutijela (IgG i IgA) se stvaraju na imunogenične proteine vanjske ovojnice (VP7 i VP4) i po svom djelovanju su neutralizacijska te štite od infekcije. U rekonvalescentnim serumima oboljelih također su detektirana i protutijela na imunodominantne epitope VP2 i VP6 proteina, no nisu neutralizirajuća te je njihovo kliničko značenje još uvijek nepoznato (146). Zanimljivo je da se nakon prve, prirodno stečene rotavirusne infekcije ili cijepljenja razvija u prvom redu homotipna zaštitna imunost, tj. stvaraju se neutralizacijska protutijela na G-tip soja koji je uzrokovao infekciju, odnosno cijepnog soja (148), dok sljedeće rotavirusne infekcije pobuđuju i homotipni i heterotipni (na sojeve s drugim G-tipovima) imunski odgovor (148–150). Vjerojatni razlog tomu je što humoralni odgovor najprije pobuđuju površinski VP7 i VP4 epitopi, rezultirajući stvaranjem neutralizacijskih protutijela, a kod sljedećih infekcija razvijaju se protutijela na druge, konzervirane epitope VP7 i VP4 proteina ili sasvim druge rotavirusne antigene (77).

### 1.5.2 Ocjenjske ljestvice za procjenu težine kliničke slike

Postoji nekoliko ocjenjskih ljestvica za procjenu težine RVGE, poput Vesikarijeve ljestvice (151), Clarkove ljestvice (152) ili modificiranih verzija Vesikarijeve ljestvice (153,154).

Najčešće korištene ocjenjske ljestvice su Vesikarijeva 20-bodovna (151) i Clarkova 24-bodovna (152). Obje ljestvice su inicijalno razvijene u sklopu kliničkih istraživanja rotavirusnih cjepiva (Vesikari – RIT 4237 cjepivo, Clark – WC3 bovino cjepivo), s ciljem procjene učinkovitosti cjepiva (151,152).

Navedene ljestvice imaju nekoliko zajedničkih kategorija: obje mjere broj i trajanje proljeva i povraćanja i visinu tjelesne temperature, dok Vesikarijeva ljestvica dodatno uključuje procjenu dehidracije i primijenjeno liječenje (151), a Clarkova evaluaciju ponašanja oboljele osobe (152). Vesikarijeva ljestvica ima dvije kategorije: epizoda AGE s  $\geq 11$  bodova smatra se teškom, a  $< 11$  bodova „ne-teškom“ (151), dok Clarkova ljestvica ima tri kategorije: epizoda s  $> 16$  bodova smatra se teškom, s 9-16 bodova umjereno teškom, a  $< 9$  bodova blagom (152). S obzirom da ljestvice imaju različit broj kategorija, direktna usporedba nije moguća (155). Nadalje, problem je nastajao kod pokušaja usporedbe učinkovitosti rotavirusnih cjepiva, ako su u istraživanjima korištene različite ocjenjske ljestvice. Primjerice, u kliničkim studijama učinkovitosti RV5 korištena je Clarkova ljestvica (156), dok je u studiji učinkovitosti RV1 korištena Vesikarijeva ljestvica (157). Oba cjepiva pokazala su sličnu učinkovitost u prevenciji rotavirusnog AGE bilo koje težine (74% za RV5 i 70% za RV1), dok su u prevenciji teških oblika rotavirusnog AGE rezultati bili drukčiji – učinkovitost RV5 bila je 98%, a RV1 86%. Iako se ova dva istraživanja ne mogu direktno usporediti, razlika u numeričkim vrijednostima učinkovitosti mogla bi se, barem dijelom, pripisati korištenju različitih ocjenjskih ljestvica (155).

Nekoliko je istraživanja pokazalo da se Vesikarijeva i Clarkova ocjenjska ljestvica značajno razlikuju u definiciji „teškog“ RVGE (155,158–160). Naime, Vesikarijeva ljestvica u odnosu na Clarkovu značajno veći broj bolesnika svrstava u skupinu „teškog“ AGE: 76% vrs. 27% (155), 66.1% vrs. 1.6% (158), 57% vrs. 1.5% (159), 40.6% i 56.0% vrs. 9.5% i 6.3% (160). Pokušaj modifikacije Vesikarijeve ljestvice, na način da je umjesto u dvije, podijeljena u

tri kategorije (<11 blaga bolest, 11-15 umjereno teška bolest i ≥16 teška bolest) povećao je korelaciju između dvije ljestvice u dvjema studijama, no i dalje nezadovoljavajuće (155,159). Čak 45% (155), odnosno 89% (159) bolesnika s Vesikari ocjenom ≥16 bili su klasificirani kao umjereno teški AGE prema Clarkovoj ljestvici.

Radi uniformnosti, danas se u postmarketinškim istraživanjima učinkovitosti rotavirusnih cjepiva koristi prvenstveno Vesikarijeva ljestvica (161–163). Postoje i modificirane Vesikarijeve ljestvice, Nakagomijeva 20-bodovna u kojoj je kategorija „liječenje“ iz originalne Vesikarijeve ljestvice zamijenjena kategorijom „razina aktivnosti“ (154) i Freedmanova 20-bodovna, koja umjesto varijable „dehidracija“ iz Vesikarijeve ljestvice koristi varijablu „razina potrebne zdravstvene skrbi“ (153). I Vesikarijeva i modificirane Vesikarijeve ocjenske ljestvice široko se koriste u procjeni težine AGE u djece, ne samo rotavirusnog (164–166), dok se Clarkova ipak koristi nešto rjeđe.

## **1.6 Bolničke (nozokomijalne) rotavirusne infekcije**

Epizoda AGE smatra se bolničkom (nozokomijalnom) ako se simptomi bolesti pojave unutar 48 sati od primitka u bolnicu do 72 sata nakon otpusta iz bolnice (167). Generalno, AGE čini čak 65-90% svih nozokomijalnih infekcija na pedijatrijskim odjelima, pri čemu su virusi najčešći uzročnici (91-94% slučajeva), a RV najčešći među njima (31-87% slučajeva) (168). Podaci o incidenciji nozokomijalnih rotavirusnih gastroenteritisa (NRV AGE), kao i izračuni o dodatnim danima hospitalizacije zbog NRV AGE pokazuju značajnu divergenciju (169). Prema rezultatima istraživanja Gervasija i suradnika, koje je uzelo u obzir 23 studije o NRV AGE u Europi, medijan incidencije NRV AGE je 29 (3-277) NRV AGE/1000 hospitalizacija, 198 (30-1030) NRV AGE/100 000 djece <5 g. i 4.8 (0.46-13) NRV AGE/1000 dana hospitalizacije (169). Isto istraživanje pokazalo je da je zbog NRV AGE trajanje hospitalizacije duže za medijan od 4.7 dana (raspon 1.7-10) (169).

NRV se tipično „unese“ na pedijatrijski odjel hospitalizacijom djeteta s domicilnim RVGE ili boravkom u hitnoj službi prije hospitalizacije zbog neke



druge bolesti. Simptomi NRV AGE obično se pojavljuju između drugog i šestog dana hospitalizacije (170). Tipični simptomi su vrućica (60-100% slučajeva), proljev i povraćanje, kao i kod izvanbolničkih (domicilnih) RVGE (170,171). Zanimljivo je da su asimptomatske NRV infekcije jako česte u novorođenčadi i male dojenčadi (<3 mjeseca), s rasponom 18-39% svih NRV slučajeva. Nekoliko je potencijalnih objašnjenja za ovu pojavu, poput transplacentarno stečenih majčinih protutijela ili cirkulacije tzv. „dojenačkih“ rotavirusnih genotipova koji su manje patogenosti (128,172–174). Glavni vektori transmisije NRV su kontaminirani, uglavnom nezaraženi i asimptomatski, zdravstveni djelatnici. Naime, RV su detektirani na rukama čak 76-78% zdravstvenih djelatnika koji se skrbe o djeci, i na čak 20% djelatnika koji nisu uključeni u direktnu skrb za djecu (103,175). Okoliš je ključni rezervoar RV-a u bolničkom okruženju jer virus može ostati infektivan 1-10 dana na površinama (npr. igračkama, medicinskoj opremi) u uvjetima niske vlažnosti (176). Asimptomatske NRV infekcije također značajno pridonose širenju RV u bolničkim uvjetima (174). Čimbenici povezani s povećanim rizikom za NRV AGE su: dužina hospitalizacije, pri čemu rizik značajno raste (čak do 70%) s trajanjem hospitalizacije >6 dana, zatim mlađa dob, neadekvatna organizacija rada na pedijatrijskim odjelima (manjak osoblja), nepridržavanje mjera kontaktne izolacije, kao i prisutnost ne-medicinske populacije na odjelima (uključivo roditelje i rodbinu) koji su potencijalni nositelji ili izvor rotavirusne infekcije. Dodatni značajni čimbenici rizika su prematuritet i niska porođajna masa, imunodeficijencija ili pothranjenost (167,177).

Djeca s NRV AGE generalno su mlađa nego djeca s domicilnim RVGE, s vrhuncem incidencije u dobi 0-11 mjeseci, za razliku od domicilnih RVGE gdje je vrhunac u dobi 6-23 mjeseca (167,174,178,179). Prema rezultatima istraživanja Forstera i suradnika čak 43% djece s NRV AGE bilo je mlađe od 6 mjeseci, za razliku od 17% bolesnika s domicilnim RVGE (178). Bolesnici s NRV AGE prosječno su 9.8 -10.6 mjeseci mlađi u odnosu na bolesnike s domicilnim RVGE (168,179).

NRV AGE ima izraženo sezonstvo u umjerenim klimama, kao što je slučaj i s domicilnim RVGE, s vrhuncem incidencije u zimskim mjesecima (180), no u

male dojenčadi (<4 mjeseca) čini se da je sezonstvo manje izraženo, a slučajevi se pojavljuju jednakim intenzitetom cijele godine (181). To se objašnjava niskom, ali konstantnom stopom simptomatskih infekcija uzrokovanih „neonatalnim“ rotavirusnim genotipovima (181). Prema dosadašnjim spoznajama, nema razlike u distribuciji rotavirusnih genotipova između domicilnih i NRV AGE (174,180)

Dehidracija je klasična komplikacija RVGE, kako domicilnih, tako i NRV AGE, te nema komplikacija koje su specifično posljedica NRV AGE (182). Prema dosadašnjim istraživanjima, nema značajne razlike u težini kliničke slike između domicilnih RVGE i NRV AGE (180). Frühwirth i suradnici pokazali su da je Vesikarijeva ocjena slična u domicilnih RVGE i NRV AGE (medijan 9-11 vrs. 8-9) (183). Međutim, u dva istraživanja oboljeli od domicilnih RVGE imali su veću stopu dehidracije nego oboljeli od NRV AGE (184,185). Mortalitet zbog NRV AGE u razvijenim zemljama je malen te je najveći značaj tih infekcija u produženju trajanja hospitalizacije te povećanju direktnih i indirektnih troškova. Naime, NRV AGE produžuju trajanje hospitalizacije za 1.7-5.9 dana (167).

Postoji samo nekoliko studija koje su procijenile troškove NRV AGE, a prema tim podacima, troškovi jedne epizode iznose i do 2500 €. Međutim to su samo „direktni“ troškovi, a realna cijena je zasigurno puno veća (167).

Veći je broj preventivnih mjera za smanjenje širenja NRV AGE, no sve imaju ograničenu korist. Najbitnija mjera je adekvatno pranje ruku (186). Upotreba alkoholnih dezinficijensa za ruke (60-70%-tni etanol ili izopropanol), umjesto pranja ruku, također se pokazala vrlo učinkovitom u smanjenju broja vijabilnih patogena na rukama (187). Međutim, puno je zapreka koje ograničavaju korist ovih mjera, poput velike infektivnosti RV, manjka i veliki obrtaja osoblja na odjelima, nepridržavanja gore navedenih mjera, kao i prenapučenosti odjela i neadekvatne infrastrukture koje onemogućavaju pravilno provođenje mjera kontaktne izolacije. Dodatno, rani simptomi RVGE mogu biti nespecifični (npr. samo povišena tjelesna temperatura) pa se oboljeli često ne izoliraju na vrijeme. Iz svega navedenog slijedi da će NRV AGE zasigurno i dalje predstavljati značajan epidemiološki i ekonomski problem, a univerzalna

implementacija rotavirusnog cjepiva imala bi veliki utjecaj ne samo na smanjenje incidencije domicilnih RVGE, nego i NRV AGE (167).

### 1.7 Laboratorijska dijagnostika rotavirusne infekcije

Laboratorijska dijagnostika rotavirusne infekcije uključuje testiranje uzoraka svježe stolice ili obriska rektuma u bolesnika sa simptomima na prisutnost virusa, virus-specifičnog antigena ili RNA (188). Moguća je i direktna detekcija virusa upotrebom elektronskog mikroskopa, što je metoda visoke osjetljivosti i specifičnosti, no skupa je i nije praktična za rutinsku obradu velikog broja uzoraka (17). Komercijalno dostupne metode za detekciju antigena najčešće se koriste u dijagnostici rotavirusne infekcije, a uključuju enzimski povezani imunosorbentni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), lateks aglutinaciju i imunokromatografske testove (ICT). ELISA je jedna od najčešćih korištenih metoda, visoko je osjetljiva i specifična i omogućuje obradu velikog broja uzoraka (188), no sve se više zamjenjuje imunokromatografskim testovima koji su jeftiniji, brži, jednostavni za korištenje, a osjetljivost i specifičnost je slična ELISA testovima (189). U usporedbi s lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR), ICT-ovi su također pokazali visoku osjetljivost (85-94%, ovisno o proizvođaču) i specifičnost (89-100%), što ih čini široko primjenjivom i pouzdanom metodom detekcije RV (190–192). PCR metode detekcije RV, poput reverzna transkripcija-lančane reakcije polimerazom (eng. *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), kvantitativne lančane reakcije polimerazom (eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) ili lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time Polymerase Chain Reaction*, real-time PCR), detektiraju virusnu RNA u kliničkom uzorku, osjetljivije su u odnosu na antigenske testove, a omogućuju određivanje genotipa virusa, što je od ključnog značenja u epidemiološkom nadzoru nad RV-om (191). Zbog čestih točkastih mutacija rotavirusnog genoma te moguće zoonotske transmisije i stvaranja reasortanata, potreban je stalni nadzor i povremena promjena PCR početnica, kako ne bi došlo do grešaka u genotipizaciji ili nemogućnosti određivanja

genotipa (193,194). Ponekad se primjenjuje sekvenciranje VP7 ili VP4 virusnih proteina u slučajevima kada se ne uspije odrediti genotip (195), no klasične metode sekvenciranja su skupe i zahtijevaju puno vremena i napora (196). U posljednje vrijeme sve više se koristi kvantitativna reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*, real-time RT-qPCR), poput TaqMan® eseja, koja je u usporedbi s klasičnim metodama RVA genotipizacije (RT-PCR i sekvenciranje) brža, zahtijeva manje napora, a zadržava visoku osjetljivost i specifičnost u usporedbi s klasičnim PCR-om (196,197).

## **1.8 Liječenje rotavirusnog gastroenteritisa**

RVGE je samoograničavajuća bolest čije je liječenje u prvom redu simptomatsko. Oralna rehidracija hipoosmolarnim otopinama je osnova terapije i treba se započeti što ranije. Intravenska rehidracija izotoničnim otopinama rezervirana je za slučajeve teške dehidracije ili ako bolesnik ne može uzimati oralne rehidracijske otopine (198). Dodatna terapija, uz rehidracijske otopine, uključuje antisekretorne lijekove (npr. racekadotril), adsorbense, antiemetike te probiotike ili prebiotike, no njihova korist u smanjenju težine ili trajanja RVGE je kontroverzna i zahtijeva daljnja istraživanja (199). Trenutno nema specifičnih antivirusnih lijekova za RVGE (115).

## **1.9 Prevencija rotavirusnog gastroenteritisa**

### **1.9.1 Nespecifične mjere**

Nespecifične mjere kontrole RVGE uključuju mjere osobne higijene (pranje ruku sa sapunom i vodom u trajanju od barem 20 sekundi prije konzumacije ili pripremanja hrane ili nakon korištenja toaleta), adekvatno zbrinjavanje pelena oboljelog djeteta te pranje ruku nakon promjene pelena ili kontakta s povraćenim sadržajem, zatim mjere kontaktne izolacije u hospitaliziranog

bolesnika s RVGE i adekvatni okolišni sanitarni uvjeti (pravilno zbrinjavanje otpadnih voda i dostupnost zdravstveno ispravne vode za piće) (115). Sve je više govora i o važnosti dojenja u prevenciji RVGE. Majčino mlijeko, naime, sadržava bioaktivne komponente poput protutijela, antioksidansa i nutritivnih tvari te ima ulogu u prevenciji i smanjenju težine RVGE (115). Istraživanja Shumetieja i suradnika i Krawczyk i suradnika pokazala su da prehrana isključivo majčinim mlijekom u prvih šest mjeseci života značajno smanjuje rizik od razvoja RVGE te morbiditet kod onih koji akviriraju infekciju (200,201). Smjernice SZO za liječenje AGE u dječjoj dobi stoga uključuju preporuku za nastavak dojenja kako bi se smanjilo trajanje i težina bolesti (202).

## **1.9.2 Cijepljenje**

### **1.9.2.1 Povijest**

Prevenција RVGE poboljšanjem higijenskih i sanitarnih uvjeta je ograničena zbog ubikvitarnosti RV, relativno lakog prijenosa i rezistencije na okolišne uvjete (203).

Put za razvoj rotavirusnih cjepiva utrlo je istraživanje Velázquez i suradnika koji su pokazali da prirodna rotavirusna infekcija, bilo simptomatska ili asimptomatska, pruža zaštitu od narednih infekcija (47). Nadalje, pokazano je da je zaštita koja je stečena nakon ponavljanih prirodnih infekcija povezana s prisutnošću neutralizacijskih protutijela u serumu i crijevima (204,205). Ove dvije činjenice ukazivale su na potencijalnu mogućnost prevencije RVGE cijepljenjem. Uzimajući još u obzir epidemiološke podatke o visokom morbiditetu i mortalitetu od RVGE, razvoj rotavirusnih cjepiva ocijenjen je od visokog prioriteta (206). Konačni postavljeni ciljevi cijepljenja protiv RV bili su: imitiranje zaštite koju pruža prirodna infekcija, zaštita od srednje teškog do teškog tijeka bolesti, smanjenje težine i trajanja bolesti, prevencija hospitalizacije i smrti, te smanjenje socioekonomskog tereta (47,157).

U proizvodnji prvih rotavirusnih cjepiva iskorištena je činjenica da su životinjski RV oslabljeni u heterolognom domaćinu (čovjeku) (97) te su, vodeći se Jennerovim pristupom, živa oslabljena životinjska cjepiva bila prvi kandidati.

Prvo takvo cjepivo bilo je RIT 4237, bovini soj koji je dodatno oslabljen pasažama na staničnim kulturama. Inicijalni rezultati bili su ohrabrujući – cjepivo je bilo sigurno, imunogenično i pružalo je visoku zaštitu od teških oblika bolesti u kliničkim istraživanjima (207). No, RIT 4237, kao i još dva monovalentna cjepiva temeljena na životinjskim RV (WC3, bovini soj, i RRV, majmunski soj) pokazali su varijabilnu učinkovitost te nisu nikad odobreni (208–210).

Jedna od ideja o mogućem načinu povećanja učinkovitosti životinjskih cjepiva je stvaranje reasortanata humanih i životinjskih RV, na način da je životinjski RV činio „osnovicu“, a geni za VP7 i VP4 antigene, na koje se stvaraju neutralizacijska protutijela, zamijenjeni su genima humanih RV (211) – tzv. „modificirani Jennerov“ pristup (212).

Prvo takvo rotavirusno cjepivo, a ujedno i prvo odobreno cjepivo, bilo je četverovalentno reasortno cjepivo (eng. *Rhesus reassortant vaccine-tetavalent*, RRV-TV) sastavljeno od oslabljenog majmunskog soja G3P7[5] i tri mono-reasortanta koja su sadržavala 10 RNA segmenata G3P7[5] virusa i jedan VP7 gen humanih G1, G2 i G4 genotipova (213). RRV-TV, licenciran kao RotaShield (Wyeth Lederle Vaccines, Philadelphia, SAD) u SAD-u 1998. godine, pokazao je visoku učinkovitost protiv RVGE bilo koje težine (raspon 49-68%), a pogotovo protiv teškog RVGE (raspon 61-91%) (214,215). U narednih devet mjeseci od odobrenja, gotovo 600 000 djece u SAD-u primilo je RRV-TV u tri oralne doze, prema shemi 2, 4 i 6 mjeseci života (216). Nažalost, postmarketinška istraživanja pokazala su porast broja slučajeva intususcepcije (IS) crijeva, vremenski povezanih s primjenom cjepiva. Najveći rizik bio je 3-14 dana nakon prve doze (>20 puta veći rizik) te nešto manji (oko 5 puta veći rizik) 3-14 dana nakon druge doze (217). Ukupno gledajući, procijenjeni rizik IS nakon jedne doze RRV-TV bio je 1:10 000 doza (218). Nakon revizije originalnih podataka o povezanosti RRV-TV i IS, neki istraživači primijetili su da je rizik za IS ovisan o dobi, odnosno da apsolutni broj slučajeva IS i potencijalni relativni rizik povezan s prvom dozom RRV-TV raste s porastom dobi primjene cjepiva. Primijetili su da dojenčad u dobi  $\geq 90$  dana čini 80% slučajeva IS nakon prve doze cjepiva, a samo 38% svih primatelja prve doze (219,220). Globalni savjetodavni odbor za sigurnost cjepiva (eng. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*, GACVS)

SZO-a u konačnici je uzeo u obzir sve podatke i zaključio da je rizik za IS povezan s RRV-TV visok u dojenčadi cijepljene s RRV-TV (bilo kojom dozom) nakon dobi od 60 dana, no nema dovoljno podataka da bi se moglo zaključiti da je primjena RRV-TV u dobi <60 dana povezana s manjim rizikom (221). U konačnici je nakon nekoliko mjeseci proizvođač povukao cjepivo s tržišta (222), no ostaje pitanje je li to bilo etički opravdano, s obzirom da je u nerazvijenim zemljama smrtnost od RVGE visoka te moguća velika korist možda nadilazi potencijalni rizik od IS (223). Mehanizam IS nije do kraja razjašnjen, no činjenica da je rizik najveći u prvom tjednu nakon prve doze cjepiva upućuje na vjerojatnu povezanost s replikacijom cijepnog soja virusa u crijevima (28), što može dovesti do zadebljanja stijenke crijeva i limfadenopatije te posljedično predispozicije za IS (224).

### **1.9.2.2 Trenutno dostupna cjepiva**

Naglo i neočekivano povlačenje RRV-TV bilo je veliki korak unatrag u globalnim naporima prevencije RVGE. Nadalje, s obzirom da točan mehanizam razvoja IS nije bio poznat, proizvođači su bili primorani provoditi velika i skupa klinička istraživanja koja bi pokazala veću sigurnost cjepiva u odnosu na RRV-TV (28). „Modificirani Jennerov“ pristup (212) nadalje je iskorišten u proizvodnji još jednog reasortnog rotavirusnog cjepiva. Radi se o peterovalentnom, živom oslabljenom oralnom cjepivu (RV5), u kojem je iskorišten bovini WC3 soj (G6P7[5]) kao „genetska osnovica“. Četiri reasortanta imaju VP7 gen za humani G1, G2, G3 ili G4 tip, a jedan reasortant VP4 gen za P[8] (225). Veliko istraživanje faze III kliničkih istraživanja uključilo je gotovo 70 000 djece (iz 11 zemalja, >80% SAD i Finska) dobi 6-12 tjedana koji su primili tri doze RV5 s intervalima 4-10 tjedana. Cjepivo je pokazalo značajnu učinkovitost u prevenciji G1-G4 RVGE bilo koje težine (74%) i teškog G1–G4 RVGE (98%) nakon triju doza u prvoj rotavirusnoj sezoni. Zaštita je, nadalje, perzistirala i u drugoj sezoni – u prevenciji teškog G1-G4 RVGE 88%, a bilo koje težine 63%. Nije detektiran povećani rizik za IS (156). Cjepivo je pod nazivom RotaTaq odobreno 2006. godine u SAD-u, a zatim i u brojnim drugim zemljama (226).

Sljedeći kandidat za globalno cijepljenje protiv RV bilo je monovalentno G1P[8] (RV1) cjepivo koje sadržava 89-12 soj, izoliran 1988.g. u djeteta iz Cincinnatija, SAD te oslabljen serijskim pasažama na staničnim kulturama i preimenovan u RIX4414 (227). U velikoj fazi III kliničkog istraživanja koje je uključivalo više od 60 000 djece u Latinskoj Americi i Finskoj, cjepivo je pokazalo visoku učinkovitost (85%) u prevenciji teškog RVGE (Vesikari ocjena  $\geq 11$ ) u prvoj godini života, a još veću (100%) kod najtežih oblika RVGE (Vesikari ocjena  $\geq 19$ ). Učinkovitost je bila najveća u prevenciji RVGE uzrokovanog homolognim RV sojem G1P[8] (91%), nešto manja kod sojeva sa zajedničkim P[8] (tj. G3P[8], G4P[8], G9P[8]) (87%), a najmanja protiv heterolognog soja G2P[4] (45%). Zamijećena je također visoka učinkovitost u zaštiti od teških oblika AGE bilo koje etiologije koji su zahtijevali hospitalizaciju (42%). Nije zamijećena povezanost s IS (228).

Drugo veliko istraživanje učinkovitosti RV1 provedeno u oko četiri tisuće europske djece u 6 zemalja pokazalo je slične rezultate – učinkovitost cjepiva u prevenciji teških oblika RVGE u dvije rotavirusne sezone nakon primjene dviju doza cjepiva bila je 90% te u prevenciji hospitalizacije zbog RVGE 96%. Zanimljivo, visoka učinkovitost pokazana je i u prevenciji teškog RVGE uzrokovanog ne samo homotipnim G1 (96%), nego i G2 (86%), G3 (94%), G4 (95%), i G9 (85%) u prve dvije rotavirusne sezone (229). Ovo istraživanje također je evaluiralo učinkovitost RV1 u prevenciji RVGE bilo koje težine koje se pokazalo značajnim - 79% nakon dviju doza cjepiva u dvije rotavirusne sezone. Cjepivo je od 2004. godine pod nazivom Rotarix odobreno u Meksiku i Dominikanskoj Republici, od 2006. u Europi, od 2008. godine u SAD-u te brojnim drugim zemljama (230).

Studije učinkovitosti RV1 i RV5 provedene u slabije razvijenim zemljama Azije i Afrike pokazale su nešto nižu učinkovitost cjepiva u prevenciji teških oblika RVGE (40-60%) u odnosu na razvijene zemlje (161,162,231). Pretpostavljeno je da bi više čimbenika moglo biti razlog tomu: interferencija zbog istovremene primjene oralnog cjepiva protiv poliomijelitisa, pothranjenost, učestale crijevne koinfekcije, drukčiji sastav mikrobiote te neutralizacija cijepnih virusa zbog visokih titrova transplacentarno ili dojenjem prenesenih majčinih protutijela



(232). No, imajući u vidu potencijalno veliku javnozdravstvenu korist u slabije razvijenim zemljama, unatoč umjerenj zaštitnosti rotavirusnih cjepiva, SZO je 2009. g. preporučio uvođenje rotavirusnih cjepiva u NIP-ove svih zemalja svijeta (17).

Postmarketinška istraživanja pokazala su slične rezultate kao i klinička istraživanja. Prema rezultatima velike meta-analize, RV1 i RV5 imaju visoku učinkovitost u prevenciji teških oblika RVGE u razvijenim zemljama (89%), značajno smanjujući broj hospitalizacija i posjeta zdravstvenim ustanovama, a učinkovitost u zemljama sa srednjim prihodom je niža (74%) (233). Nema puno postmarketinških istraživanja iz zemalja s niskim prihodima, no čini se da su rezultati sukladni onima iz kliničkih istraživanja (234).

Iako velika klinička istraživanja faze III nisu pokazala povećani rizik od IS nakon primjene RV1 i RV5 (156,228), postmarketinške studije ipak su detektirale veoma malen rizik, prosječno 1 slučaj na 50 000 primijenjenih doza cjepiva, i to prvenstveno u prvih 7 dana nakon primjene prve doze RV1 i RV5, sa zaključkom da korist cjepiva ipak značajno premašuje rizik (235–237). Dvije su postmarketinške studije pokazale da postoji povezanost između dobi primjene prve doze cjepiva i rizika od IS. Prva, u Meksiku, pokazala je da postoji tendencija povećanog rizika ako se prva doza cjepiva primijeni nakon dobi od 14 tjedana (238), dok je studija iz Njemačke dala preciznije brojeve: ni RV1 ni RV5 nisu povezani s povećanim rizikom od IS ako se prva doza cjepiva primijeni prije dobi od 89 dana, dok rizik raste za oba cjepiva ako se prva doza primijeni u intervalu 90-179 dana (RV1 4.6 i RV5 5.8) (239).

Osim direktne koristi za cijepljenog pojedinca, rotavirusna cjepiva pružaju zaštitu i necijepljenim osobama, odnosno postoji jasan „imunitet krda“ (240). Dosad je provedeno samo jedno randomizirano istraživanje koje je usporedilo imunogeničnost RV1 i RV5, a uključilo je gotovo 1500 djece u dobi od 6 tjedana iz Bangladeša. Nakon kompletne serije RV5 i RV1 IgA serokonverzija bila je viša za RV5 nego za RV1 (73% vrs. 64% djece), a trajanje IgA odgovora duže. No, s obzirom da rotavirusna IgA protutijela imaju kratak poluvijek i nije sigurno jesu li jedini pokazatelj zaštite od RVGE, nije se moglo zaključiti znači li viši titar IgA i veću ili dužu zaštitu od RVGE (241).

Godine 2018. SZO je na listu prekvalificiranih cjepiva dodao još dva cjepiva proizvedena u Indiji: Rotavac i Rotasiil (18). Rotavac je monovalentno cjepivo koje sadržava 116E rotavirusni soj, te je prirodno nastao reasortant G9P[11], a sadržava bovini rotavirusni gen za P[11] i 10 humanih rotavirusnih gena. 116E soj poznat je kao uzročnik asimptomatskih rotavirusnih, bolničkih infekcija u novorođenčadi u Delhiju, Indija, te se smatra prirodno oslabljenim sojem (242). Rotavac je pokazao učinkovitost 56% u prevenciji teškog RVGE (Vesikari ocjena  $\geq 11$ ) u prve dvije godine života, a nakon primjene triju peroralnih doza u dobi 6, 10 i 14 tjedana (243). Rotasiil je peterovalentno reasortno cjepivo koje sadržava UK bovini soj u kojem je VP7 gen zamijenjen humanim rotavirusnim genima za G1, G2, G3, G4 i G9. Radi se o termostabilnom cjepivu koje je u kliničkim istraživanjima u Indiji i Nigeru pokazalo učinkovitost 36% i 67% u prevenciji teškog RVGE, nakon primjene triju peroralnih doza cjepiva u dobi 6, 10 i 14 tjedana života (244,245). Zahvaljujući financijskom dogovoru između Vlade Republike Indije, proizvođača cjepiva i nekoliko međunarodnih fondacija koje su se obvezale financirati fazu III kliničkog ispitivanja Rotavaca, osigurano je da Indija i zemlje s najnižim prihodima dobiju cjepivo po povoljnoj cijeni (oko 1 \$ po dozi) (246). U konačnici, i Rotavac i Rotasiil ponuđeni su i Republici Indiji i Globalnom savezu za cjepiva i imunizaciju (eng. *Global Alliance for Vaccines and Immunisation*, GAVI) po najnižim cijenama (<1 \$ po dozi), čime je značajno olakšana dostupnost cjepiva najsiromašnijim zemljama (28).

Postoji još nekoliko nacionalno dostupnih rotavirusnih cjepiva koji nisu prekvalificirani od strane SZO (115). Rotavin-M1 (POLYVAC, Thành phố Hà Nội, Vietnam) je monovalentno cjepivo koje sadržava oslabljeni G1P[8] humani RV i dostupno je u Vijetnamu od 2012. g. (247). Kina je 2000. g. odobrila Lanzhou lamb (Lanzhou Institute of biological product, Kina), monovalentno cjepivo temeljeno na janječem G10P[15] rotavirusnom genotipu (248). Iako su oba cjepiva obećavajuća, nedostaju velike studije učinkovitosti koje bi omogućile njihovu širu upotrebu (249).

### 1.9.2.3 Preporuke za cijepljenje i korist cjepiva

SZO preporuča uvođenje rotavirusnog cjepiva u NIP-ove svih zemalja, pogotovo u zemlje s visokim mortalitetom, poput subsaharske Afrike ili Južne i Jugoistočne Azije (250). U cilju smanjenja rizika od IS, inicijalno je SZO predložio primjenu prve doze cjepiva do 15. tjedna života, a cijele serije do 32. tjedna (17). Godine 2013. SZO je proširio svoje preporuke ističući da bi prvu dozu rotavirusnog cjepiva trebalo primijeniti što ranije nakon navršenih 6 tjedana (zajedno s cjepivom protiv difterije, hripavca i tetanusa, DTP), a cijelu seriju bi trebalo završiti do puna 24 mjeseca (251). Na taj način, unatoč blago povećanom riziku od IS, većem broju djece u najvulnerabilnijim područjima svijeta omogućen je pristup rotavirusnom cjepivu (251). Razmak između dviju peroralnih doza trebao bi biti barem četiri tjedna. RotaTaq, Rotavac i Rotasiil trebali bi se primijeniti u tri doze, a Rotarix u dvije (250). Prethodno navedene dobne restrikcije još uvijek se preporučuju u zemljama s niskim mortalitetom od RVGE, pogotovo vezano za dob prve doze cjepiva. Primjerice, prema smjernicama Europskog društva za pedijatrijsku infektologiju (eng. *European Society for Paediatric Infectious Diseases*, ESPID) prva doza cjepiva trebala bi se primijeniti u dobi 6-12 tjedana (preporučeno 6-8 tjedana, a cijela serija (RV1 dvije doze, RV5 tri doze) trebala bi se dovršiti do navršena 24 tjedna života, a po mogućnosti ranije (252).

Do siječnja 2022. g. ukupno 114 zemalja svijeta uvelo je rotavirusno cjepivo u svoje NIP-ove, a procijenjeno je da 47% dojenčadi na svijetu ima pristup cjepivu. No, i dalje više od 55 milijuna dojenčadi nema dostupno cjepivo, od kojih  $\frac{3}{4}$  živi u samo 10 zemalja (253). Brojne zemlje s niskim prihodima, u kojima je i najveći mortalitet od RVGE, imaju pristup cjepivu zahvaljujući potpori GAVI-ju koji od 2006. g. sufinancira rotavirusna cjepiva za zemlje s niskim prihodima (<1026 \$ prihoda po glavi stanovništva) (254), te je omogućio uvođenje cjepiva u NIP u ukupno 53 zemlje (253). Značaj cijepljenja je golem. Primjerice, gotovo 80% zemalja u afričkoj regiji (prema SZO-u) uvelo je rotavirusno cjepivo u NIP (253). Prema podacima Afričke rotavirusne mreže (eng. *African Rotavirus Network*) u razdoblju između 2006., kad je započeto uvođenje rotavirusnih cjepiva, i 2018. godine, došlo je do 40%-tnog smanjenja

hospitalizacija djece <5 godina zbog AGE (bilo koje etiologije) (255). Sličan efekt rotavirusnog cjepiva zabilježen je ne samo u područjima s visokom smrtnosti, nego i u drugim dijelovima svijeta. Generalno, u zemljama koje su uvele rotavirusno cjepivo u NIP, došlo je do smanjena hospitalizacija zbog RVGE u djece <5 g. za prosječno 59%, hospitalizacija zbog AGE bilo koje etiologije za 36% i smrtnosti od AGE za 36% (30).

#### **1.9.2.4 Utjecaj rotavirusnog cjepiva na distribuciju genotipova**

U nekim je zemljama nakon uvođenja RV1 u NIP zamijećen porast udjela G2P[4] genotipa, što je dovelo do razmišljanja o mogućem utjecaju cjepiva na zamjenu genotipova (256). Primjerice, u Belgiji je nakon uvođenja RV1 2006. g. i RV5 2007. g. zabilježen nagli porast udjela G2P[4] na 30-40% u narednim godinama (92). No, prevalencija G2P[4] ponovno je naglo pala tijekom 2013./2014. – 2015./2016., porasla 2016./2017. i ponovno pala 2017./2018. (257). Slične fluktuacije zabilježene su i u Ujedinjenom Kraljevstvu gdje je nakon uvođenja RV1 u NIP 2013. g. porastao udio G2P[4] do 75% u sezoni 2016./2017. g. Međutim, 2017./2018., G2P[4] prevalencija pala je na 14.9% testiranih uzoraka, a G3P[8] i G9P[4] postali su češći (257). U Finskoj, gdje je RV5 dio NIP-a od 2009. g., također je zabilježen porast G2P[4] od 2012./2013. g., paralelno s porastom G12P[8] genotipova. No, i u nekim zemljama gdje rotavirusno cjepivo nije dio NIP-a, intermitentno je zamijećen porast prevalencije G2P[4] (256,257), kao i fluktuacije drugih genotipova, koje su često nepredvidive i različite između različitih zemalja (56,256). Generalno, trenutno nema dokaza da zbog potencijalnog selektivnog pritiska rotavirusnih cjepiva dolazi do zamjene genotipova u postvakcinalnom razdoblju. Distribucija genotipova mijenja se u vremenu neovisno o implementaciji cjepiva vjerojatno kao posljedica prirodnih fluktuacija zbog stalne evolucije RV (preslagivanje genoma, točkaste mutacije, međuvrski prijenos) (56,256). Pet G/P kombinacija (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8]) ostaju najčešći genotipovi i u postvakcinalnom razdoblju, no potreban je daljnji kontinuirani nadzor (256).

## **2. HIPOTEZA**

Postoji razlika u geografskoj, sezonskoj i dobnoj distribuciji te u težini kliničke slike između pojedinih rotavirusnih genotipova u djece mlađe od 5 godina u Republici Hrvatskoj.

### **3. CILJEVI RADA**

#### **3.1 Opći cilj:**

Uvid u epidemiologiju rotavirusnih genotipova koji uzrokuju AGE u djece mlađe od 5 godina u trima regijama u Republici Hrvatskoj.

#### **3.2 Specifični ciljevi:**

1. Procjena molekularne epidemiologije (genotipova) rotavirusa u trima regijama u Republici Hrvatskoj.
2. Analiza mogućih geografskih, dobnih i sezonskih razlika u distribuciji rotavirusnih genotipova, kao i razlika u težini kliničke slike između pojedinih genotipova.
3. Analiza mogućih razlika u rotavirusnim genotipovima između nozokomijalnih i domicilnih infekcija.
4. Procjena težine kliničke slike RVGE pomoću Vesikarijeve i Clarkove ocjenske ljestvice za stupnjevanje težine bolesti.

## 4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1 Ispitanici

U istraživanje su uključena djeca mlađa od 5 godina liječena zbog AGE u tri hrvatske bolnice (Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, Klinički bolnički centar Split i Opća bolnica Čakovec). Ove su bolnice smještene u tri različite regije RH (Sjeverna, Središnja i Južna Hrvatska) kojima gravitira populacija od 1.69 milijuna stanovnika (37.8% populacije u RH), od kojih 87,500 čine djeca mlađa od 5 godina. Također, ove regije pripadaju dvjema različitim klimatskim područjima prema Köppen-ovoj klasifikaciji (Cfb (Zagreb, Čakovec) i Csa (Split)). Istraživanje je provedeno u dvije uzastopne rotavirusne sezone u trajanju od 2 godine (srpanj 2012. g. – srpanj 2014. g.).

Istraživanje su odobrila Etička povjerenstva svih ustanova kao i Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije uključivanja u istraživanje roditelj ili skrbnik djeteta bio je upoznat sa ciljem istraživanja i predviđenim postupcima te je potpisao informirani pristanak.

Kriteriji za uključivanje u istraživanje bili su: dijagnoza AGE [proljevanje definirano kao  $\geq 3$  mekše stolice na dan, s ili bez povraćanja ( $\geq 1$  epizoda nasilnog pražnjenja djelomično probavljenog sadržaja želuca  $\geq 1$ h nakon hranjenja)] u djece mlađe od 5 godina, hospitalizirane ili liječene putem Dnevne bolnice ili hitne službe navedenih bolnica. U studiju su također uključena djeca navedene dobne skupine s NRV AGE koji je definiran kao RVGE s početkom simptoma  $\geq 48$  sati od prijema u bolnicu ili  $\leq 72$  sata od otpusta iz bolnice.

Kriteriji za isključivanje iz studije bili su: djeca starija od 5 godina, djeca smještena u domovima za djecu, djeca s kroničnim proljevom ili upalnom bolesti crijeva te djeca s imunodeficijencijom.

## **4.2 Laboratorijska dijagnoza rotavirusnog gastroenteritisa i genotipizacija**

Svim ispitanicima uključenima u istraživanje učinjena je analiza stolice na RV i Adenovirus, za što je korišten komercijalni imunokromatografski test Rota-AdenoGnost test® (BioGnost, Hannover, Njemačka). Svi RV pozitivni uzorci sačuvani su na -20°C u područnim mikrobiološkim laboratorijima (Županijska bolnica Čakovec, Klinički bolnički centar Split) do vremena predviđenog za genotipizaciju. Daljnja molekularna dijagnostika učinjena je u Mikrobiološkom laboratoriju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Virusna RNA izolirana je koristeći QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. RT-PCR na VP7 i VP4 gene učinjen je koristeći Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Njemačka) s početnicama VP7-F i VP7-R (195) te VP4-F i VP4-R (258) na uređaju „Veriti thermal cycler“ (Applied Biosystems, SAD). PCR tipiziranje (identifikacija G ili P tipova) provedeno je prema protokolu iz “European Rotavirus Detection and Typing Methods” (dostupno na EuroRotaNet web stranici <http://www.eurorota.net>). RV pozitivni uzorci kojima se G i/ili P tip nije mogao odrediti pomoću PCR-a poslani su dalje na DNA sekvenciranje koristeći početnice VP7-F, VP7-R, VP4-F i VP4-R. PCR amplikoni pročišćeni su koristeći „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Njemačka). Sekvenciranje je učinjeno u „MacroGen Europe“ (Amsterdam, Nizozemska). Genotipovi su određeni koristeći internetski dostupan „RotaC v1.1 genotyping tool“ (<http://rotac.regatools.be>).

## **4.3 Težina kliničke slike**

Prikupljeni su demografski podaci o ispitanicima (datum rođenja, spol, mjesto stanovanja), datum oboljenja, kao i važni anamnestički podaci o karakteristikama kliničke slike nužni za izračunavanje težine kliničke slike pomoću Vesikarijeve i Clarkove ocjenske ljestvice.



Podaci potrebni za izračunavanje ocjene prema Vesikarijevoj ljestvici su: broj proljeva u 24h, trajanje proljeva (dani), broj povraćanja u 24h, trajanje povraćanja (dani), rektalna temperatura (°C), stupanj dehidracije i način liječenja (Tablica 1) (151).

**Tablica 1.** Vesikarijeva ocjenska ljestvica

Broj bodova	1	2	3
<b>SIMPTOMI</b>			
Broj stolica/dan	1-3	4-5	≥ 6
Trajanje proljeva (dani)	1-4	5	≥ 6
Broj povraćanja/dan	1	2-4	≥ 5
Trajanje povraćanja (dani)	1	2	≥ 3
Tjelesna temperatura (rektalna, °C)	37.1-38.4	38.5-38.9	≥ 39
Dehidracija		1-5%	≥6%
Liječenje	Rehidracija	Hospitalizacija	-

Podaci potrebni za izračunavanje ocjene prema Clarkovoj ljestvici su: broj proljeva u 24h, trajanje proljeva (dani), broj povraćanja u 24h, trajanje povraćanja (dani), rektalna temperatura (°C), trajanje povišene tjelesne temperature (dani), ponašanje ispitanika i trajanje promijenjenog ponašanja (dani) (Tablica 2) (152).

**Tablica 2.** Clarkova ocjenska ljestvica

Broj bodova	1	2	3
<b>SIMPTOMI:</b>			
Broj stolica/dan	2-4	5-7	≥ 8
Trajanje proljeva (dani)	1-4	5-7	≥ 8
Broj povraćanja/dan	1-3	4-6	≥ 7
Trajanje povraćanja (dani)	2	3-5	≥ 6
Tjelesna temperatura (rektalna, °C)	38.1-38.2	38.3-38.7	≥ 38.8
Trajanje povišene tjelesne temperature (dani)	1-2	3-4	≥ 5
Ponašanje	Iritabilnost	Letargičnost	Konvulzije
Trajanje promijenjenog ponašanja (dani)	1-2	3-4	≥ 5

Prikupljeni demografski podaci, podaci o vremenu oboljenja i anamnestički podaci za izračunavanje Vesikarijeve i Clarkove ocjene uneseni su u bazu podataka kreiranu u Microsoft Access® programu, licenciran Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, zajedno s podacima o genotipovima RV.

#### **4.4 Statistička analiza**

Prikupljeni podaci sažeti su metodama deskriptivne statistike i prikazani grafički i numerički.

Karakteristike ispitanika i opažene grube prevalencije prikazane su prema centru (regiji), dobi i spolu. Namjeravana stratifikacija po dobi (≤12 mjeseci, 12-36 mjeseci i >36 do 60 mjeseci) promijenjena je u ≤12 i >12 mjeseci, s obzirom da je samo 9.7% ispitanika u kojih je PCR učinjen i samo 8.7% ispitanika u kojih

je PCR-om potvrđena rotavirusna infekcija bilo starije od 36 mjeseci.

Vjerojatnost PCR potvrde rotavirusne infekcije analizirana je modificiranom Poissonovom regresijom (259) s fiksnim efektima: centar, dobna skupina, spol. Podešene prevalencije dobivene su inverznom link-funkcijom. Razlike su izražene kao (podešeni) omjeri prevalencija (PR, *prevalence ratio*).

Vjerojatnost svakog genotipa analizirana je u zasebnom generaliziranom linearnom modelu s fiksnim efektima centar, dob, spol (binomijalna distribucija, logit link). Podešene prevalencije dobivene su inverznom link funkcijom. Razlika između dvije prevalencije bila je apsolutna razlika nezavisnih proporcija određena metodom po Newcombu (260).

Personov koeficijent korelacije korišten je za određivanje odnosa ocjena težine bolesti na Vesikarijevoj i Clarkovoj ocjenskoj ljestvici. Za analizu podudarnosti između numeričkih vrijednosti ocjena na dvije ljestvice korištena je Bland-Altman metoda.

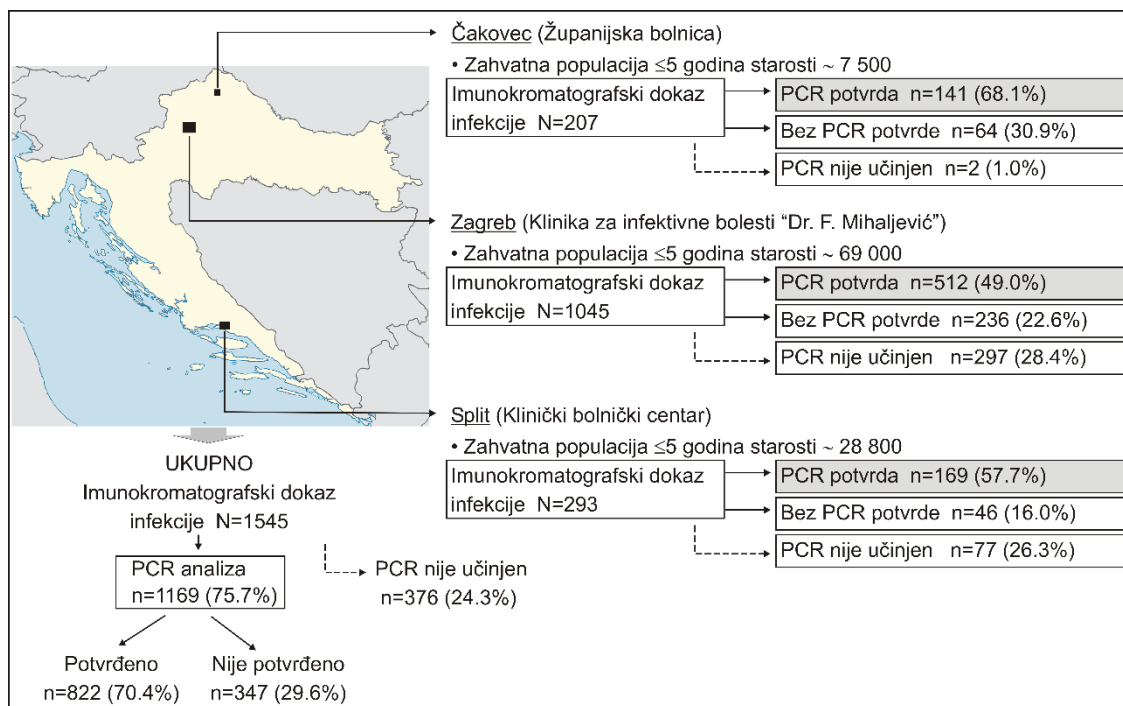
Cohenov  $\kappa$  koeficijent određen je za procjenu korelacije između „reklasificirane“ Clarkove i Vesikarijeve ljestvice.  $\kappa$  u rasponu 0.61-0.80 smatrao se „znatnom podudarnošću“.

Za analizu povezanosti pojedinih genotipova i ocjena težine simptoma korišteni su generalizirani mješoviti (hijerarhijski) modeli, po jedan za svaki genotip, uz dodatne fiksne efekte dob i je li infekcija hospitalna ili domicilna. Centar i genotip\*centar interakcija bili su nasumični efekti. Sve prikazane granice pouzdanosti i P-vrijednosti podešene su za broj testova (simulacijska *stepdown* metoda po Shafferu). P-vrijednost  $<0.05$  smatrana je statistički značajnom. Korišten je računalni program SAS za Windows 9.4 (SAS Inc., Cary, NY), licenciran Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

## 5. REZULTATI

### 5.1 Opći pregled studije i glavni epidemiološki nalazi

Ukupno je u studiju uključeno 1545 djece s imunokromatografski (ICT) potvrđenom rotavirusnom infekcijom, a pojedini centri doprinijeli su ukupnom broju približno razmjerno njihovoj zahvatnoj populaciji (slika 1). Uslijed tehničkih razloga genotipizacija nije provedena u 376 (24.3% slučajeva) (slika 1). Od ukupno 1169 uzoraka stolice koji su podvrgnuti RT-PCR analizi, rotavirusna infekcija potvrđena je u 822 uzorka (70.4%) (slika 1).



**Slika 1.** Shematski prikaz glavnih karakteristika studija: geografske lokacije uključenih centara, broj uključene djece, te broj djece s uzorcima u kojima je rotavirusna infekcija potvrđena imunokromatografski odnosno RT-PCR metodom. Zahvatna populacija u dobi do (uključno) 5 godina starosti procijenjena je na temelju Popisa stanovništva iz 2011.g. (dostupno na: <https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/census2011/results/censustabsxls.htm> , pristup 15.rujna 2018.

Udio djece čiji su uzorci stolice podvrgnuti PCR analizi i u kojih je potvrđena rotavirusna infekcija numerički je bio nešto viši u Splitu nego u druga dva centra (tablica 3). Također, numerički je bio nešto viši u djece u dobi do 12 mjeseci (uključno) nego u djece u dobi >12 mjeseci (tablica 3). Istodobno, djeca uključena u Splitu bila su znatno mlađa u djece u druga dva centra (71.8% mlađe u dobi do 12 mjeseci nasuprot oko 21% u Zagrebu i Čakovcu) (tablica 3).

**Tablica 3.** Svojstva uključene djece. Podaci su brojevi (%) ili medijani (raspon).

	Sva djeca	Prema centru			Prema dobi (mjeseci)		Prema spolu	
		Zagreb	Split	Čakovec	≤12	>12	Dječaci	Djevojčice
ICT (+), učinjen PCR	1169	748	216	205	417	752	653	516
Dob (mjeseci)	14.4 (0.03-60)	17.5 (0.13-60)	4.40 (0.03-58)	13.2 (0.30-56)	---	---	13.4 (0.03-60)	15.2 (0.26-58)
Dob 0-12 mjeseci	417 (35.7)	209 (27.9)	155 (71.8)	53 (25.8)	---	---	254 (38.9)	163 (31.6)
Dob >12 mjeseci	752 (64.3)	539 (72.1)	61 (28.2)	152 (74.2)	---	---	399 (61.1)	353 (68.4)
Dječaci	653 (55.9)	403 (53.9)	142 (65.7)	108 (52.7)	254 (60.9)	399 (53.1)	---	---
Potvrđeno PCR-om	822 (70.4)	512 (68.4)	169 (78.2)	141 (68.8)	315 (75.5)	507 (67.4)	452 (69.2)	370 (71.7)

ICT (+) – imunokromatografski pozitivno; PCR – lančana reakcija polimerazom

Da bismo ocijenili radi li se doista o geografsko-specifičnim i/ili dobno-specifičnim razlikama u pogledu PCR potvrde rotavirusne infekcije, određene su podešene (za dob, spol i lokaciju) prevalencije udjela PCR-pozitivnih nalaza, te njihovi omjeri (podešeni omjeri prevalencija) (tablica 4): razlike između centara (u odnosu na Zagreb, kao referentan) i razlike između dvije dobne skupine bile su zanemarivo male (relativno  $\pm 8-10\%$ ).

**Tablica 4.** Podešene prevalencije PCR-om potvrđenih rotavirusnih infekcija prema centru, dobnoj skupini i spolu. Razlike su izražene kao (podešeni) omjeri prevalencija (PR, *prevalence ratio*).

	Prevalencija (%) (95%CI)	PR (95% CI)	P
<b>Centar</b>			
Zagreb	69.9 (66.4-73.5)	1.00 (referentno)	---
Split	77.3 (71.7-83.3)	1.11 (1.01-1.22)	0.039
Čakovec	70.3 (64.1-77.1)	0.99 (0.90-1.10)	0.909
<b>Dob</b>			
$\leq 12$ mjeseci	75.6 (71.4-80.2)	1.00 (referentno)	---
$> 12$ mjeseci	69.3 (65.3-73.4)	0.92 (0.84-0.99)	0.036
<b>Spol</b>			
djevojčice	74.2 (70.1-78.6)	1.00 (referentno)	--
dječaci	70.6 (66.9-74.5)	0.95 (0.88-1.02)	0.194

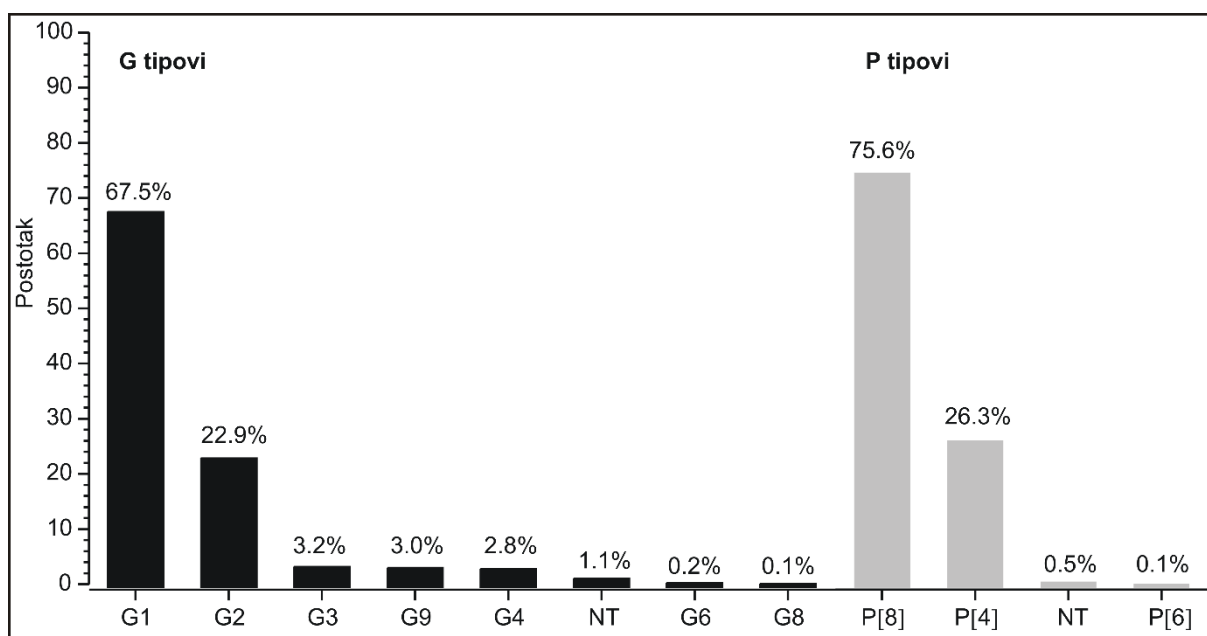
PCR – lančana reakcija polimerazom

Vjerojatnost PCR potvrde rotavirusne infekcije analizirana je modificiranom Poissonovom regresijom s fiksnim efektima: centar, dobna skupina, spol.

Podešene prevalencije dobivene su inverznom link-funkcijom  $\{\exp[\ln(\pi)]\}$ .

Dakle, lokacija (centar) ili dob nisu bili čimbenici koji bi relevantno utjecali na vjerojatnost da se u uzorku koji je procesuiran RT-PCR metodom formalno potvrdi rotavirusna infekcija.

Među 822 djece s PCR-om potvrđenom infekcijom, G1 je bio daleko najzastupljeniji G-tip (67.5%), a tri je puta bila manja prevalencija G2 tipa (22.9%). G3, G9 i G4 detektirani su sporadično (~3%). Potvrđena su samo tri slučaja „neobičajenih“ G-tipova G6 i G8. Ukupno je bilo 9 (1.1%) uzoraka u kojim se G-tip nije mogao tipizirati. Među P-tipovima P[8] je bio najčešći (75.6%), a slijedi ga P[4] s približno tri puta manjom prevalencijom (26.3%). Potvrđen je jedan „neobičajeni“ P[6] tip. U četiri uzorka (0.5%) P tip nije se mogao odrediti (slika 2).



**Slika 2.** Sveukupna opažena prevalencija pojedinih G i P tipova u 822 djece s rotavirusnim gastroenteritisom potvrđenim PCR-om.

NT – ne može se tipizirati



Opažen je čitav niz različitih G/P kombinacija (tablica 5). Sveukupno, najčešća genotipska kombinacija bio je G1P[8] (61.9%) te je zajedno s drugim najčešćim G2P[4] genotipom (19.5%) činio 81.4% svih genotipova. Drugi genotipovi detektirani su u <5% uzoraka. G9P[8], jedan od globalno najčešćih genotipova, potvrđen je u samo 2.3% uzorka.

„Miješane infekcije“ s različitim G ili P-tipovima potvrđene su u 1.62% slučajeva. G ili P-netipabilni uzorci činili su 1.62% uzoraka.

Numerički, uočena je određena razlika prevalencija dva najčešća genotipa (G1P[8], G2P[4]) između regija (tablica 5) s blagim razlikama također između dobnih skupina i između dječaka i djevojčica (tablica 5).

Genotip G1P[8] bio je najčešći u svakom od centara (Zagreb 57.2%, Split 63.9%, Čakovec 76.6%). Drugi najčešći genotip u Zagrebu i Splitu bio je G2P[4] (25.2% i 16%), dok je u Čakovcu drugi najčešći bio humano-humani reasortant G1P[4] (čak 11.3% uzoraka).

Zanimljivo je da u Čakovcu nije detektiran niti jedan G9 tip. Genotip G3P[8] činio je čak 10.1% svih uzoraka u Splitu, a relativno je slabo bio zastupljen u drugim centrima (Zagreb 1.2% i Čakovec 0.7%) (tablica 5).

**Tablica 5.** Svojstva i identificirani rotavirusni genotipovi u djece u kojima je infekcija potvrđena PCR-om. Podaci su brojevi (%) ili medijan (raspon).

	Sva djeca	Prema centru			Prema dobi (mjeseci)		Prema spolu	
		Zagreb	Split	Čakovec	≤12	>12	Dječaci	Djevojčice
N	822	512	169	141	315	507	452	370
Dob (mjeseci)	13.5 (0.03-60)	17.6 (0.13-60)	4.00 (0.03-54)	13.2 (0.30-56)	---	---	13.2 (0.03-60)	14.8 (0.26-57)
Dob 0-12 mjeseci	315 (38.3)	143 (27.9)	131 (77.5)	41 (29.1)	---	---	185 (40.9)	130 (35.1)
Dob >12 mjeseci	507 (61.7)	369 (72.1)	38 (22.5)	100 (70.9)	---	---	267 (59.1)	240 (64.9)
Dječaci	452 (55.0)	270 (52.7)	112 (66.3)	70 (49.7)	185 (58.7)	267 (52.7)	---	---
G1P[8]	509 (61.9)	293 (57.2)	108 (63.9)	108 (76.6)	213 (67.6)	296 (64.7)	291 (64.4)	218 (58.9)
G2P[4]	160 (19.5)	129 (25.2)	27 (16.0)	4 (2.8)	49 (15.6)	111 (21.9)	78 (17.3)	82 (22.2)
G1P[4]	32 (3.9)	13 (2.5)	3 (1.8)	16 (11.3)	8 (2.5)	24 (4.7)	18 (4.0)	14 (3.8)
G3P[8]	24 (2.9)	6 (1.2)	17 (10.1)	1 (0.7)	14 (4.4)	10 (2.0)	14 (3.1)	10 (2.7)
G2P[8]	22 (2.7)	22 (4.3)	0	0	5 (1.6)	17 (3.3)	12 (2.6)	10 (2.7)
G9P[8]	19 (2.3)	14 (2.7)	5 (2.9)	0	6 (1.9)	13 (2.6)	10 (2.2)	9 (2.4)
G4P[8]	18 (2.2)	13 (2.5)	4 (2.4)	1 (0.7)	5 (1.6)	13 (2.6)	12 (2.6)	6 (1.6)
GNT P[8]	8 (1.0)	1 (0.2)	1 (0.6)	6 (4.3)	4 (1.3)	4 (0.8)	3 (0.7)	5 (1.3)
G9P[4]	5 (0.6)	5 (1.0)	0	0	2 (0.6)	3 (0.6)	4 (0.9)	1 (0.3)
G4P[4]	4 (0.5)	4 (0.8)	0	0	1 (0.3)	3 (0.6)	1 (0.2)	3 (0.8)
G1P[4]+P[8]	4 (0.5)	1 (0.2)	0	3 (2.1)	0	4 (0.8)	1 (0.2)	3 (0.8)
G1P[NT]	3 (0.4)	2 (0.4)	0	1 (0.7)	2 (0.6)	1 (0.2)	2 (0.4)	1 (0.3)
G1+G2P[4]+P[8]	3 (0.4)	3 (0.6)	0	0	0	3 (0.6)	0	3 (0.8)
G1+G2P[4]	1 (0.12)	1 (0.2)	0	0	1 (0.3)	0	0	1 (0.3)
G1+G3P[4]+P[8]	1 (0.12)	0	1 (0.6)	0	1 (0.3)	0	1 (0.2)	0
G1+G3P[8]	1 (0.12)	0	1 (0.6)	0	1 (0.3)	0	1 (0.2)	0
G1+G9P[8]	1 (0.12)	0	1 (0.6)	0	1 (0.3)	0	0	1 (0.3)
G2P[NT]	1 (0.12)	1 (0.2)	0	0	1 (0.3)	0	1 (0.2)	0
G2P[4]+P[8]	1 (0.12)	1 (0.2)	0	0	0	1 (0.2)	0	1 (0.3)
G4P[6]	1 (0.12)	1 (0.2)	0	0	0	1 (0.2)	1 (0.2)	0
G6P[4]	1 (0.12)	1 (0.2)	0	0	0	1 (0.2)	0	1 (0.3)
G6P[4]+P[8]	1 (0.12)	0	1 (0.6)	0	0	1 (0.2)	1 (0.2)	0
G8P[8]	1 (0.12)	1 (0.2)	0	0	0	1 (0.2)	0	1 (0.3)
GNT P[4]	1 (0.12)	0	0	1 (0.7)	1 (0.3)	0	0	1 (0.3)

Da bismo procijenili radili se doista o regionalnim razlikama u prevalenciji određenih genotipova, određene su podešene (za dob i spol) prevalencije po centru te apsolutne razlike među njima (tablica 6).

**Tablica 6.** Prevalencije (%) (95%CI) pojedinih genotipova po centrima, podešene za dob i spol. Prikazani su samo genotipovi s opaženom prevalencijom  $\geq 1\%$  u bilo kojem centru. **Pojačano** su otisnute vrijednosti koje numerički odudaraju u nekom centru u odnosu na Zagreb kao „referentni centar“. U koloni „Razlika“ prikazana je apsolutna razlika između **pojačano otisnute** prevalencije i referentne vrijednosti (vrijednosti za Zagreb).

Genotip	Zagreb	Split	Čakovec	Razlika (95%CI)
G1P[8]	59.5 (54.8-64.1)	60.3 (52.2-67.9)	<b>78.4 (70.9-84.4)</b>	18.9 (10.1, 26.5)
G2P[4]	23.6 (19.7-27.9)	17.9 (12.5-25.1)	<b>2.6 (0.9-6.7)</b>	-21.0 (-25.6, -15.3)
G1P[4]	2.2 (1.2-4.1)	1.9 (0.6-5.9)	<b>10.2 (6.0-16.9)</b>	8.0 (3.4, 14.8)
G3P[8]	1.1 (0.5-2.5)	<b>11.0 (6.5-17.8)</b>	0.7 (0.1-4.6)	9.9 (5.2, 16.7)
G2P[8]	4.0 (2.5-6.4)	0	0	---
G9P[8]	2.4 (1.2-4.4)	3.4 (1.4-8.1)	0	---
G4P[8]	2.0 (1.0-4.0)	2.4 (0.9-6.6)	0.6 (0.1-4.1)	---
GNT P[8]	0.2 (0.0-1.5)	0.5 (0.0-3.8)	<b>4.4 (1.9-9.9)</b>	4.2 (1.4, 9.7)
G9P[4]	0.8 (0.3-2.6)	0	0	---
G1P[4]+P[8]	0.2 (0.0-1.3)	0	1.8 (0.5-6.3)	---

NT – ne može se tipizirati

Vjerojatnost svakog genotipa analizirana je u zasebnom generaliziranom linearnom modelu s fiksnim efektima centar, dob, spol (binomijalna distribucija, logit link).

Podešene prevalencije dobivene su inverznom link funkcijom  $\left[ P = \frac{1}{1 + \exp(-\beta)} \right]$ . Razlika između dvije prevalencije je apsolutna razlika nezavisnih proporcija određena metodom po Newcombu (260).

Uz podešenje za dob i spol, prevalencija G1P[8] bila je približno 20% (apsolutno) viša, a prevalencija G2P[4] približno 20% (apsolutno) niža u Čakovcu nego u Zagrebu ili Splitu (tablica 6). Nadalje, prevalencija G1P[4] bila je 8% viša u Čakovcu, a G3P[8] 10% viša u Splitu u odnosu na referentni centar. I u konačnici, prevalencija G-netipabilni P[8] bila je oko 4% viša u Čakovcu nego u Zagrebu ili Splitu.

U tablici 5 naznačene su i manje razlike u zastupljenosti pojedinih genotipova u djece do 12 mjeseci (uključno) starosti i starije djece. U istim modelima koji su sažeti u tablici 6, istodobno je procijenjena (podešena za centar i spol) i prevalencija navedenih genotipova u djece do 12 mjeseci i starijih – podešene prevalencije bile su vrlo slične onima u tablici 5, tj. numerički sasvim slične između dvije dobne skupine, bez naznaka neke relevantnije razlike.

Što se tiče zastupljenosti pojedinih genotipova u dokazanim rotavirusnim infekcijama koje su domicilne ili bolničke, treba napomenuti da su podaci u tom smislu dijelom nepotpuni. Od ukupnog broja djece (822): u 612 (74.5%) se radilo o domicilnoj infekciji, u 130 (15.8%) o bolničkoj, a za 80 djece (9.7%) taj podatak nije poznat. U Zagrebu, od 512 djece, 460 (89.8%) je imalo domicilnu infekciju, a 52 (10.2%) bolničku. U Splitu, od 169 djece, 90 (53.2%) je imalo domicilnu infekciju, 74 (43.8%) bolničku, dok za 5 djece (3.0%) podatak nije poznat. U Čakovcu, od 141 djeteta, 62 (44.0%) je imalo domicilnu infekciju, 4 (2.8%) hospitalnu infekciju a podatak nije poznat za 75 (53.2%) djece. Stoga ti podaci nisu posebno analizirani, već je zastupljenost pojedinih genotipova samo sažeta po „tipu“ infekcije za sveukupni broj djece (tablica 7). Zastupljenost G1P[8] genotipa čini se veća među bolničkim nego domicilnim infekcijama, no kako za čak 61 dijete zapravo nije poznato o kojem tipu infekcije se radi – nemoguće je išta zaključivati. S druge strane, G2P[4] je češći među domicilnim (22.9%) nego bolničkim infekcijama (13.9%), pri čemu za samo dva djeteta u kojih je identificiran taj genotip nije poznat tip infekcije: tu je izvjesnije da je doista ovaj genotip bio zastupljeniji među domicilnim infekcijama. Za sve druge genotipove, broj slučajeva je vrlo malen i/ili za znatan udio

nedostaju podaci o tipu infekcije – stoga bi bilo besmisleno išta zaključivati o eventualnoj razlici između domicilnih i bolničkih infekcija (tablica 7).

**Tablica 7.** Podioba genotipova prema tipu infekcije.

Genotip	Domicilne infekcije	Bolničke infekcije	Nije poznato
N	612	130	80
G1P[8]	355 (58.0)	93 (71.5)	61 (76.3)
G2P[4]	140 (22.9)	18 (13.9)	2 (2.5)
G1P[4]	19 (3.1)	5 (3.9)	8 (10.0)
G3P[8]	19 (3.1)	5 (3.9)	0
G2P[8]	20 (3.3)	2 (1.5)	0
G9P[8]	18 (2.9)	1 (0.8)	0
G4P[8]	16 (2.6)	1 (0.8)	1 (1.2)
GNT P[8]	2 (0.3)	1 (0.8)	5 (6.2)
G9P[4]	4 (0.7)	1 (0.8)	0
G1P[4]+P[8]	1 (0.2)	0	3 (3.8)

## 5.2 Podioba dokazanih rotavirusnih infekcija prema dijelu godine i centru

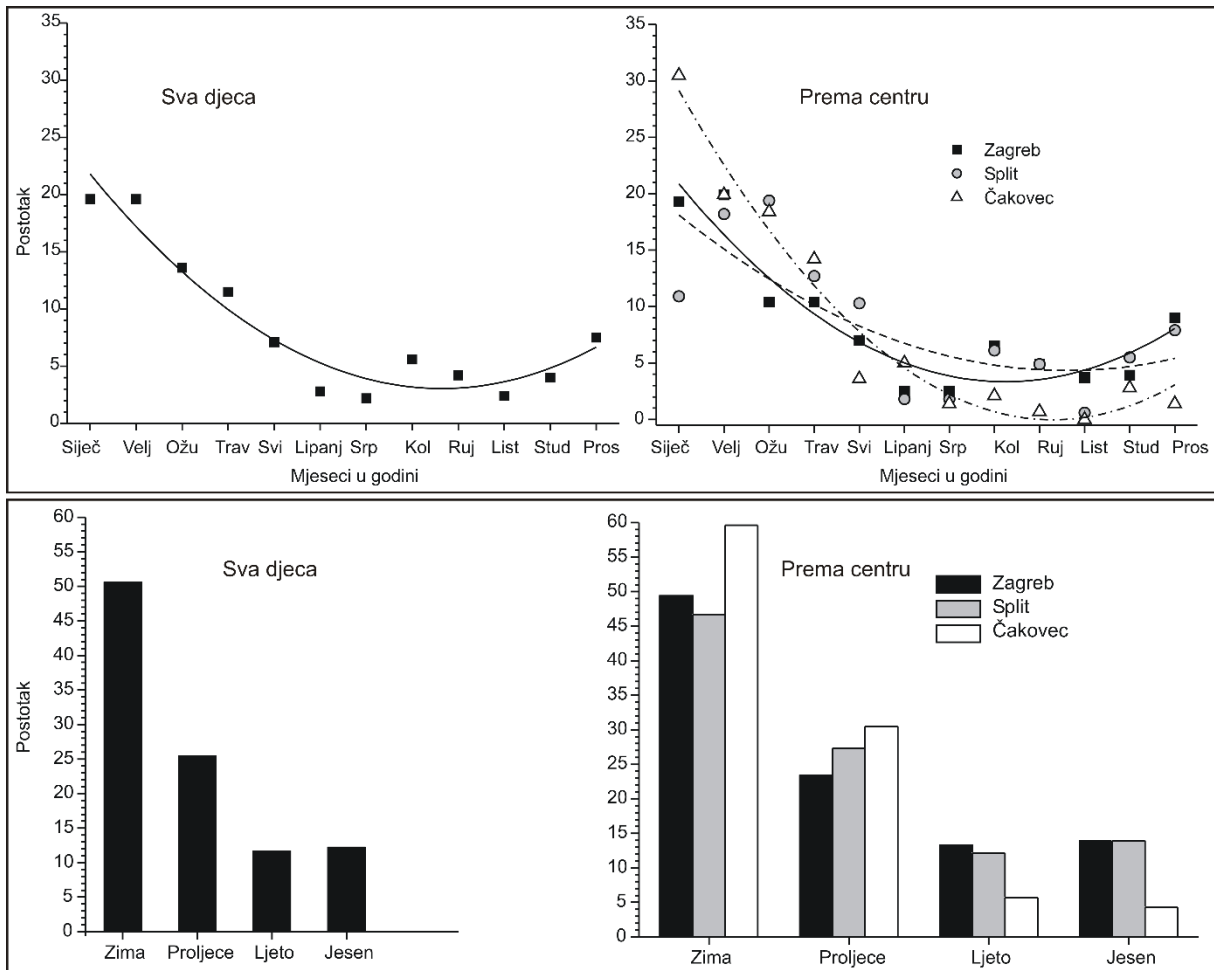
Studija je provedena od 07.07.2012.g., kada je „ubilježeno“ prvo dijete s rotavirusnom infekcijom dokazanom PCR metodom, do 07.07.2014.g, kada je „ubilježeno“ zadnje od 822 djece s dokazanom rotavirusnom infekcijom. Stoga moguću varijabilnost broja oboljelih po kalendarskim godinama (2012.-2014.) nije moguće pratiti, budući je samo 2013. popraćena u cijelosti, a „sezonsvo“ se odnosi na dijelove jedne kalendarske godine za koju su zapravo prikazani kumulativni podaci. Za mjesec srpanj (s obzirom na „preklapanje“ datuma 2012.g. i 2014.g.) postoje podaci za tri godine (2012.-2014.), a za sve ostale mjesece – za dvije godine. U tablici 8 sažeti su podaci o broju dokazanih rotavirusnih infekcija ukupno i po centru, po mjesecima u godini i zatim po godišnjim dobima. Broj djece ovdje je prikazan neovisno o genotipu rotavirusa. Prikazane su i druge epidemiološke karakteristike infekcija.

**Tablica 8.** Raspodjela djece s PCR-dokazanom rotavirusnom infekcijom prema dijelu godine.

	Sva djeca	Prema centru		
		Zagreb	Split	Čakovec
N	822	512	169	141
Dob (mjeseci)	13.5 (0.03-60)	17.6 (0.13-60)	4.00 (0.03-54)	13.2 (0.30-56)
Dob 0-12 mjeseci	315 (38.3)	143 (27.9)	131 (77.5)	41 (29.1)
Dob >12 mjeseci	507 (61.7)	369 (72.1)	38 (22.5)	100 (70.9)
Dječaci	452 (55.0)	270 (52.7)	112 (66.3)	70 (49.7)
Porijeklo infekcije				
Domicilne	612 (74.5)	460 (89.8)	90 (53.2)	62 (44.0)
Bolničke	130 (15.8)	52 (10.2)	74 (43.8)	4 (2.8)
Nepoznato	80 (9.7)	0	5 (3.0)	75 (53.2)
Crijevna ko-infekcija				
Ne	799 (97.2)	508 (99.2)	156 (92.3)	135 (95.7)
Adenovirusna	14 (1.7)	0	9 (5.3)	5 (3.6)
Bakterijska	8 (0.97)	4 (0.8)	3 (1.8)	1 (0.7)
Adenovirusna i bakterijska	1 (0.12)	0	1 (0.6)	0
Mjeseci u godini/godišnje doba				
Siječanj	160 (19.6)	99 (19.3)	18 (10.9)	43 (30.5)
Veljača	160 (19.6)	102 (19.9)	30 (18.2)	28 (19.9)
Ožujak	111 (13.6)	53 (10.4)	32 (19.4)	26 (18.4)
Travanj	94 (11.5)	53 (10.4)	21 (12.7)	20 (14.2)
Svibanj	58 (7.1)	36 (7.0)	17 (10.3)	5 (3.6)
Lipanj	23 (2.8)	13 (2.5)	3 (1.8)	7 (5.0)
Srpanj	18 (2.2)	13 (2.5)	3 (1.8)	2 (1.4)
Kolovoz	46 (5.6)	33 (6.5)	10 (6.1)	3 (2.1)
Rujan	34 (4.2)	25 (4.9)	8 (4.9)	1 (0.7)
Listopad	20 (2.4)	19 (3.7)	1 (0.6)	0
Studeni	33 (4.0)	20 (3.9)	9 (5.5)	4 (2.8)
Prosinac	61 (7.5)	46 (9.0)	13 (7.9)	2 (1.4)
Zima (21.12-20.03)	414 (50.6)	253 (49.4)	77 (46.7)	84 (59.6)
Proljeće (21.03-20.06)	208 (25.4)	120 (23.4)	45 (27.3)	43 (30.5)
Ljeto (21.06-22.09)	96 (11.7)	68 (13.3)	20 (12.1)	8 (5.7)
Jesen (23.09-21.12)	100 (12.2)	71 (13.9)	23 (13.9)	6 (4.3)

Sveukupno, dokazane rotavirusne infekcije bile su predominantno domicilne (74.5%), posebno u Zagrebu (tablica 8), dok je u Splitu udio domicilnih i hospitalnih infekcija bio podjednak, a za Čakovec većina podataka nedostaje (tablica 8). Crijevne koinfekcije bile su sporadične, i to uglavnom adenovirusne (tablica 8). Apsolutni broj, sveukupno i po centru, kao i relativni udio (postotak u odnosu na ukupan broj djece) evidentirane djece jasno je opadao od zimskih mjeseci, tj. siječnja i veljače prema ljetnim mjesecima, s tendencijom blagog porasta prema kraju godine (tablica 8). To se jasno vidi na slici 3 –

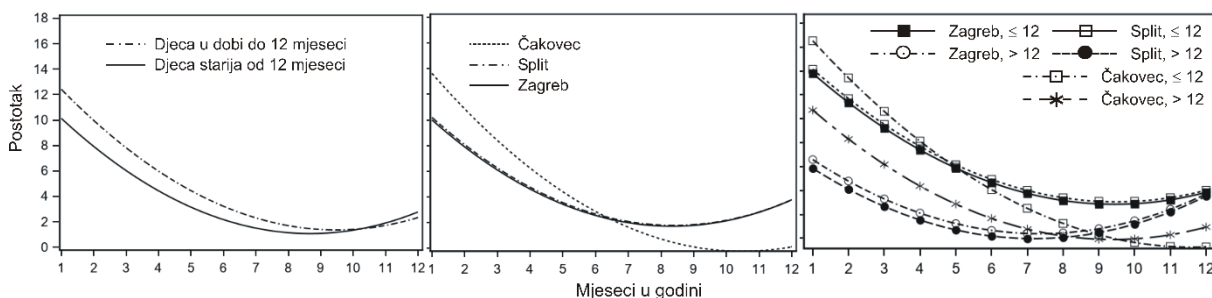
sveukupno i po centru, u odnosu na mjesece u godini, raspodjela djece slijedi kvadratični trend: pad od siječnja/veljače prema ljetnim mjesecima i zatim blagi porast (slika 3 gore). To isto vrijedi i ako se gledaju godišnja doba (tablica 8, slika 3 dolje).



**Slika 3.** Raspodjela evidentirane djece (postotci od ukupnog broja) tijekom godine: po mjesecima, sveukupno i po centru (gore), odnosno po godišnjim dobima, ukupno i po centru (dolje).

S obzirom da je među centrima bilo razlike u udjelu djece do 12 mjeseci starosti i starije (tablica 8), udio (postotak – od ukupnog broja) djece evidentiran po mjesecima analiziran je u generaliziranom hijerarhijskom modelu kako bi se generirali „podešeni“ trendovi tijekom godine – po centru, po dobnoj skupini odnosno po centru-po-dobnoj skupini. Iako su u pojedinim mjesecima postojale manje razlike u distribuciji između

djece do 12 mjeseci i starijih, odnosno po centrima, te po podskupinama po dobi-po-centru – trend je uvijek bio isti: relativno više djece u razdoblju siječanj-veljača, zatim pad prema ljetnim mjesecima i blagi porast prema kraju godine (slika 4).



**Slika 4.** Podešeni (kvadratični) trendovi raspodjele djece po mjesecima u godini – prema dobnoj skupini (lijevo), po centru (sredina), te po dobnoj skupini-po centru (desno). Raspodjela djece (kao postotak od ukupnog broja) analizirana je u hijerarhijskom generaliziranom modelu u kojem je vrijeme (mjeseci u godini) modelirano kao linearni i kvadratični (vrijeme\*vrijeme) fiksni efekt, uz dobnu skupinu, centar, vrijeme\*centar, vrijeme\*dobna skupina i vrijeme\*centar\*dobna skupina interakciju. Prikazane crte su podešene distribucije po mjesecima tijekom jedne godine.

### 5.3 Podioba detektiranih rotavirusnih genotipova prema dijelu godine

Kako je već naznačeno, detektiran je niz različitih genotipova, neki samo sporadično – sveukupno, a posebno gledano po centrima (tablica 5), uz određene razlike zastupljenosti između centara (tablica 6). Stoga je podioba identificiranih genotipova, onih koji su važni bilo po učestalosti bilo po drugim svojstvima, po dijelu godine prikazana sveukupno (tablica 9): generalno, najzastupljeniji tipovi (G1[P8] i G2[P4]) „prate“ već opisani obrazac većeg broja početkom kalendarske godine (tj. u još uvijek zimskim mjesecima), uz pad apsolutnog broja (i relativnog udjela u ukupnom njihovom broju) prema ljetnim mjesecima, pa blagi porast tijekom jeseni (tablica 9). Drugi, znatno rjeđi tipovi, imaju ili slične obrasce ili neke specifičnosti (tablica 9), a to je bolje uočljivo na slici 5.

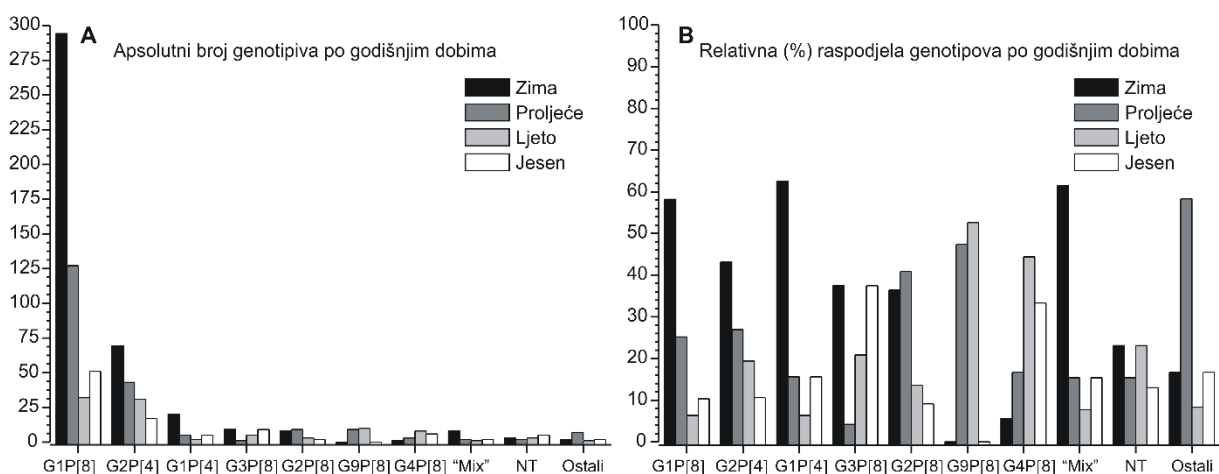


**Tablica 9.** Podioba pojedinih važnijih (po učestalosti ili drugim svojstvima) rotavirusnih genotipova po mjesecima/godišnjim dobima.

	<b>G1P[8]</b>	<b>G2P[4]</b>	<b>G1P[4]</b>	<b>G3P[8]</b>	<b>G2P[8]</b>	<b>G9P[8]</b>	<b>G4P[8]</b>	Miješani	NT	Ostali
Ukupno	505	160	32	24	22	19	18	13	13	12
Mjeseci										
Siječanj	109 (21.6)	30 (18.8)	8 (25.0)	3 (12.5)	2 (9.1)	0 (10.5)	1 (5.6)	3 (23.1)	3 (23.1)	1 (8.3)
Veljača	123 (24.4)	27 (16.9)	5 (15.6)	1 (4.2)	2 (9.1)	0	0	1 (7.7)	0	1 (8.3)
Ožujak	70 (13.9)	21 (13.1)	5 (15.6)	2 (8.3)	4 (18.2)	2 (10.5)	1 (5.6)	6 (46.2)	0	0
Travanj	60 (11.9)	17 (10.6)	2 (6.2)	0	7 (31.8)	2 (10.5)	1 (5.6)	0	1 (7.7)	4 (33.3)
Svibanj	33 (6.5)	15 (9.4)	1 (3.1)	1 (4.2)	1 (4.5)	4 (21.0)	0	0	1 (7.7)	2 (16.7)
Lipanj	15 (3.0)	2 (1.2)	2 (6.2)	0	1 (4.5)	1 (5.3)	1 (5.6)	0	0	1 (8.3)
Srpanj	9 (1.8)	5 (3.1)	0	0	0	1 (5.3)	1 (5.6)	1 (7.7)	1 (7.7)	0
Kolovoz	15 (3.0)	17 (10.6)	1 (3.1)	2 (8.3)	2 (9.1)	3 (15.8)	5 (27.8)	0	1 (7.7)	0
Rujan	6 (1.2)	10 (6.3)	1 (3.1)	5 (20.8)	1 (4.5)	6 (31.6)	3 (16.7)	0	1 (7.7)	1 (8.3)
Listopad	11 (2.2)	5 (3.1)	0	0	0	0	4 (22.2)	0	0	0
Studeni	18 (3.6)	5 (3.1)	1 (3.1)	4 (16.7)	2 (9.1)	0	0	1 (7.7)	2 (15.4)	0
Prosinac	36 (7.1)	6 (3.7)	6 (18.8)	6 (25.0)	0	0	1 (5.6)	1 (7.7)	3 (23.1)	2 (16.7)
Dio godine										
Zima (21.12-20.03)	294 (58.2)	69 (43.1)	20 (62.5)	9 (37.5)	8 (36.4)	0	1 (5.6)	8 (61.5)	3 (23.1)	2 (16.7)
Proljeće (21.03-20.06)	127 (25.2)	43 (26.9)	5 (15.6)	1 (4.2)	9 (40.9)	9 (47.4)	3 (16.7)	2 (15.4)	2 (15.4)	7 (58.3)
Ljeto (21.06-22.09)	32 (6.3)	31 (19.4)	2 (6.3)	5 (20.8)	3 (13.6)	10 (52.6)	8 (44.4)	1 (7.7)	3 (23.1)	1 (8.3)
Jesen (23.09-21.12)	52 (10.3)	17 (10.6)	5 (15.6)	9 (37.5)	2 (9.1)	0	6 (33.3)	2 (15.4)	5 (13.0)	2 (16.7)

NT – bilo G bilo [P], bilo oboje – ne može se tipizirati

Apsolutni broj (slika 5A) kao i relativna raspodjela (kao % od ukupnog broja tog genotipa) (slika 5B) G1[P8] i G2[P4] izvjesno opadaju i rastu kako je opisano. To vrijedi i za rjeđi genotip G1[P4], G2[P8], te „miješane“ genotipove. No, neki rjeđi genotipovi pokazuju nešto različite obrasce – uz oprez da se radi doista malim brojevima tih genotipova (slika 5): a) primjerice, G3[P8], čini se, podjednako je često registriran u zimskim i jesenjim mjesecima; b) G9[P8] registriran je isključivo u proljetnim i ljetnim mjesecima – niti jedan slučaj tog genotipa nije zabilježen zimi ili u jesen; c) „ne-tipabilni“ genotipovi čini se, sporadično se (bez neke „preferencije“), bilježe tijekom cijele godine; d) „ostali“ – koji su doista sporadični – većinom su ipak zabilježeni u proljeće, manje tijekom drugih dijelova godine.

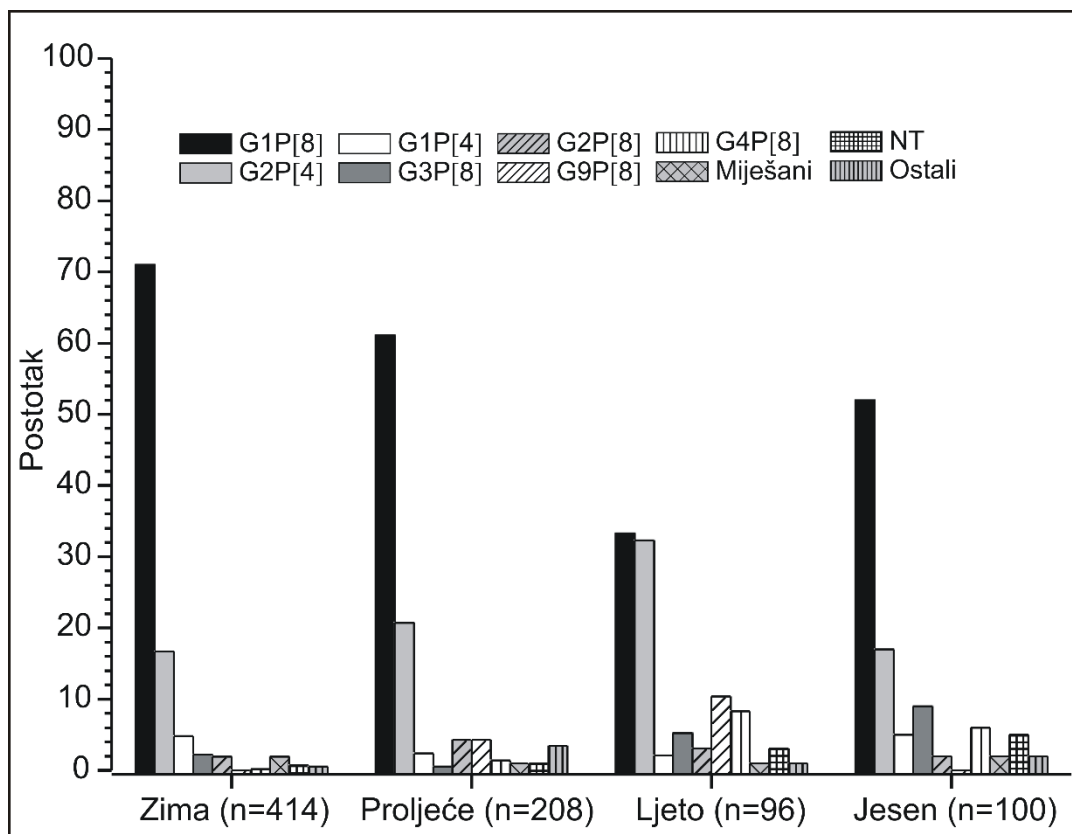


**Slika 5.** Razdioba genotipova po godišnjim dobima – apsolutni broj (A), ili relativno (% od ukupnog broja tog genotipa) (B).

„Mix“ – miješani genotipovi; NT – ne mogu se tipizirati (bilo G, bilo [P], bilo oboje).

Gledano iz drugog ugla, u svako doba godine, najzastupljeniji genotip je G1[P8], no njegov udio u ukupnom broju opada od oko 71% zimi do oko 33% ljeti (slika 6). G2[P4] uvijek je drugi najzastupljeniji genotip, ali mu udio raste od oko 18% zimi do 32% ljeti (slika 6). Udjeli drugih genotipova također donekle variraju – najupečatljivije G9[P8] na kojeg otpada oko 10% svih genotipova – ljeti (i oko 5% u proljeće) – a inače nije zabilježen (slika 6). Obzirom na ukupne brojeve registriranih genotipova – uočene

oscilacije G1[P8] i G2[P4] su vjerojatno „pouzdané“ na način da se ne radi o slučaju, već o doista vjerojatno reproducibilnom obrascu. Također, uvjerljivom se čini pojava G9[P8] samo u ljetnim mjesecima. Udjeli svih drugih genotipova su toliko mali da je teško razlučiti jesu li oscilacije u broju (i udjelu) u pojedinim godišnjim dobima čisti slučaj ili neka zakonitost.

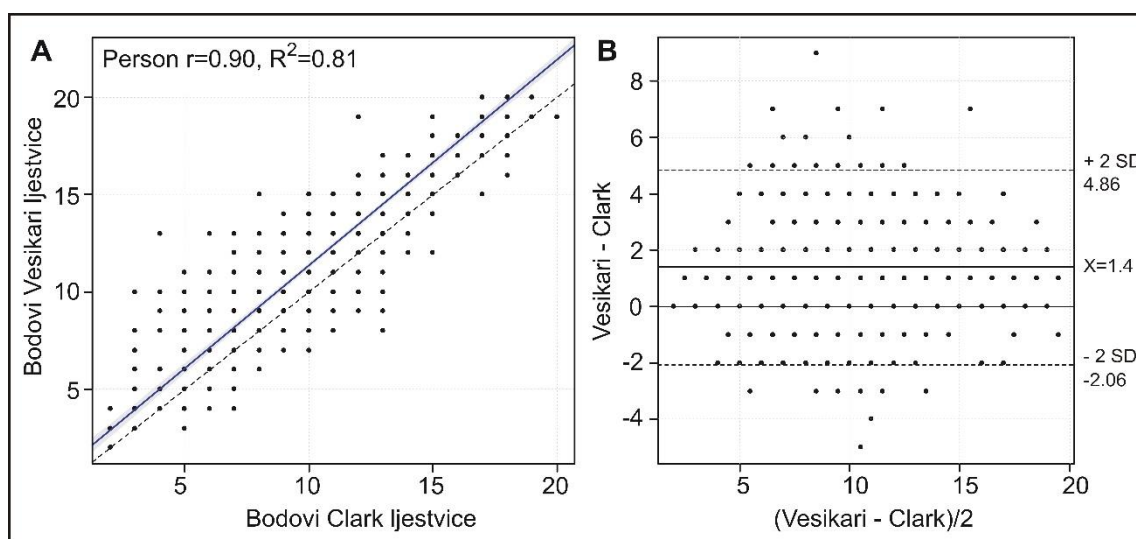


**Slika 6.** Udio (%) pojedinih genotipova u ukupnom broju dokazanih rotavirusnih infekcija po godišnjim dobima. NT – ne mogu se tipizirati

## 5.4 Težina bolesti: ocjenске ljestvice Vesikari i Clark

Podaci o težini bolesti na temelju Vasikarijeve i Clarkove ocjenске ljestvice ukupno su prikupljeni za 725 djece s dokazanom (PCR-om) rotavirusnom infekcijom: za 497 djece u Zagrebu, 162 djece u Splitu i 66 djece u Čakovcu.

Budući da dvije ljestvice kvantificiraju isti fenomen (težinu simptoma), korelacija između ocjena na dvije ljestvice je visoka (slika 7A), no one drugačije boduju pojedine simptome i imaju drugačiji raspon (Clarkova ljestvica od 0 do 24, Vesikarijeva ljestvica od 0 do 20) pa je stoga i podudarnost između numeričkih vrijednosti ocjena na dvije ljestvice zanemarivo mala (slika 7B). To potvrđuju i rezultati u tablici 10 – već dobro poznato (155,159) nepoklapanje u klasifikaciji bolesti po težini.



**Slika 7.** Odnos ocjena težine bolesti na Vesikarijevoj i Clarkovoj ocjenškoj ljestvici ( $n=725$ ). **A.** Korelacija. Puna crta – korelacija (vidi se visok stupanj korelacije, koeficijent korelacije  $r$  i  $R^2$  su visoki); zasjenjeno područje- granice pouzdanosti; točke – individualne vrijednosti; crtkana crta – naznačuje položaj korelacijskog pravca uz  $r=1.0$ . **B.** Analiza podudarnosti (Bland-Altman). Puna deblja horizontalna crta – prosječno odstupanje Vesikari – Clark ( $X=1.4$ ); crtkane crte -  $+2$  standardne devijacije (SD) od prosječnog odstupanja,  $-2SD$  od prosječnog odstupanja. Taj raspon obuhvaća 95% razlika. Vidi se da se proteže od  $-2.1$  do  $+4.9$  bodova ljestvice; tanka puna crta – označuje razliku=0.

Prema Vesikarijevoj ocjenskoj ljestvici, ukupno je 452/725 (62.3%) djece imalo „tešku bolest“ (ocjena  $\geq 11$ ) (tablica 10), a ostali su imali bolest koja „nije teška“. Prema Clarkovoj ljestvici, „tešku bolest“ (ocjena  $> 16$ ) imalo je 35/725 (4.8% djece), a blagu bolest je imalo 255/725 (35.2% djece). Ukupno 217/725 (29.9%) djece imalo je Vesikari ocjenu  $< 11$  i Clark ocjenu  $< 9$ , tj. po obje metode – „blagu“ ili „ne-tešku“ bolest (tablica 10), a svega 35 (4.8%) imalo je Vesikari ocjenu  $\geq 11$  i Clark ocjenu  $> 16$ , tj. po oba kriterija „tešku“ bolest.

**Tablica 10.** Klasifikacija djece u odnosu na težinu bolesti po Vesikari i Clark ocjenskim ljestvicama.

Clarkova ljestvica	Vesikarijeva ljestvica		Ukupno
	Ocjena $< 11$ (nije teška bolest)	Ocjena $\geq 11$ (teška bolest)	
Ocjena $< 9$ (blaga bolest)	217 (29.9% svih)	38	255 (35.2% svih)
Ocjena 9-16 (umjereno teška bolest)	56	379	435 (60.0% svih)
Ocjena $> 16$ (teška bolest)	0	35 (4.8% svih)	35 (4.8% svih)
Ukupno	273 (37.7% svih)	452 (62.3% svih)	725

Budući da se u literaturi katkad pokušava jednu ili drugu ljestvicu „re-klasificirati“, tako da obje imaju ili dvije ili tri razine težine simptoma (155,159), arbitrarno smo podijelili djecu na temelju Clarkove ocjene na one s ocjenom  $< 11$  i one s ocjenom  $\geq 11$  – dakle, na istoj apsolutnoj vrijednosti kao i u slučaju Vesikarijeve klasifikacije (na Clarkovoj ljestvici, ocjena 11 pada u „drugu četvrtinu“ raspona vrijednosti koje se klasificiraju kao „umjerena-do-teška“ bolest, 11-16). Kako je prikazano u tablici 11, podudarnost klasifikacije tako je znatno bolja: 96.0% djece klasificirano kao „nije teža bolest“ po jednoj ljestvici – isto je tako klasificirano i po drugoj; 75.0% djece klasificirano kao „teža bolest“ po jednoj ljestvici – isto je tako klasificirano i po drugoj ljestvici. Cohenov  $\kappa$  koeficijent (indikator podudarnosti u klasifikaciji) s 95%CI nalazi se u području „znatne podudarnosti“ (tablica 11).

**Tablica 11.** Re-klasifikacija djece u odnosu na težinu bolesti po Vesikarijevoj i Clarkovoj ljestvici.

Clark ljestvica	Vesikari ljestvica		Ukupno
	Ocjena <11 (nije teška)	Ocjena ≥11 (teška bolest)	
Ocjena <11 (nije teža)	262 (96.0%)	113 (25.0%)	375
Ocjena ≥11 (teža/teška bolest)	11 (4.0%)	339 (75.0%)	350
Ukupno	273	452	725

Podudarnost=82.9%, Cohen  $\kappa$ = 0.66 (95%CI 0.61-0.71) –  $\kappa$  u rasponu 0.61-0.80 smatra se „znatnom podudarnošću“.

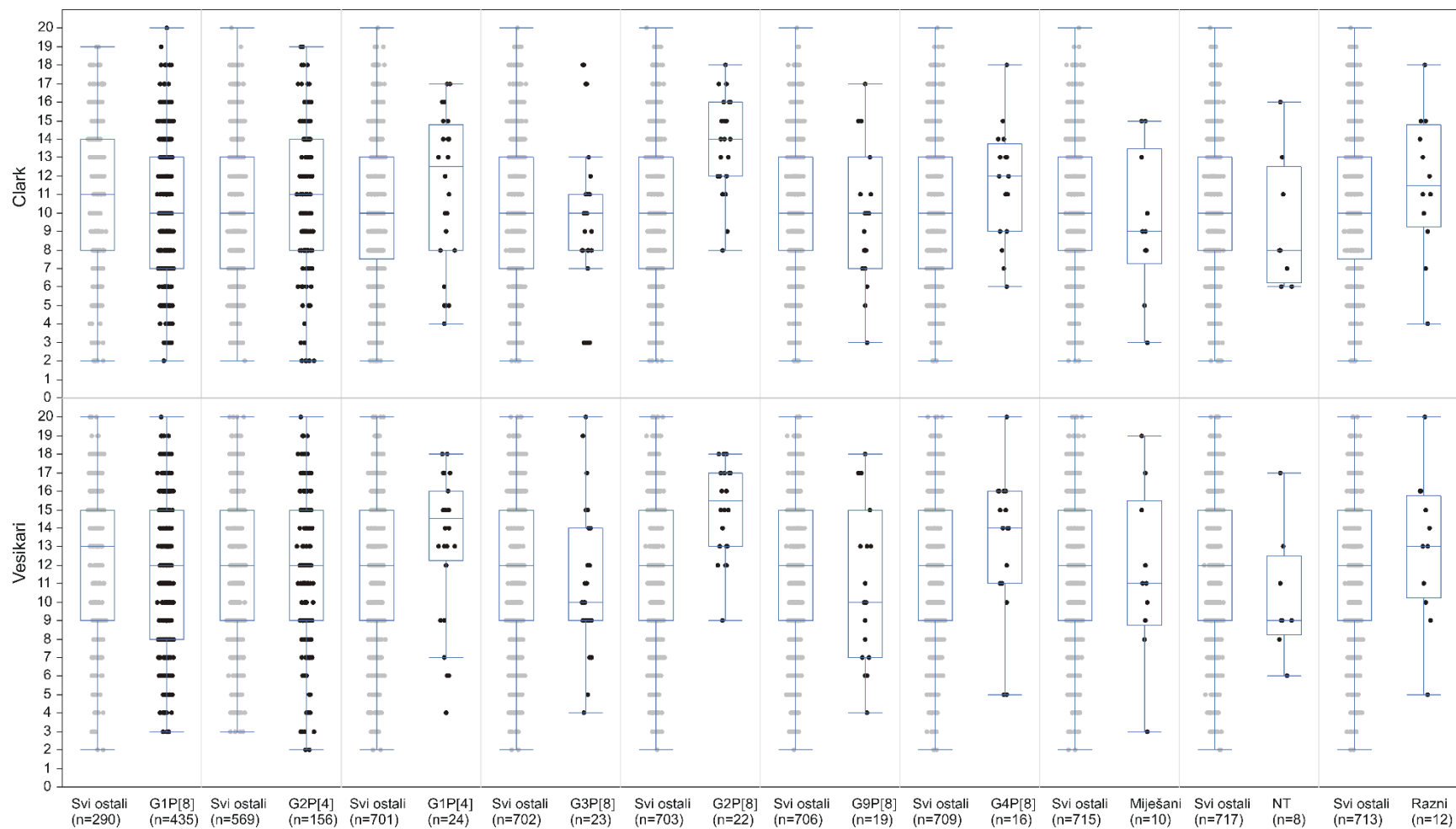
S obzirom na primarnu epidemiološku narav istraživanja, od posebnog je interesa pitanje moguće povezanosti određenih genotipova i težine kliničke slike. Na slici 8 prikazane su ocjene težine bolesti po pojedinom od genotipova od posebnog interesa (za koje je analizirana i pojavnost prema dijelu godine). Svaki od tih genotipova prikazan je u odnosu na „sve ostale genotipove“ (slika 8). Uočljivo je, primjerice (slika 8):

- a) za najčešći genotip (G1[P8]) u odnosu na sve ostale, medijan obje ocjene je nešto niži, ali svega za 1-2 boda ljestvice;
- b) za drugi najčešći genotip (G2[P4]), medijan Clarkove ocjene je nešto viši, a Vesikarijeve ocjene jednak onom za sve ostale genotipove;
- b) vrijednosti (medijani) za pojedine druge genotipove, svaki pojedinačno u odnosu na sve ostale, ponešto odstupaju – ili su viši ili niži, no razlike se čine male.

Isto vrijedi ako se ocjene za pojedine genotipove promatraju jedan u odnosu na drugi, prema bilo kojoj ili obje ljestvice (**slika 8**). No valja uočiti:

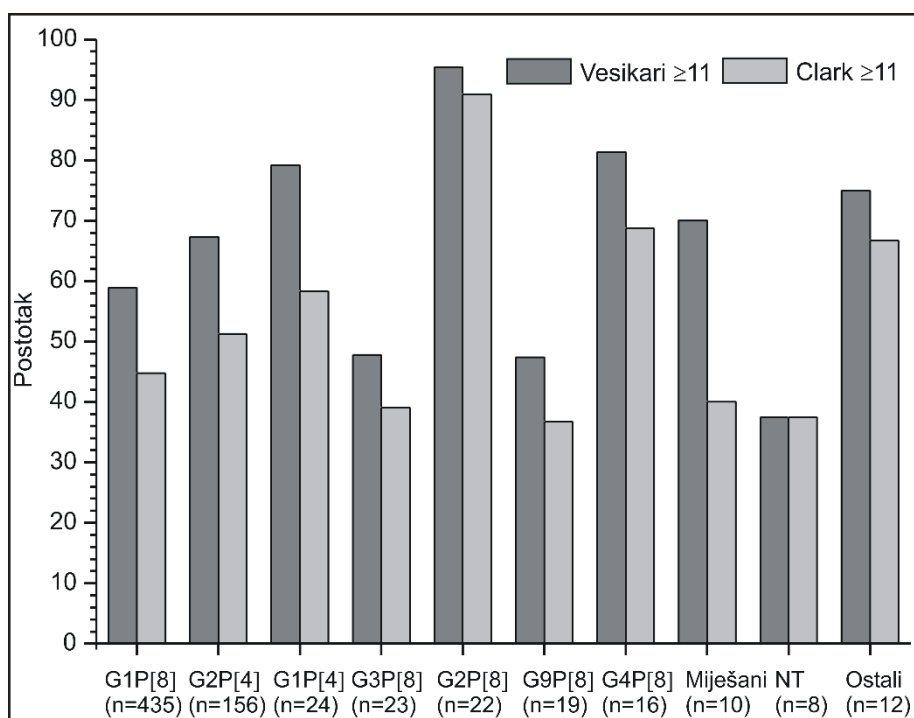
- a) pojedinačne se vrijednosti zapravo uvelike preklapaju i nema nekih izrazitih „grupiranja“ u neke „odstupajuće vrijednosti“;
- b) osim dva najčešća genotipa, svi ostali su vrlo malobrojni;
- c) za dosta djece (oko 11% svih) – ocjene nisu prikupljene, pa je moguća znatna sustavna greška.

Sveukupno, dakle, vrlo je lako moguće da vrijednosti za pojedine rjeđe genotipove zapravo ne reprezentiraju adekvatno populaciju djece koja obole od infekcije tim genotipovima.



**Slika 8.** Ocjene težine bolesti prema ocjenskim ljestvicama Clark (gore) i Vesikari (dolje) prema pojedinim od značajnijih genotipova. Prikazane su vrijednosti za svaki genotip (crno) u odnosu na „sve ostale genotipove“ (sivo). Točke su pojedinačne vrijednosti, kvadrati naznačuju donju i gornju kvartilu a medijan je naznačen poprečnom crtom. Okomite crte su tzv. „unutarnje ograde“ (donja= donja kvartila – 1.5\*interkvartilni raspon; gornja= gornja kvartila + 1.5\*interkvartilni raspon. NT – ne može se tipizirati

Uz sva navedena ograničenja, slika 9 prikazuje udjele (postotke) djece u kojih je Vesikarijeva ocjena  $\geq 11$  (teška bolest), odnosno u kojih je Clarkova ocjena  $\geq 11$  („teža/teška“ bolest) prema identificiranim genotipovima. Tu graničnu vrijednost smo odabrali jer u ovom uzorku djece na tim graničnim vrijednostima dvije ocjenske ljestvice prilično podudarno klasificiraju „težu/tešku“ bolest (tablica 11). Udio djece s „težom bolesti“ uvijek je nešto veći ako je kriterij Vesikarijeva ljestvica, jedino za „miješane“ genotipove razlika između Vesikarijevih i Clarkovih kriterija je izraženija (7/10 vs. 4/10) (slika 9). Slično, za neke genotipove udio djece s „težom/teškom“ bolesti (po obje ljestvice) je vrlo visok – npr. za G2[P8] radi se o 21/22 (Vesikari) odnosno 20/22 (Clark) djece (slika 9); a za neke je vrlo nizak (npr 3/8 i 3/8 za ne-tipabilne tipove; slika 9). No, ponovno treba imati na umu da se radi o malim brojevima djece i te proporcije moguće nisu reprezentativne.



**Slika 9.** Udio djece s Vesikarijevom ocjenom  $\geq 11$ , odnosno Clarkovom ocjenom  $\geq 11$  („teža/teška“ bolest – sukladno razmjerno podudarnoj klasifikaciji djece u „teže“ po tim kriterijima – tablica 11).



Konačno, budući da su ocjene registrirane u različitim centrima, u djece različite dobi, te u okolnostima u kojima su neke infekcije bile hospitalne (a neke domicilne), za procjenu moguće povezanosti pojedinih genotipova (sa slike 9) i težine simptoma napravljene su sljedeće analize:

**a)** Vesikarijeva ocjena i Clarkova ocjena analizirane su svaka u 10 zasebnih generaliziranih mješovitih (hijerarhijskih) modela (normalna distribucija, *identity link*). U svakom od modela, evaluiran je odnos jednog genotipa vs. „svi ostali“ i ocjena težine bolesti. Fiksni efekti su genotip (vrs. svi ostali), dobna skupina ( $\leq 12$  mjeseci – takve je djece bilo 298/725 [41.1%]; ili  $>12$  mjeseci – takve je djece bilo 427 [58.9%]) i radi li se o hospitalnoj infekciji (takve je djece bilo 130/725 [17.9%]) ili domicilnoj infekciji (takve je djece bilo 595 [82.1%]). Moguće crijevne koinfekcije nisu uzete u obzir, budući da su bile doista sporadične (sveukupno u 22 djece). Nasumični efekt je bio centar i centar\*genotip interakcija. Takvi modeli pri procjeni fiksnih efekata „korigiraju“ za korelaciju unutar centra i za moguće razlike odnosa genotipa i težine bolesti po centrima.

**b)** Analizirane su proporcije djece s Vesikarijevom ocjenom  $\geq 11$  bodova, odnosno Clarkovom ocjenom  $\geq 11$  bodova (granična vrijednost koja je u ovom uzorku pokazala dobru podudarnost u razvrstavanju „teže/teške“ bolesti sa standardnom Vesikarijevom klasifikacijom). Princip je bio isti kao u analizi ocjena i procjene razlike (opisano u prethodnom odsječku), samo su sada modeli bili s binomijalnom distribucijom i *logit linkom* (logistički) pa su rezultati usporedbe svakog pojedinog genotipa u odnosu na sve ostale – podešeni omjeri izgleda (*odds ratio*, OR).

Kako je sažeto u tablici 12, nije uočena naznaka da bi se bolest uzrokovana bilo kojim pojedinim rotavirusnim genotipom po težini (kao razlika u iznosu Vesikarijeve i Clarkove ocjene) simptoma razlikovala u odnosu na sve ostale genotipove. No, u svih 10 modela dob  $>12$  mjeseci bila je jasno združena s višim ocjenama u odnosu na dob  $\leq 12$  mjeseci, iako je razlika bila mala (sve prosječne razlike oko 1.1 bod ljestvice, s granicama pouzdanosti u cjelini  $>0.0$ , te s vrlo niskim P-vrijednostima). Također, u svim su modelima ocjene simptoma bile niže u djece s bolničkim vs. domicilnim infekcijama (u

pravilu oko -1.3 boda ljestvice, s granicama pouzdanosti u cjelini <0.0 i niskim P-vrijednostima).

**Tablica 12.** Sažetak multivarijantnih modela\* za analizu povezanosti pojedinih genotipova i ocjena težine simptoma. Svi kontrasti (razlike) odnose se na usporedbu predmetnog genotipa u odnosu na sve ostale.

Genotip	Vesikarijeva ocjena		Clarkova ocjena	
	Razlika (95%CI)	P	Razlika (95%CI)	P
G1[P8] vs. svi ostali genotipovi	-0.89 (-4.5, 2.7)	0.514	-0.63 (-4.8, 3.5)	0.677
G2[P4] vs. svi ostali genotipovi	0.36 (-4.3, 5.0)	0.825	0.32 (-4.2, 4.8)	0.847
G1[P4] vs. svi ostali genotipovi	2.4 (-1.0, 5.8)	0.107	1.9 (-2.5, 6.3)	0.283
G3[P8] vs. svi ostali genotipovi	0.66 (-4.7, 6.1)	0.728	0.70 (-7.7, 9.1)	0.782
G2[P8] vs. svi ostali genotipovi	3.8 (-1.7, 9.2)	0.113	4.0 (-4.1, 12.1)	0.184
G9[P8] vs. svi ostali genotipovi	-0.43 (-4.4, 3.5)	0.775	0.19 (-4.6, 5.0)	0.916
G4[P8] vs. svi ostali genotipovi	1.6 (-2.6, 5.8)	0.347	2.0 (-2.9, 6.9)	0.303
Miješani vs. svi ostali genotipovi	0.44 (-4.3, 5.2)	0.809	0.18 (-5.0, 5.3)	0.926
Ne mogu se tipizirati vs. svi ostali tipovi	-0.50 (-4.7, 3.7)	0.773	0.30 (-5.2, 5.9)	0.887
„Razni (preostali)“ vs. svi ostali tipovi	1.6 (-4.0, 7.1)	0.451	2.0 (-5.8, 9.7)	0.464

\*Generalizirani mješoviti hijerarhijski modeli – po jedan za svaki genotip – uz dodatne fiksne efekte dob i je li infekcija hospitalna ili domicilna. Centar i genotip\*centar interakcija su nasumični efekti. Sve prikazane granice pouzdanosti i P-vrijednosti su podešene za broj testova (simulacijska *stepdown* metoda po Shafferu).

U tablici 13 sažeti su rezultati logističkih modela, tj. analize proporcija djece s „težom/teškom“ bolesti – niti u ovoj analizi nije uočen jasan signal da bi bilo koji genotip u odnosu na sve ostale bio združen s relevantno višom ili nižom vjerojatnošću „teže/teške“ bolesti. Ponovno, dob >12 mjeseci u svih je 10 modela bila jasno združena s većim izgledima za „težu/tešku“ bolest (tipični podešeni OR oko 2.00), s granicama pouzdanosti u cjelini >1.0 i niskim P-vrijednostima; bolničke infekcije su, pak, bile konzistentno združene s nižim izgledima „teže/teške“ bolesti od domicilnih (tipični

podešeni OR oko 0.5-0.6), s granicama pouzdanosti u cjelini <1.0 i niskim P-vrijednostima.

Izuzetak je G2P[8] genotip – gdje je naznaka vrlo visokih OR kao sugestija da je taj genotip, u odnosu na sve ostale, združen s većim izgledima za „težu/tešku“ bolest (po obje ljestvice) – međutim, radi se o svega 22 djece (21 ima Vesikarijevu ocjenu  $\geq 11$ , a 20 Clarkovu ocjenu  $\geq 11$ ). S obzirom na tako mali uzorak, procjena je izrazito neprecizna (granice pouzdanosti su jako široke), pa se je u taj efekt teško pouzdati. No, opaženo treba smatrati naznakom mogućnosti da bi taj genotip mogao biti združen s nešto težom manifestacijom bolesti (u odnosu na sve ostale genotipove).

**Tablica 13.** Sažetak multivarijantnih modela\* za analizu povezanosti pojedinih genotipova i ocjena težine simptoma. Svi kontrasti (razlike) odnose se na usporedbu predmetnog genotipa u odnosu na sve ostale.

Genotip	Vesikarijeva ocjena $\geq 11$		Clarkova ocjena $\geq 11$	
	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
G1[P8] vs. svi ostali genotipovi	0.68 (0.12-3.69)	0.540	0.69 (0.08-6.00)	0.645
G2[P4] vs. svi ostali genotipovi	1.31 (0.20-8.41)	0.687	1.48 (0.16-13.4)	0.632
G1[P4] vs. svi ostali genotipovi	3.24 (0.50-21.1)	0.140	2.76 (0.25-29.9)	0.293
G3[P8] vs. svi ostali genotipovi	0.87 (0.12-6.20)	0.851	1.40 (0.12-16.7)	0.720
G2[P8] vs. svi ostali genotipovi	15.4 (0.76-310)	0.036	18.0 (0.43-747)	0.086
G9[P8] vs. svi ostali genotipovi	0.55 (0.08-3.89)	0.449	0.64 (0.02-21.2)	0.717
G4[P8] vs. svi ostali genotipovi	2.62 (0.25-27.1)	0.314	3.26 (0.22-48.2)	0.278
Miješani vs. svi ostali genotipovi	1.24 (0.13-11.7)	0.812	0.67 (0.02-17.9)	0.748
Ne mogu se tipizirati vs. svi ostali tipovi	0.59 (0.07-5.28)	0.562	1.14 (0.03-40.2)	0.924
„Razni (preostali)“ vs. svi ostali tipovi	2.06 (0.16-26.9)	0.481	3.32 (0.07-161)	0.402

\*Generalizirani mješoviti hijerarhijski modeli – po jedan za svaki genotip – uz dodatne fiksne efekte dob i je li infekcija hospitalna ili domicilna. Centar i genotip\*centar interakcija su nasumični efekti. Sve prikazane granice pouzdanosti i P-vrijednosti su podešene za broj za broj testova (simulacijska *stepdown* metoda po Shafferu).

## 6. RASPRAVA

Rotavirus je najčešći uzročnik morbiditeta i mortaliteta zbog AGE u djece mlađe od 5 godina te uzrokuje gotovo 260 milijuna epizoda AGE i jednu trećinu svih smrti zbog AGE (3).

Rotavirusna infekcija je univerzalna te gotovo svako dijete do 5. godine života ima barem jednu epizodu RVGE, a 20% oboljelih zahtijeva posjet bolnici (26).

Podaci o epidemiologiji RV-a u Republici Hrvatskoj su rijetki. Postoji molekularno-epidemiološka studija iz 2005./2006. godine gdje je Hrvatska uključena kao dio Središnje/Jugoistočne Europe (uz Češku, Sloveniju, Albaniju i Bugarsku) i sadržava podatke o rotavirusnim genotipovima samo za područje Grada Zagreba (tj. Središnje Hrvatske) (89). Podaci o drugim regijama, mogućoj sezonskoj distribuciji genotipova, kao niti težini bolesti i eventualnoj razlici u težini bolesti među genotipovima u Hrvatskoj nisu dosad objavljeni. Ovo istraživanje predstavlja prvu hrvatsku nacionalnu studiju o molekularnoj epidemiologiji rotavirusnih genotipova u djece <5 godina u tri hrvatske regije (Središnjoj, Sjevernoj i Južnoj).

Incidencija RVGE je najveća u djece mlađe od 5 godina, koja su i pod najvećim rizikom od težih oblika bolesti, a zatim progresivno pada prema starijoj dobi zbog stečene zaštitne imunosti. Rotavirusne infekcije u odraslih su uglavnom subkliničke, ali povremeno mogu biti i simptomatske, pogotovo u roditelja djece s RVGE, imunokompromitiranih, starijih odraslih (zbog gubitka zaštitne imunost) ili putnika u slabije razvijene zemlje (261). Međutim, postoje razlike u dobnoj distribuciji RVGE između pojedinih zemalja. Najveća globalna studija o dobnoj distribuciji RVGE u prevakcinalnom razdoblju Hasso-Agopsowicza i suradnika pokazala je da se medijan dobi rotavirusne infekcije razlikuje između, pa čak i unutar zemalja, ali generalno, dob djece s RVGE je značajno niža u zemljama s visokim mortalitetom od RVGE. Medijan dobi djece hospitalizirane zbog RVGE u zemljama s vrlo visokim mortalitetom bio je 38 tjedana, u zemljama s visokim mortalitetom 43 tjedna, 46 tjedna u zemljama s umjerenim mortalitetom, te 65 tjedana u zemljama s niskim/vrlo niskim mortalitetom. Drugim riječima, medijan dobi djece hospitalizirane zbog RVGE se smanjuje kako smrtnost zbog RVGE raste (49). Slični su i podaci SZO-a: u zemljama s nižim prihodima

medijan dobi prve rotavirusne infekcije je 6-9 mjeseci (80% slučajeva u djece <1 godine), dok je u zemljama s višim prihodima vrijeme prve infekcije često pomaknuto na dob 2-5 godina, premda se većina prvih infekcija ipak događa u dojenačkoj dobi (65% <1 godine) (48). Prema podacima EuroRotaNet-a, rotavirusna infekcija u Europi ima vrhunac u dobi od 6 mjeseci do 2 godine života (56). Zanimljivi su rezultati istraživanja Steele-a i suradnika, prema kojima RVGE u Europi ima dva vrhunca incidencije: prvi je u dobi 9-10 mjeseci, a drugi u dobi 20-21 mjesec, i oba su podjednakog intenziteta. S druge strane, u Africi su također uočena dva vrhunca: prvi je raniji nego u Europi, u dobi od 5 mjeseci, a drugi u drugoj godini života, no puno manjeg intenziteta (262). Dobna distribucija u ovom istraživanju velikim dijelom je slična gore navedenim obrascima za zemlje s niskim mortalitetom od RVGE, tj. razvijenije zemlje. Ukupni medijan dobi bio je 14.4 mjeseca, u Središnjoj Hrvatskoj 17.5 mjeseci, a u Sjevernoj 13.2 mjeseca. Veći dio djece bio je stariji od 12 mjeseci – ukupno 64.3%, u Središnjoj Hrvatskoj 72.1%, a u Sjevernoj 74.2%. Ovi podaci slični su rezultatima prethodne studije koja je uključivala Hrvatsku (89), a u kojoj je vrhunac incidencije RVGE bio u dobi između 1 i 2 godine (34.1% slučajeva). Iznimka u ovom istraživanju je populacija u Splitu, tj. Južnoj Hrvatskoj, gdje je medijan dobi puno niži, 4.4 mjeseca, a 71.8% djece bilo je mlađe od 12 mjeseci. Mogući razlog tomu je veliki udio bolničkih RVGE u toj regiji (43.8% naspram 15.8% u ukupnom broju ili 10.2% u Središnjoj Hrvatskoj). Naime, djeca s NRV AGE generalno su mlađa nego djeca s domicilnim RVGE, s vrhuncem incidencije u dobi 0-11 mjeseci (167,174,178,179). Prema rezultatima Forstera i suradnika čak 43% djece s NRV AGE mlađe je od 6 mjeseci, za razliku od 17% s domicilnim RVGE (178), a bolesnici s NRV AGE su prosječno 9.8 -10.6 mjeseci mlađi u odnosu na bolesnike s domicilnim RVGE (168,179).

Važno je poznavati regionalne trendove u dobnoj distribuciji RVGE kako bi se stvorila optimalna strategija za kontrolu bolesti putem cijepljenja (262). Trenutne smjernice ESPID-a (252) i SZO-a (251) preporučuju primjenu rotavirusnih cjepiva rano u dojenačkoj dobi (od navršenih 6 tjedana života), prije izloženosti prvoj simptomatskoj prirodnoj infekciji, koja je obično i najteža. Na taj način značajno se smanjuje morbiditet i mortalitet od RVGE u prvoj godini života, kad su djeca najosjetljivija na mogući teži tijek bolesti (130), što je posebno bitno za slabije razvijene zemlje u kojima je vrhunac incidencije RVGE u nižoj dobi. No, s obzirom da je u Europi evidentan drugi vrhunac

incidencije RVGE u drugoj godini života (262), a i u ovom istraživanju veći udio djece bio je stariji od 12 mjeseci (64.3% ukupno, odnosno 72.1% i 74.2% u dvije regije), ostaje pitanje mogućih alternativnih shema cijepljenja i eventualnih *booster* doza cjepiva koje bi pružile dugotrajniju zaštitu (262).

Osim dobne distribucije RVGE, za planiranje učinkovite strategije rotavirusnog cijepljenja potrebno je poznavati molekularnu epidemiologiju, odnosno zastupljenost i distribuciju rotavirusnih genotipova u određenom području (20,21).

U ovom istraživanju detektirano je ukupno 7 G-tipova (G1, G2, G3, G4, G6, G8 i G9) i 3 P-tipa ([P8], [P4] i [P6]) u različitim genotipskim kombinacijama. G1 je bio daleko najzastupljeniji G-tip (67.5%), a slijedio ga je G2 tip (22.9%), dok su ostali G-tipovi detektirani sporadično. Među P-tipovima P[8] je bio najčešći (75.6%), potom P[4] s približno tri puta manjom prevalencijom (26.3%) te samo jedan „neuobičajeni“ P[6] tip. Opažen je također čitav niz različitih G/P kombinacija, no, sveukupno, najčešća genotipska kombinacija bio je G1P[8] (61.9% ukupno te 57.2% u Središnjoj, 76.6% u Sjevernoj te 63.9% u Južnoj Hrvatskoj). Ovakva dominacija G1 tipa i G1P[8] genotipske konstelacije u skladu je s prevakcinalnim podacima iz drugih razvijenih zemalja (7–9,15). Genotip G1P[8] poznat je kao globalno dominantan genotip u prevakcinalnom razdoblju, pogotovo u zemljama s višim prihodima (4,87). Tri su opsežna epidemiološka istraživanja iz prevakcinalnog razdoblja koja su opisala globalnu raznolikost i distribuciju rotavirusnih genotipova (7–9), uz nekoliko važnih regionalnih (prema kontinentima ili SZO regiji) (15,90). Najveće istraživanje među navedenima je meta-analiza Bányai-ja i suradnika iz 2012. g. koja je uključila oko 110 000 genotipiziranih rotavirusnih izolata iz više od 100 zemalja u razdoblju od 1996. do 2007. g. i predstavlja osnovu za evaluaciju potencijalnih zamjena genotipova nakon uvođenja rotavirusnih cjepiva (9). Prema toj studiji, globalno najčešći G-tip bio je G1 (42.9%), a zajedno s G2, G3, G4 i G9 činio je 88.2% svih G-tipova. Detektirana je velika raznolikost G/P kombinacija (>70), no na samo pet kombinacija (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8]) otpadalo je 74.7% svih genotipova. Podaci su u skladu s prethodnim istraživanjem o globalnoj distribuciji genotipova 1989.-2004. g. Santosa i suradnika gdje je također opisana velika raznolikost genotipova, no samo četiri G tipa (G1, G2, G3 i G4) kombinaciji s P[8] ili P[4] činila su više od 88% genotipova, a G9 (u kombinaciji s P[8] ili P[6]) postao je peti najčešći G-tip

(ukupni udio 4.1%). Zanimljivo je da je najčešći, G1P[8] genotip uzrokovao više od 70% rotavirusnih infekcija u Sjevernoj Americi, Europi i Australiji, a s drugim „čestim“ genotipovima (G2P[4], G3P[8], G4P[8]) činio je više od 90% ukupnih genotipova, dok je u Južnoj Americi i Aziji te Africi taj udio bio značajno manji (68% i 50%), a zamijećena je i veća raznolikost genotipova (8).

U ovom istraživanju udio „čestih“ genotipova (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8]) bio je 88.8% te 81-95% među regijama, što je tipično za razvijene zemlje, kako je prethodno opisano (8), no u suprotnosti je s prethodnim rezultatima iz Hrvatske gdje je udio „čestih“ G/P kombinacija bio manji od 60%, a G1P[8] detektiran u manje od 22% uzoraka (89). Ova razlika u udjelima najčešćih genotipova između dva istraživanja upućuje na evidentnu vremensku fluktuaciju u distribuciji i prevalenciji rotavirusnih genotipova, s potencijalnom zamjenom dominantnih genotipova, kao što je već opisano u brojnim istraživanjima (9,15,56,263).

Zanimljivo je da je u ovom istraživanju G9, jedan od globalno najčešćih G-tipova, detektiran u samo 25 uzoraka (3.02%) – kao G9P[8] u 2.3%, G9P[4] u 0.6% i kao dio „miješanih“ infekcija u 0.12% slučajeva, što je slično kao i u prethodnoj studiji u Hrvatskoj gdje je G9 činio samo 2.2% svih G-tipova (89). G9 tip, koji se najčešće pojavljuje u kombinaciji s P[8] ili P[6], prvi put je otkriven u Philadelphiji, SAD, 1983./1984. g. u 9% dojenčadi s RVGE (264), a zatim se proširio diljem SAD-a, Japana, Australije i u druga područja svijeta te je do 2005. g., prema podacima Santosa i suradnika, činio 4.1% svih genotipova (8), a do 2012. g. čak 14.1% (9).

Od posebnog je interesa praćenje pojave novih, emergentnih, rotavirusnih genotipova, zbog mogućnosti da trenutno dostupna cjepiva neće pružiti adekvatnu zaštitnu imunost protiv njih, a nakon uvođenja cjepiva i zbog procjene potencijalnog selektivnog pritiska cjepiva i posljedično zamjene genotipova (93). G6 tip, koji prethodno nije opisan u Hrvatskoj (89), u ovom je istraživanju detektiran prvi put, i to u samo dva uzorka (u kombinaciji s P[4] i kao dio miješanog genotipa G6P[4]+ P[8]). Zanimljivo, izolati su bili iz dvije različite geografske regije – jedan iz Sjeverne, a jedan iz Južne Hrvatske. G6 je najčešći rotavirusni G-tip u goveda te se povremeno, ali s manjom učestalošću, izolira u ovaca i koza (96). Sporadično je izoliran u djece s AGE u različitim dijelovima svijeta, u kombinaciji s cijelim nizom P-tipova (8,96). U nekim zemljama, poput Mađarske, G6 ima veću prevalenciju (gotovo 1%) te je postao jedan od emergentnih G-tipova (265). S

druge strane, G8 tip koji je također tipični životinjski rotavirusni G-tip i koji je u prethodnom istraživanju Tcheremenskaia-e i suradnika (89) detektiran u više od 8% uzoraka u Hrvatskoj, u ovom istraživanju bio je zastupljen s udjelom od 0.1%.

Osim „čestih“ G/P genotipskih kombinacija, u ovom istraživanju detektirane su brojne „neuobičajene“ kombinacije koje su vjerojatno posljedica reassortmenta između „čestih“ humanih rotavirusnih tipova ili humanih i životinjskih (7,13). Genotipovi koji nastaju reassortmentom među „čestim“ humanim genotipovima bili su G1P[4] (3.9%), G2P[8] (2.7%), G9P[4] (0.5%) i G4P[4] (0.5%). Nadalje, G1P[4] bio je čak treći najčešći genotip ukupno i drugi najčešći u Sjevernoj Hrvatskoj gdje je činio 11.3% svih genotipova. Tako visoka prevalencija G1P[4] rijetko je opisana u literaturi (266). Mogući humano-životinjski rotavirusni genotipovi izolirani su sporadično (ukupno 0.36%) – G4P[6], G6P[4] i G8P[8]. Ovako visoka prevalencija „neuobičajenih“ genotipova (ukupno 8.06%), a pogotovo humano-humanih reassortanata (7.7%) nije tipična za europske zemlje gdje je njihova prevalencija oko 1% (58).

Za razliku od prethodnog istraživanja u Hrvatskoj (89) gdje su „miješane infekcije“ s različitim G ili P-tipovima potvrđene više od 8% uzoraka, u ovom istraživanju činile su manje od 2% slučajeva, što je slično podacima iz razvijenih zemalja (58). Smatra se da „miješane“ infekcije predstavljaju reassortment *in vivo* te pridonose stvaranju novih genotipskih kombinacija (265). Njihova prevalencija obično je veća u slabije razvijenim zemljama gdje je veća i raznolikost rotavirusnih genotipova (7).

Veliki udio netipabilnih sojeva također je tipičan za nerazvijene zemlje, a prema podacima Banyai-ja i suradnika (9) taj udio iznosi i do 12.9%, za razliku od npr. Europe gdje je njihova zastupljenost oko 3%. U ovom istraživanju G ili P netipabilni sojevi činili su manje od 2% uzoraka, što je slično europskim podacima (9). Smatra se da netipabilni sojevi vjerojatno predstavljaju neobične ili čak nove rotavirusne genotipove koji se ne mogu detektirati setom početnica koje su dio protokola za genotipizaciju (8).

U ovom istraživanju detektirane su značajne geografske razlike između pojedinih regija. Prevalencija najčešćeg genotipa G1P[8] bila je približno 20% viša, a prevalencija G2P[4] približno 20% niža u Sjevernoj nego u Središnjoj ili Južnoj Hrvatskoj. Humano-humani



reasortant G1P[4] bio je zastupljeniji u Sjevernoj Hrvatskoj, s prevalencijom 8% višom u odnosu na druge regije, a prevalencija G3P[8] bila je 10% viša u Južnoj Hrvatskoj nego u drugim regijama. Ovo opažanje u skladu je s rezultatima brojnih prethodnih istraživanja koja su pokazala da postoje značajne geografske razlike u distribuciji genotipova između kontinenata, pojedinih zemalja, ali i regija unutar iste zemlje (8,9,15).

Iz svega navedenog slijedi da u Hrvatskoj postoje značajne geografske i vremenske (u odnosu na prethodno istraživanje) (89) razlike u distribuciji rotavirusnih genotipova. Razlozi za stalnu pojavu novih genotipova nisu do kraja razjašnjeni, ali mogući mehanizmi uključuju stalne točkaste mutacije rotavirusne RNA, genetski reasortment (izmjena RNA segmenata između različitih humanih genotipova koji inficiraju istog domaćina), zatim duplikacije, delecije ili insercije sekvenci unutar rotavirusnih gena (genetsko preslagivanje) te u konačnici međuvrtni prijenos, odnosno međuvrtni reasortment (nakon direktne zoonotske transmisije) (7). Primjeri pojave novih genotipova u zadnjim desetljećima su brojni, a uključuju globalno širenje G9P[8] i G9P[6] te G12 (uglavnom u kombinaciji s P[8] ili P[6] (9), ili regionalno širenje G8P[6] i G8P[8] u Africi (9).

EuroRotaNet osnovan je u siječnju 2007. g. s ciljem prikupljanja podataka o rotavirusnim genotipovima iz (trenutno) 13 europskih zemalja te omogućava kontinuirano praćenje distribucije genotipova u Europi ili eventualne pojave novih, što je od posebnog značaja u postvakcinalnom razdoblju (56). Prema posljednjem izvješću EuroRotaNet-a iz 2021.g., postoje značajne razlike u distribuciji genotipova između različitih zemalja, no ukupno najčešći genotip je G3P[8], dok udio G1P[8] kontinuirano pada od 2015./2016. g. No, i dalje udio prevakcinalno „čestih“ genotipova G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8] ostaje ukupno 90% 2021. g. U razdoblju 2006.-2020. pojavilo se nekoliko (re)emergentnih genotipova u Europi: G8P[8], G8P[4], G12P[8] i G9P[4], od kojih su neki postali dominantni u određenim zemljama (npr. G12P[8] u Italiji) (56). Trenutno nema dokaza da zbog utjecaja cjepiva dolazi do zamjene genotipova, premda je u nekim zemljama uočen tranzitorni porast prevalencije G2P[4] u ranom postvakcinalnom razdoblju nakon uvođenja RV1 (256). Hrvatska nije dio EuroRotaNet-a, no bit će svakako potreban nadzor nad cirkulirajućim rotavirusnim genotipovima i praćenje eventualne zamjene dominantnih genotipova.

Od 2006. g. odobrena su dva rotavirusna cjepiva: peterovalentno (G1, G2, G3, G4, P[8]) humano-bovino reasortno cjepivo (RV5, RotaTeq), i monovalentno (G1P[8]) humano cjepivo (RV1, Rotarix), te su preporučena od 2009. g. za uvođenje u NIP-ove svih zemalja svijeta (17). Dodatno, 2018. g. još su dva cjepiva dodana na SZO listu prekvalificiranih cjepiva – Rotavac koji sadržava humani G9P[11] soj, i Rotasiil, peterovalentno (G1, G2, G3, G4, G9) reasortno humano-bovino cjepivo (18). Dosad je više od 100 zemalja uvelo rotavirusno cjepivo u NIP (253). Prema posljednjim preporukama SZO-a iz 2021. g., nema preferencije za pojedino cjepivo te odabir ovisi isključivo o dostupnosti, cijeni i preferencijama pojedinih država (250). U europskim zemljama zasad se koriste RV1 i RV5 (56).

Ako promatramo prevalencije pojedinih genotipova u ovom istraživanju, RV1 bi u Hrvatskoj „pokrio“ 61.9% homotipnih genotipova (isti G i P-tip genotipa i cijepnog virusa) (57.2% u Središnjoj, 76.6% u Sjevernoj te 63.9% u Južnoj Hrvatskoj). Ako promatramo parcijalno heterotipne genotipove (isti G ili P-tip genotipa i cijepnog virusa), RV1 bi „pokrio“ 67.5% G-tipova i 75.6% P-tipova. S druge strane, RV5 u Hrvatskoj bi „pokrio“ 69,7% homotipnih genotipova (G1, G2, G3 ili G4 + P[8]). Ako se uzmu u obzir parcijalno heterotipni genotipovi, RV5 bi pokrio čak 96.4% genotipa s istim G-tipom i 75.6% genotipova s istim P-tipom. Klinička istraživanja faze III pokazala su veliku učinkovitost obaju cjepiva u prevenciji teških oblika RVGE, no zaštita je bila najveća protiv homotipnih genotipova (156,228). Primjerice, učinkovitost RV1 u prevenciji teških oblika potpuno heterotipnog G2P[4] RVGE bila je samo 45% (228). No, postmarketinške studije iz zemalja s visokim i srednje visokim prihodima pokazale su da je učinkovitost RV1 i RV5 slična u prevenciji homotipnih i heterotipnih RVGE. Prema meta-analizi Leshema i suradnika (267) učinkovitost RV1 u prevenciji homotipnih RVGE u zemljama s visokom prihodima bila je 94%, a u prevenciji u potpunosti heterotipnih genotipova čak 87%. U zemljama sa srednje visokim prihodima učinkovitost je bila niža, 59% u prevenciji homotipnih RVGE, odnosno 47% u prevenciji potpuno heterotipnih RVGE. Slični su rezultati za RV5: učinkovitost cjepiva u prevenciji RVGE uzrokovanog homotipnim sojevima bila je 83%, a heterotipnim 75% u zemljama s visokim prihodima, dok su u zemljama sa srednje visokim prihodima učinkovitosti manje, no i dalje neznatno različite za homotipne i heterotipne genotipove. Međutim, nedostaju podaci o učinkovitosti cjepiva prema točno određenim genotipovima, kao i podaci iz slabije

razvijenih zemalja, a bit će svakako potrebno pratiti učinkovitost cjepiva u prevenciji RVGE uzrokovanog emergentnim genotipovima (267).

U ovom istraživanju nije bilo značajnije razlike u dobnoj distribuciji genotipova, što je slično podacima iz drugih studija (268–270). No, treba istaknuti zapažanja iz prethodnog istraživanja u Hrvatskoj (89) gdje je G8, koji se 2006. godine pojavio kao emergentni G-tip, bio češći među mlađom djecom. Čak 38% G8 infekcija zabilježeno je u dobi <1 godine. Slično je bilo s tipom G9 koji je u Bugarskoj bio emergentni tip, detektiran u gotovo 37% uzoraka, od kojih je 59% bilo u dobi <1 godine. Slični su rezultati Hungerforda i suradnika koji su detaljnije analizirali dobnu distribuciju gotovo 40 000 rotavirusnih genotipova prikupljenih preko EuroRotaNet-a (2007.-2013.) i gdje su dojenčad 0-11 mjeseci češće imala infekcije „neubičajenim“ genotipovima, kao i miješanim ili netipabilnim genotipovima (87). U Indiji je također zabilježen sličan trend u multicentričnom istraživanju Girija i suradnika koje je obuhvatilo razdoblje 2005.-2016. i gotovo 30 000 rotavirusnih uzoraka: „neubičajeni“ genotipovi, kao i miješani i netipabilni bili su značajno češći u dobnoj skupini 0-11 mjeseci (271). Potencijalno objašnjenje za veću učestalost ovih infekcija u dojenačkoj dobi moglo bi biti odsustvo majčinih neutralizirajućih protutijela na nove genotipove, kao i odsustvo eventualne heterotipne zaštite stečene nakon izloženosti drugim rotavirusnim genotipovima, a koja je prisutna kod starije djece (89). Rezultati ovog istraživanja ne pokazuju gore navedene razlike u dobnoj distribuciji genotipova, moguće zbog relativno malog broja infekcija „novim“, miješanim ili netipabilnim genotipovima.

Bolničke (nozokomijalne) rotavirusne infekcije odgovorne su za oko 25% svih hospitalizacija zbog RVGE (169), uzrokuju značajno produljenje hospitalizacije i ekonomske troškove (167). Prema dosadašnjim spoznajama, nema značajnije razlike u distribuciji genotipova između NRV AGE i domicilnih RVGE (174,180,272). Iznimka su novorođenačke NRV AGE za koje je tipična ograničena raznolikost cirkulirajućih genotipova (273), kao i „neubičajeni“ rotavirusni genotipovi poput G9P[11] i G10P[11] (100), a identificirani su još G4P[6], G8P[6], G4P[8], G12P[6] – različiti u različitim dijelovima svijeta (273). Primjerice, između 1988. i 2016.g., G10P[11] bio je jedini cirkulirajući rotavirusni genotip na novorođenačkim odjelima i jedinicama intenzivnog

liječenja u Južnoj Indiji (273). NRV AGE u novorođenčadi uglavnom su blage ili asimptomatske, pružaju zaštitu od narednih RVGE, a te su činjenice iskorištene i u proizvodnji cjepiva Rotavac (242).

U ovom istraživanju podaci o bolničkim i domicilnim RVGE potpuni su jedino za Zagreb, tj. Središnju Hrvatsku (90% domicilne infekcije, a 10% bolničke), dok su podaci za ostale centre, pogotovo za Sjevernu Hrvatsku, dijelom manjkavi, pa se ne može sa sigurnošću zaključivati o eventualnoj razlici u distribuciji genotipova za ta dva tipa infekcija. No, kod G2P[4] podaci nedostaju samo za dva djeteta, pa možemo zaključiti da je vrlo vjerojatno taj tip u ovom istraživanju češći među domicilnim (23%), nego bolničkim infekcijama (14%). Također, u ovom istraživanju nisu zabilježene epidemije neuobičajenim genotipovima među novorođenčadi, kao što je opisano u gore navedenim studijama (100,273,274).

U zemljama s umjerenom klimom rotavirusne infekcije tipično su sezonske, s vrhuncem broja slučajeva u hladnijim zimskim mjesecima, dok je u tropskim područjima bolest cjelogodišnja, bez izraženog sezonstva (50). Sukladno tomu, u Europi je u većini zemalja izraženo sezonstvo, a najveći broj slučajeva bilježi se u zimu i proljeće. U razdoblju između 2010. i 2019. g. prosječan vrhunac incidencije bio je u ožujku. Također je tipično „širenje“ epidemije od juga prema sjeveru i od zapada prema istoku, odnosno na jugu i zapadu Europe vrhunac epidemije je u kasnu zimu/rano proljeće, a na sjeveru i istoku u proljeće (travanj/svibanj) (56). No, neke europske zemlje, poput Bugarske, unatoč umjerenj klimi, nemaju izraženo sezonstvo rotavirusne infekcije, nego je bolest cjelogodišnja (275). Prema rezultatima ovog istraživanja, RVGE u Hrvatskoj ima izraženo sezonstvo u svim promatranim regijama, a vrhunac incidencije je u zimskim i ranim proljetnim mjesecima. Sveukupno, najveći broj slučajeva zabilježen je u siječnju i veljači, a prema regijama u Središnjoj Hrvatskoj u veljači, u Sjevernoj u siječnju, a u Južnoj Hrvatskoj u ožujku. Pratio se također jasan „kvadratični“ trend raspodjele slučajeva, s padom od siječnja/veljače prema ljetnim mjesecima, a zatim blagi porast. Isti trend zabilježen je po centrima, dobnim skupinama (mlađi od 12 mjeseci i stariji od 12 mjeseci) te po dobnoj-skupini-po centru.

Zanimljivo je pratiti sezonske trendove RVGE nakon uvođenja cjepiva u NIP. U većini europskih zemalja koje imaju visok cijepni obuhvat (~90%) sezonstvo je i dalje izraženo,

no prati se „pomak“ sezone, uz značajno smanjenje broja slučajeva (276,277). Primjerice, u Austriji je nakon uvođenja cjepiva vrhunac rotavirusne sezone pomaknut na travanj i svibanj (277), a u Belgiji prosječno za 5-8 tjedana u usporedbi s prevakcinalnim razdobljem (276). U SAD-u, u kojem je cijepni obuhvat niži (70-75% dojenčadi) također je zabilježena „odgoda“ sezone za 8-15 tjedana, kraće trajanje sezonskog vrhunca (14 tjedana, u usporedbi s 26 tjedana u prevakcinalnom razdoblju), kao i značajno smanjenje intenziteta epidemija. No, zabilježen je i jedinstveni bianualni ciklus, gdje se izmjenjuju sezona relativno niske cirkulacije virusa, sa sezonom intenzivnijeg porasta broja slučajeva (278,279). To se objašnjava relativno niskim cijepnim obuhvatom zbog kojeg u sezoni niske cirkulacije rotavirusa dolazi do povećanja broja na virus osjetljive neimunizirane djece te posljedično povećanja broja oboljelih u narednoj sezoni (278). Pretpostavljeno je da bi povećanje cijepnog obuhvata na barem 85% dojenčadi prekinulo taj bianualni ciklus i dodatno smanjilo incidenciju bolesti (280).

Ako se promatra distribucija genotipova tijekom godine u ovom istraživanju, najzastupljeniji tipovi G1[P8] i G2[P4], kao i neki drugi rjeđi genotipovi (G1[P4], G2[P8] te „miješani“ genotipovi) također su „pratili“ obrazac većeg broja početkom kalendarske godine, tj. u zimskim mjesecima, uz pad apsolutnog broja i relativnog udjela u ukupnom njihovom broju prema ljetnim mjesecima, pa blagi porast tijekom jeseni. S druge strane, neki drugi genotipovi imali su određene specifičnosti. Primjerice, G9[P8] zabilježen je isključivo u proljetnim i ljetnim mjesecima – niti jedan slučaj tog genotipa nije zabilježen zimi ili u jesen. Zanimljive su, nadalje, promjene udjela pojedinih genotipova ovisno o godišnjem dobu. Naime, u svakom godišnjem dobu najzastupljeniji je bio genotip G1[P8], no njegov udio u ukupnom broju je opadao od oko 71% zimi do oko 33% ljeti. G2[P4] uvijek je bio drugi najzastupljeniji genotip, ali mu je udio rastao od oko 18% zimi do 32% ljeti. Na G9[P8] ljeti je otpadalo oko 10% svih genotipova i oko 5% u proljeće, a u drugim godišnjim dobima nije zabilježen. Ovi rezultati velikim dijelom se poklapaju sa zapažanjima u već opisanom istraživanju Hungerforda i suradnika koji su detaljno analizirali dobnu i sezonsku distribuciju gotovo 40 000 rotavirusnih genotipova prikupljenih preko EuroRotaNet-a (2007.-2013.) (87) i koji su pokazali da postoje značajne razlike u distribuciji genotipova u sezoni i izvan sezone. Genotip G1[P8], koji je sveukupno bio najčešći genotip, bio je dominantan u sezoni (tj. u zimskim i proljetnim

mjesecima), dok je njegov udio padao izvan sezone. Također, udio genotipova tzv. DS-1-*like* konstelacije (G2[P4] i G8[P4]), „neobičajenih“ genotipova te miješanih i netipabilnih genotipova također je značajno rastao izvan sezone. Pretpostavljeno je da se na G1[P8], koji je s obzirom na najveću učestalost vjerojatno bolje prilagođen na čovjeka i lakše se prenosi te stoga dominira u sezoni, do kraja sezone akumulira homotipna imunost, pada udio potencijalnih domaćina te se istovremeno „omogućava“ drugim, manje čestim genotipovima da izazovu bolest (87).

Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja RVGE ima teži tijek u odnosu na AGE uzrokovan drugim infektivnim uzročnicima (151,155). Da bi se procijenio „teret“ bolesti u populaciji, kao i potencijalna korist terapijskih ili preventivnih mjera (cijepjenja), koriste se različite ocjenske ljestvice za procjenu težine RVGE. Njihova svrha, dakle, nije procjena stupnja dehidracije i potrebe za različitim terapijskim intervencijama (153). Najpoznatije ocjenske ljestvice su Vesikarijeva (0-20 bodova), koja se i najviše koristi (151), i Clarkova (0-24 boda), koja se koristi nešto rjeđe (152). S obzirom da ove dvije ljestvice imaju različit broj kategorija (Vesikarijeva dvije: teška i „ne-teška“ bolest, a Clarkova tri: blaga, umjereno teška i teška bolest), direktna usporedba ovih dviju ljestvica nije moguća (155). Nadalje, prema dosadašnjim istraživanjima, s obzirom da ove dvije ljestvice kvantificiraju isti fenomen (težinu simptoma) korelacija između ocjena na dvije ljestvice je visoka (158), kao što je slučaj i u ovom istraživanju. No, unatoč visokoj korelaciji podudarnost između numeričkih vrijednosti ocjena na dvije ljestvice zanemarivo je mala jer ljestvice drugačije boduju pojedine simptome i imaju drugačiji raspon. Drugim riječima, unatoč visokoj korelaciji, postoji velika varijabilnost u definiciji „teške“ bolesti između dviju ljestvica, kao što je već pokazano u prethodnim istraživanjima (155,158–160). U ovoj studiji rezultati su slični: prema Vesikarijevoj ljestvici 62.3% djece imalo je „tešku“ bolesti, a samo 4.8% prema Clarkovoj ljestvici. Nadalje, prema obje ljestvice nešto manje od 30% djece imalo je blagu, tj. „ne-tešku“ bolest, a samo 4.8% djece imalo je „tešku“ bolest. Givon-Lavi i suradnici te Aslan i suradnici pokušali su modificirati Vesikarijevu i Clarkovu ocjensku ljestvicu s ciljem povećanja korelacije među njima (155,159). Tako je Vesikarijeva ljestvica „pretvorena“ u ljestvicu s tri kategorije, pri čemu je ocjena <11 označavala blagu bolesti, 11-15 umjereno tešku, a ≥16 tešku bolest, te je omogućena

usporedba s Clarkovom ljestvicom. Na taj način blago je povećan stupanj korelacije između dviju ljestvica, ali ne značajno (155,159). S druge strane, u istim istraživanjima, Clarkova ljestvica je modificirana u ljestvicu s dvije kategorije, tako da je ocjena  $\leq 16$  označavala „ne-tešku“ bolest, a  $> 16$  tešku bolest te je omogućena usporedba s Vesikarijevom ljestvicom. Međutim, ova reklasifikacija je gotovo neznačajno povećala korelaciju između dviju ljestvica (155,159).

U ovom istraživanju napravljena je nešto drukčija modifikacija. Clarkova ljestvica podijeljena je u dvije kategorije: ocjena  $< 11$  kao „ne-teška“ bolest i ocjena  $\geq 11$  kao „teška“ bolest. Na taj način postignuta je puno bolja podudarnost ljestvica: 96.0% djece klasificirano kao „nije teža bolest“ po jednoj ljestvici – isto je tako klasificirano i po drugoj, a 75.0% djece klasificirano kao „teža bolest“ po jednoj ljestvici – isto je tako klasificirano i po drugoj ljestvici.

Iz svega navedenog slijedi da bi gore navedena modifikacija Clarkove ocjenske ljestvice bila prikladniji način bodovanja težine RVGE, no vjerojatno je u budućnosti potrebna bolja, preciznija i uniformna ljestvica za ocjenu težine kliničke slike RVGE, pogotovo kad je riječ o istraživanjima učinkovitosti cjepiva.

U ovom istraživanju G2P[8] genotip bio je združen s većim izgledima za teži RVGE, no radi se o malom uzorku (samo 22) pa je procjena neprecizna (granice pouzdanosti su jako široke). Trenutno dostupni podaci iz drugih istraživanja ne pokazuju konzistenciju u povezanosti određenog genotipa s težom kliničkom slikom. Primjerice, dva istraživanja iz Ujedinjenog Kraljevstva pokazala su da je G9 tip, koji se u vrijeme provođenja tih istraživanja tek pojavio u Ujedinjenom Kraljevstvu, bio povezan s većim rizikom za hospitalizaciju, odnosno za intravensku rehidraciju (281,282). Slični su podaci i iz Latinske Amerike gdje je u to vrijeme emergentni G9 tip imao veću Vesikarijevu ocjenu u odnosu na G1 tip te je bio povezan sa značajno dužim trajanjem i intenzitetom proljeva, dužim trajanjem povraćanja, višom stopom hospitalizacije i težom dehidracijom (283). U Indiji su također infekcije uzrokovane emergentnim G9 i G12 tipovima imale teži klinički tijek u odnosu na „uobičajene“ genotipove (284). Pretpostavljeno je da razlike u težini kliničke slike mogu biti posljedica intrinzičke razlike u virulenciji među pojedinim genotipovima, ali i posljedice „ulaska“ novog genotipa u populaciju. Na takve genotipove, naime, ne postoji prethodna imunost, kao niti majčina transplacentarno

prenesena protutijela pa se može očekivati teži tijekom infekcije (283,284). S druge strane, istraživanja u Italiji i SAD-u nisu pokazala povezanost određenog genotipa s težom kliničkom slikom, unatoč tomu što su neki bili novi u populaciji (285,286). Također, istraživanje Sowmyanarayananana i suradnika pokazalo je da nema značajnije razlike u Vesikarijevoj ocjeni između različitih genotipova, premda je, u suprotnosti s gore navedenim istraživanjima, ocjena za česte genotipove (G1P[8], G2P[4] i G9P[8]) bila nešto viša nego za druge genotipove.

U ovom istraživanju, s obzirom da G2P[8] genotip nije novi u Hrvatskoj i pretpostavlja se da na njega ipak postoji određena razina imunosti, vjerojatno i neki drugi čimbenici, poput čimbenika domaćina, u konačnici određuju kakvog će biti tijeka klinička slika, a ne samo genotip rotavirusa.

Podaci iz ovog istraživanja također pokazuju da djeca starija od 12 mjeseci imaju veći rizik za težu kliničku sliku. To je velikim dijelom u skladu s prethodnim istraživanjima Givon-Lavi i suradnika koji su pokazali da RVGE u dobi 6-23 mjeseca ima višu Vesikarijevu i Clarkovu ocjenu nego RVGE u dobi mlađoj od 6 mjeseci i starijoj od 23 mjeseca (155). U istraživanju Lorrota i suradnika djeca starija od 6 mjeseci također su imala višu Vesikarijevu ocjenu u odnosu na djecu mlađu od 6 mjeseci (165). Ovakva dobna distribucija težine kliničke slike je očekivana, s obzirom na zaštitu koju u ranoj dojenačkoj dobi pružaju tranplacentarno prenesena majčina protutijela, a u kasnijoj dobi homotipna i heterotipna imunost stečena nakon doticaja s rotavirusom (115).

Bolničke su rotavirusne infekcije u ovom istraživanju bile povezane s nižim rizikom za teži oblik bolesti od domicilnih. Jedno od vjerojatnih objašnjenja je dob NRV AGE koja je značajno manja u odnosu na dob domicilnih RVGE, s vrhuncem prevalencije u dobi 0-11 mjeseci, i najvećim brojem oboljelih u dobi <6 mjeseci, kad se i očekuje lakši tijek bolesti (168,178,179). Međutim, podaci u literaturi su raznoliki. Frühwirth i suradnici pokazali su da nema značajnije razlike u Vesikarijevoj ocjeni između domicilnih RVGE i NRV AGE (183), dok su u dva istraživanja oboljeli od NRV AGE imali manju stopu dehidracije nego oboljeli od domicilnih RVGE (184,185).

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Značajan udio imunokromatografski pozitivnih rotavirusnih uzoraka (16.0-30.9%, ovisno o centru) nije potvrđen PCR-om. S



obzirom da imunokromatografske metode dijagnostike rotavirusa imaju visoku osjetljivost i specifičnost u usporedbi s PCR-om (190–192), tako visok udio rotavirusnih infekcija koji nije potvrđen PCR-om ne može se objasniti samo lažno pozitivnim rezultatima. Vjerojatni razlozi su neadekvatno skladištenje ili transport uzoraka s posljedičnom destrukcijom virusne RNA ili premala količina uzorka nedovoljna za daljnju molekularnu analizu. Nadalje, nisu svi imunokromatografski pozitivni uzorci poslani na daljnju molekularnu analizu (1.0-28.4%), što je moglo utjecati na konačne rezultate istraživanja. I u konačnici, istraživanje je provedeno u većim bolničkim centrima koji nužno nisu reprezentativni za cijelu populaciju, kako u pogledu distribucije genotipova, tako i težine kliničke slike RVGE.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja predstavljaju prevakcinalne podatke bitne za odluku o uvođenju rotavirusnog cjepiva u NIP u Hrvatskoj. Visoka prevalencija „čestih“ genotipova koji bi najvećim dijelom bili „pokriveni“ trenutno dostupnim cjepivima u Europi, govori u prilog potencijalne velike koristi od cijepljenja. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja i nadzor nad cirkulirajućim rotavirusnim genotipovima da bi se detektirale eventualne promjene u prevalenciji ili pojava novih genotipova.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Detektirana je velika raznolikost G i P rotavirusnih tipova u Hrvatskoj, no G1 i P[8] bili su najčešći u svim regijama.
2. Prevalencija globalno najčešćih genotipskih kombinacija (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8]) bila je gotovo 89% ukupno te 81-95% među regijama, što je tipično za razvijene zemlje u prevakcinalnom razdoblju.
3. G1P[8] bio je najčešći genotip ukupno i u svim regijama, što je sukladno prevakcinalnim podacima iz drugih razvijenih zemalja.
4. Detektirana je visoka prevalencija humano-humanih reasortanata (7.7%).
5. Postoje regionalne razlike u distribuciji genotipova.
6. G6 tip prvi put se pojavio u Hrvatskoj.
7. Postoje vremenske promjene u prevalenciji rotavirusnih genotipova u odnosu na prethodno istraživanje u Hrvatskoj.
8. Potrebno je kontinuirano praćenje cirkulirajućih rotavirusnih genotipova kako bi se detektirale eventualne zamjene genotipova ili pojave novih genotipova.
9. Trenutno korištena cjepiva u Europi, RV1 i RV5, u Hrvatskoj bi pokrila 62%, odnosno 70% homotipnih genotipova.
10. Nije bilo razlike u dobnoj distribuciji rotavirusnih genotipova u Hrvatskoj.
11. Genotip G2P[4] bio je češći među domicilnim nego bolničkim rotavirusnim infekcijama.
12. RVGE u Hrvatskoj ima izraženo sezonsko, s vrhuncem broja slučajeva u zimskim i ranim proljetnim mjesecima.
13. Genotipovi G1[P8] i G2[P4] bili su najčešći genotipovi tijekom cijele godine i slijedili su kvadratični obrazac sezonske raspodjele.
14. Detektirane su sezonske promjene u udjelu G1[P8], G2[P4] i G9[P8], pri čemu je udio G1[P8] opadao ljeti, udio G2[P4] rastao ljeti, a G9[P8] detektiran je isključivo u proljeće i ljeto.
15. Vesikarijeva i Clarkova ocjenska ljestvica za procjenu težine kliničke slike značajno su se razlikovale u definiciji „teškog“ RVGE, pri čemu je Vesikarijeva ljestvica značajno veći broj bolesnika svrstavala u skupinu „teškog“ RVGE.

**16.** Modifikacija Clarkove ocjenske ljestvice na način da je podijeljena u dvije kategorije („ne-teška“ i teška bolest, s bodovima  $<11$ , odnosno  $\geq 11$ ) značajno je povećala korelaciju s Vesikarijevom ljestvicom.

**17.** Genotip G2P[8] bio je povezan s većim rizikom za teži tijek bolesti u odnosu na druge genotipove.

**18.** Domicilni RVGE imali su teži tijek u odnosu na bolničke RVGE.

**19.** Djeca starija od 12 mjeseci imala su veći rizik za teži tijek RVGE u odnosu na mlađe od 12 mjeseci.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Glavni cilj istraživanja bio je uvid u epidemiologiju rotavirusnih genotipova koji uzrokuju akutni gastroenteritis u djece mlađe od 5 godina u trima regijama u Republici Hrvatskoj (Središnja, Sjeverna i Južna Hrvatska). Specifični ciljevi obuhvaćali su određivanje udjela pojedinih genotipova, analizu mogućih geografskih, dobni i sezonskih razlika u distribuciji rotavirusnih genotipova, kao i analizu razlika u distribuciji genotipova između nozokomijalnih i domicilnih rotavirusnih infekcija. Također je procijenjena težina kliničke slike rotavirusnog gastroenteritisa pomoću Vesikarijeve i Clarkove ocjenske ljestvice za stupnjevanje težine bolesti te su analizirane moguće razlike u težini kliničke slike između pojedinih genotipova.

**Ispitanici i metode:** U istraživanje su uključena djeca mlađa od 5 g. s dijagnozom akutnog gastroenteritisa, liječena u tri hrvatske bolnice (Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, Klinički bolnički centar Split i Županijska bolnica Čakovec) tijekom dvije godine (srpanj 2012.- srpanj 2014.g.). Prikupljeni su demografski i klinički podaci te je učinjena imunokromatografska analiza stolice na Rotavirus i Adenovirus. Svi imunokromatografski rotavirus pozitivni uzorci dalje su analizirani (lančana reakcija polimerazom i sekvenciranje) radi određivanja genotipa rotavirusa. Na temelju prikupljenih kliničkih podataka izračunata je težina kliničke slike pomoću Vesikarijeve i Clarkove ocjenske ljestvice.

**Rezultati:** Među 822 genotipizirana rotavirusna uzorka udio globalno „čestih“ genotipskih kombinacija (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8]) bio je gotovo 89% ukupno te 81-95% među regijama. Najčešći genotip bio je G1P[8], ukupno (62%) i u svim regijama (57%, 64% i 77%). Prevalencija humano-humanih reasortanata bila je visoka (gotovo 8%), a G6 tip prvi put je opisan u Hrvatskoj. Nije bilo dobne razlike u distribuciji genotipova. Rotavirusna infekcija imala je izraženo sezonsko u zimskim i ranim proljetnim mjesecima, a udio G1[P8], G2[P4] i G9[P8] mijenjao se u sezoni i izvan sezone. Vesikarijeva ocjenska ljestvica značajno je veći udio ispitanika svrstavala u skupinu teškog RVGE. Genotip G2P[8] bio je povezan s većim rizikom za teži tijek bolesti u odnosu na druge genotipove. Domicilni RVGE imali su teži tijek u odnosu na

bolničke RVGE. Djeca starija od 12 mjeseci imala su veći rizik za teži tijek RVGE u odnosu na mlađe od 12 mjeseci.

**Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja predstavljaju prevakcinalne podatke bitne za odluku o uvođenju rotavirusnog cjepiva u nacionalni imunizacijski program u Hrvatskoj. Distribucija rotavirusnih genotipova u Hrvatskoj slična je distribuciji u drugim razvijenim zemljama u prevakcinalnom razdoblju, s visokom prevalencijom globalno „čestih“ genotipova koji bi najvećim dijelom bili „pokriveni“ trenutno dostupnim cjepivima u Europi. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja i nadzor nad cirkulirajućim rotavirusnim genotipovima da bi se detektirale eventualne promjene u prevalenciji ili pojava novih genotipova.

## 9. ABSTRACT

### **Distribution of rotavirus genotypes in three regions in Republic of Croatia, Maja Vrdoljak Pažur, 2024**

**Aims:** The general aim was to describe epidemiology of rotavirus genotypes in children <5 years in three Croatian regions. Specific aims were to determine prevalence of specific genotypes, possible geographical, age-dependent or seasonal differences in genotype distribution and to assess disease severity using Vesikari and Clark scales.

**Patients and methods:** The study was conducted among children <5 years with acute gastroenteritis from July 2012 to July 2014 at three hospitals in different Croatian geographical regions. Rotavirus was detected in stools using an immunocromatographic assay, followed by further molecular analysis. Clinical data were collected to calculate Vesikari and Clark scores.

**Results:** Genotyping of 822 rotaviruses showed that the predominant circulating strain was G1P[8], followed by G2P[4], G1P[4] and G3P[8]. There were significant geographical and seasonal, but no age-dependent differences in genotype distribution. Vesikari and Clark scoring systems varied greatly in categorization of severe disease. Genotype G2P[8], age >12 months and community-acquired rotavirus infections were associated with more severe disease.

**Conclusions:** This study represents pre-vaccination data that are important for decisions regarding immunization strategies in Croatia. High prevalence of „common“ rotavirus strains may advocate for rotavirus vaccine introduction, but further surveillance is necessary to monitor possible emergence of novel genotypes.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, i sur. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459–544.
2. Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner Jr RC, i sur. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(9):909–48.
3. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, i sur. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr*. 2018;172(10):958–65.
4. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, Agoos M, Serhan F, i sur. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clin Infect Dis*. 2016;62(Suppl 2):S96–105.
5. Rheingans RD, Heylen J, Giaquinto C. Economics of Rotavirus Gastroenteritis and Vaccination in Europe: What Makes Sense? *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(1):S48–55.
6. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, i sur. Recommendations for the classification of group a rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*. 2008;153(8):1621–9.
7. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Bányai K, Ramachandran M, i sur. Serotype Diversity and Reassortment between Human and Animal Rotavirus Strains: Implications for Rotavirus Vaccine Programs. *J Infect Dis*. 2005;192(Suppl 1):S146–59.
8. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. 2005;15(1):29–56.
9. Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EAS, Gentsch JR, i sur. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of

- rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012;30:A122–30.
10. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic Analyses of Rotavirus Genotypes G9 and G12 Underscore Their Potential for Swift Global Spread. *Mol Biol Evol*. 2010;27(10):2431–6.
  11. Cunliffe NA, Ngwira BM, Dove W, Thindwa BDM, Turner AM, Broadhead RL, i sur. Epidemiology of Rotavirus Infection in Children in Blantyre, Malawi, 1997–2007. *J Infect Dis*. 2010;202(Suppl 1):S168–74.
  12. Ansari S, Sherchand JB, Rijal BP, Parajuli K, Mishra SK, Dahal RK, i sur. Characterization of rotavirus causing acute diarrhoea in children in Kathmandu, Nepal, showing the dominance of serotype G12. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):114–20.
  13. Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment In Vivo: Driving Force for Diversity of Human Rotavirus Strains Isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol*. 2001;75(8):3696–705.
  14. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol*. 2004;31(4):259–65.
  15. Ogilvie I, Khoury H, El Khoury AC, Goetghebeur MM. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in central and eastern Europe: Serotype distribution and burden of illness. *Hum Vaccin*. 2011;7(5):523–33.
  16. Šimić I, Kovačević A, Krešić N, Škoko I, Konjik V, Guć JJ, i sur. Molekularne značajke i zoonotski potencijal rotavirusa. *Pediatr Croat*. 2019;63:63–70.
  17. World Health Organization (WHO). Rotavirus vaccines: an update. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;84(50):533–40.
  18. World Health Organization (WHO). WHO prequalified vaccines [Internet]. [pristupljeno 26.03.2019.]. Dostupno na: [https://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/PQ\\_vaccine\\_list\\_en/en/](https://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/PQ_vaccine_list_en/en/)
  19. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Provedbeni program imunizacije, seroprofilakse i kemoprofilakse za posebne skupine stanovništva i pojedince pod povećanim rizikom od: tuberkuloze, hepatitisa A i B, bjesnoće, žute groznice, kolere, trbušnog tifusa, tetanusa, malarije, streptokokne bolesti [Internet]. 2017 [pristupljeno 19.02.2019.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp->



content/uploads/2017/05/PROVEDBENI-PROGRAM-II.\_2017.pdf

20. Vesikari T, Van Damme P, Giaquinto C, Gray J, Mrukowicz J, Dagan R, i sur. European Society for Paediatric Infectious Diseases/European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition evidence-based recommendations for rotavirus vaccination in Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46(Suppl. 2):S38–48.
21. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Ranst M Van. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009;4(10):1303–16.
22. Dicker D, Nguyen G, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, i sur. Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392(10159):1684–735.
23. Black RE, Brown KH, Becker S, Alim ARMA, Huq I. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II. Incidence of diarrhea and association with known pathogens. *Am J Epidemiol.* 1982;115(3):315–24.
24. World Health Organization (WHO). WHO global invasive bacterial vaccine-preventable disease and rotavirus and pediatric surveillance networks bulletins [Internet]. [pristupljeno 08.03.2023.]. Dostupno na: [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/resources/NUVI/en/](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/resources/NUVI/en/)
25. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(2):136–41.
26. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(5):565–72.
27. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973;2(7841):1281–3.
28. Glass RI, Tate JE, Jiang B, Parashar U. The Rotavirus Vaccine Story: From

- Discovery to the Eventual Control of Rotavirus Disease. *J Infect Dis.* 2021;224(Suppl 4):S331–42.
29. Black R, Fontaine O, Lamberti L, Bhan M, Huicho L, El Arifeen S, i sur. Drivers of the reduction in childhood diarrhea mortality 1980-2015 and interventions to eliminate preventable diarrhea deaths by 2030. *J Glob Health.* 2019;9(2):1–9.
  30. Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global impact of rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children <5 years old: 2006-2019. *J Infect Dis.* 2020;222(10):1731–9.
  31. Aliabadi N, Antoni S, Mwenda JM, Weldegebriel G, Biey JNM, Cheikh D, i sur. Global impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus hospitalisations among children under 5 years of age, 2008-16: findings from the Global Rotavirus Surveillance Network. *Lancet Glob Heal.* 2019;7(7):e893–903.
  32. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, i sur. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017;390(10100):1151–210.
  33. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Results [Internet]. 2020 [pristupljeno 17.03.2023.]. Dostupno na: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>
  34. Glass RI, Parashar U, Patel M, Gentsch J, Jiang B. Rotavirus vaccines: successes and challenges. *J Infect.* 2014;68(Suppl 1):S9-18.
  35. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(4):134–47.
  36. The ROTA Council. The Epidemiology and Disease Burden of Rotavirus [Internet]. 2022 [pristupljeno 08.03.2023.]. Dostupno na: <https://preventrotavirus.org/wp-content/uploads/2022/04/ROTA-Brief3-Burden2022.pdf>
  37. Kotloff KL. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatr Clin North Am.* 2017;64(4):799–814.
  38. Cortese MM, Parashar UD. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2009;58(RR-2):1–25.
  39. Aidelsburger P, Grabein K, Böhm K, Dietl M, Wasem J, Koch J, et al. Cost-effectiveness of childhood rotavirus vaccination in Germany. *Vaccine.*

2014;32(17):1964–74.

40. Tran AN, Husberg M, Bennet R, Brytting M, Carlsson P, Eriksson M, i sur. Impact on affected families and society of severe rotavirus infections in Swedish children assessed in a prospective cohort study. *Infect Dis (London, England)*. 2018;50(5):361–71.
41. Van der Wielen M, Giaquinto C, Gothefors L, Huelsse C, Huet F, Littmann M, i sur. Impact of community-acquired paediatric rotavirus gastroenteritis on family life: data from the REVEAL study. *BMC Fam Pract*. 2010;11:22.
42. Marlow R, Finn A, Trotter C. Quality of life impacts from rotavirus gastroenteritis on children and their families in the UK. *Vaccine*. 2015;33(39):5212–6.
43. Sénécal M, Brisson M, Lebel MH, Yaremko J, Wong R, Gallant LA, i sur. Measuring the Impact of Rotavirus Acute Gastroenteritis Episodes (MIRAGE): A prospective community-based study. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008;19(6):397–404.
44. Ngabo F, Mvundura M, Gazley L, Gatera M, Rugambwa C, Kayonga E, i sur. The Economic Burden Attributable to a Child's Inpatient Admission for Diarrheal Disease in Rwanda. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149805.
45. Alkoshi S, Leshem E, Parashar UD, Dahlui M. Anticipating rotavirus vaccines – a pre-vaccine assessment of incidence and economic burden of rotavirus hospitalizations among children < 5 year of age in Libya, 2012-13. *BMC Public Health*. 2015;15(1):26.
46. Tate JE, Rheingans RD, O'Reilly CE, Obonyo B, Burton DC, Tornheim JA, i sur. Rotavirus disease burden and impact and cost-effectiveness of a rotavirus vaccination program in Kenya. *J Infect Dis*. 2009;200 Suppl:S76-84.
47. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, i sur. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1022–8.
48. Sanderson C, Clark A, Taylor D, Bolanos B. Global review of rotavirus morbidity and mortality data by age and region [Internet]. WHO SAGE Meeting. 2012 [pristupljeno 22.03.2023.]. str. 1-42. Dostupno na: [https://terrance.who.int/mediacentre/data/sage/SAGE\\_Docs\\_Ppt\\_Apr2012/7\\_session\\_rotavirus/Apr2012\\_session7\\_Sanderson\\_global\\_review\\_RV.pdf](https://terrance.who.int/mediacentre/data/sage/SAGE_Docs_Ppt_Apr2012/7_session_rotavirus/Apr2012_session7_Sanderson_global_review_RV.pdf)

49. Hasso-Agopsowicz M, Ladva CN, Lopman B, Sanderson C, Cohen AL, Tate JE, i sur. Global review of the age distribution of rotavirus disease in children aged <5 years before the introduction of rotavirus vaccination. *Clin Infect Dis*. 2019;69(6):1071–8.
50. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*. 1990;68(2):171–7.
51. Moe K, Shirley JA. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Arch Virol*. 1982;72(3):179–86.
52. Nakata S, Gatheru Z, Ukae S, Adachi N, Kobayashi N, Honma S, i sur. Epidemiological study of the G serotype distribution of group A rotaviruses in Kenya from 1991 to 1994. *J Med Virol*. 1999;58(3):296–303.
53. Mirzayeva R, Cortese MM, Mosina L, Biellik R, Lobanov A, Chernyshova L, i sur. Rotavirus burden among children in the newly independent states of the former union of soviet socialist republics: literature review and first-year results from the rotavirus surveillance network. *J Infect Dis*. 2009;200 Suppl:S203-14.
54. Flem ET, Kasymbekova KT, Vainio K, Gentsch J, Abdikarimov ST, Glass RI, i sur. Rotavirus infection in hospitalized children and estimates of disease burden in Kyrgyzstan, 2005-2007. *Vaccine*. 2009;27(Suppl 5):F35-9.
55. Pitzer VE, Viboud C, Lopman BA, Patel MM, Parashar UD, Grenfell BT. Influence of birth rates and transmission rates on the global seasonality of rotavirus incidence. *J R Soc Interface*. 2011;8(64):1584–93.
56. EuroRotaNet. EuroRotaNet: Annual report 2020 [Internet]. 2021 [pristupljeno 08.03.2023.]. Dostupno na: [https://www.eurorotnet.com/wp-content/uploads/2021/11/EuroRotaNet\\_report-2020\\_20211115\\_Final\\_v1.0.pdf](https://www.eurorotnet.com/wp-content/uploads/2021/11/EuroRotaNet_report-2020_20211115_Final_v1.0.pdf)
57. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, i sur. Rotavirus surveillance in europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J Infect Dis*. 2009;200 Suppl:S215-21.
58. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, i sur. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect*. 2011;139(6):895–909.

59. Pitzer VE, Viboud C, Simonsen L, Steiner C, Panozzo CA, Alonso WJ, i sur. Demographic variability, vaccination, and the spatiotemporal dynamics of rotavirus epidemics. *Science*. 2009;325(5938):290–4.
60. Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. 1963;141(3578):359–60.
61. Malherbe H, Harwin R. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *S Afr Med J*. 1963;37:407–11.
62. Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*. 1969;73:97–9.
63. Kindler E, Trojnar E, Heckel G, Otto PH, Johne R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol*. 2013;14:58–67.
64. ICTV. Rotavirus taxonomy [Internet]. 2021 [pristupljeno 24.03.2023.]. Dostupno na: <https://ictv.global/taxonomy>
65. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet (London, England)*. 1974;2(7872):61–3.
66. ICTV. Genus: Rotavirus [Internet]. [pristupljeno 24.03.2023.]. Dostupno na: <https://ictv.global/report/chapter/sedoreoviridae/sedoreoviridae/rotavirus>
67. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, i sur. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods*. 2014;209:30–4.
68. Joshi MS, Lole KS, Barve US, Salve DS, Ganorkar NN, Chavan NA, i sur. Investigation of a large waterborne acute gastroenteritis outbreak caused by group B rotavirus in Maharashtra state, India. *J Med Virol*. 2019;91(10):1877–81.
69. Trovão NS, Shepherd FK, Herzberg K, Jarvis MC, Lam HC, Rovira A, i sur. Evolution of rotavirus C in humans and several domestic animal species. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(5):546–57.
70. Dhama K, Saminathan M, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Kumar N, i sur. Avian rotavirus enteritis - an updated review. *Vet Q*. 2015;35(3):142–58.
71. Yinda CK, Ghogomu SM, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Vanhulle E, i sur. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H,

- bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey008.
72. Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, i sur. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(4):660–3.
  73. Phan TG, Leutenegger CM, Chan R, Delwart E. Rotavirus I in feces of a cat with diarrhea. *Virus Genes.* 2017;53(3):487–90.
  74. Bányai K, Kemenesi G, Budinski I, Földes F, Zana B, Marton S, i sur. Candidate new rotavirus species in Schreiber’s bats, Serbia. *Infect Genet Evol.* 2017;48:19–26.
  75. Pedley S, Bridger JC, Chasey D, McCrae MA. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J Gen Virol.* 1986;67(Pt 1):131–7.
  76. ICTV Study Group. Remove one species (Rotavirus E) from genus Rotavirus, family Reoviridae [Internet]. 2019 [pristupljeno 24.03.2023.]. Dostupno na: <https://ictv.global/filebrowser/download/5542>
  77. Estes M, Greenberg H. Rotaviruses. U: Knipe D, Howley P, ur. *Fields Virology.* 6. izd. Philadelphia: Wolters Kluwer, Health/Lippincott Williams&Wilkins; 2013. str. 1347–401.
  78. Palmarini M. Reoviridae. U: MacLachlan N, Dubovi E, ur. *Fenner’s Veterinary Virology.* 5. izd. Boston: Academic Press; 2017. str. 299–317.
  79. Svensson L, Sheshberadaran H, Vesikari T, Norrby E, Wadell G. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J Gen Virol.* 1987;68(Pt 7):1993–9.
  80. Ciarlet M, Estes M. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. U: Britton G, ur. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* New York: John Wiley & Sons; 2002. str. 2573–733.
  81. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, i sur. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol.* 2008;82(7):3204–19.
  82. RCWG. List of accepted genotypes by rotavirus Classification Working Group [Internet]. [pristupljeno 23.03.2023.]. Dostupno na:

<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>

83. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S43-8.
84. Todd S, Page NA, Duncan Steele A, Peenze I, Cunliffe NA. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S34-42.
85. Mwenda JM, Ntoto KM, Abebe A, Enweronu-Laryea C, Amina I, Mchomvu J, i sur. Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: preliminary results from the African Rotavirus Surveillance Network. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S5–11.
86. Kang G, Desai R, Arora R, Chitamabar S, Naik TN, Krishnan T, i sur. Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005-2009. *Vaccine.* 2013;31(27):2879–83.
87. Hungerford D, Vivancos R, Read JM, Pitzer VE, Cunliffe N, French N, i sur. In-season and out-of-season variation of rotavirus genotype distribution and age of infection across 12 European countries before the introduction of routine vaccination, 2007/08 to 2012/13. *Euro Surveill.* 2016;21(2).
88. Dóro R, Farkas SL, Martella V, Bányai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(11):1337–50.
89. Tcheremenskaia O, Marucci G, De Petris S, Ruggeri FM, Dovecar D, Ljubin Sternak S, i sur. Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2197–204.
90. Usonis V, Ivaskeviciene I, Desselberger U, Rodrigo C. The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. *Vaccine.* 2012;30(31):4596–605.
91. Matthijnssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(11):1347–54.
92. Zeller M, Rahman M, Heylen E, De Coster S, De Vos S, Arijs I, i sur. Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine

- introduction in Belgium. *Vaccine*. 2010;28(47):7507–13.
93. Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(1 Suppl):S30-41.
  94. Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*. 1996;225(1):181-90.
  95. Steyer A, Poljšak-Prijatelj M, Barlič-Maganja D, Marin J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 7):1690–8.
  96. Martella V, Bányai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):246–55.
  97. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):529–39.
  98. Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect*. 2004;48(4):289-302.
  99. Midgley SE, Bányai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, Jakab F, i sur. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol*. 2012;156(3-4):238-45.
  100. Iturriza Gómara M, Kang G, Mammen A, Jana AK, Abraham M, Desselberger U, i sur. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2541-7.
  101. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Tsuji T, Yoshikawa T, i sur. Reassortment of Human and Animal Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148416.
  102. Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:119–28.
  103. Keswick BH, Pickering LK, DuPont HL, Woodward WE. Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Appl Environ Microbiol*. 1983;46(4):813-6.
  104. Butz AM, Fosarelli P, Dick J, Cusack T, Yolken R. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics*. 1993;92(2):202-5.
  105. Hopkins RS, Gaspard GB, Williams FPJ, Karlin RJ, Cukor G, Blacklow NR. A



- community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *Am J Public Health*. 1984;74(3):263-5.
106. Dennehy PH, Nelson SM, Crowley BA, Saracen CL. Detection of Rotavirus RNA in Hospital Air Samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Pediatr Res*. 1998;43(4):143.
  107. Richardson S, Grimwood K, Gorrell R, Palombo E, Barnes G, Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet (London, England)*. 1998;351(9119):1844-8.
  108. Saxena K, Blutt SE, Ettayebi K, Zeng X-L, Broughman JR, Crawford SE, et al. Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology. *J Virol*. 2016;90(1):43-56.
  109. Tan M, Jiang X. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. *Expert Rev Mol Med*. 2014;16:e5.
  110. Arias CF, Silva-Ayala D, López S. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *J Virol*. 2015;89(2):890-3.
  111. Kambhampati A, Payne DC, Costantini V, Lopman BA. Host Genetic Susceptibility to Enteric Viruses: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(1):11-8.
  112. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol*. 2012;86(9):4833-43.
  113. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, et al. Rotavirus VP8\*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J Virol*. 2012;86(18):9899-910.
  114. Liu Y, Huang P, Jiang B, Tan M, Morrow AL, Jiang X. Poly-LacNAc as an age-specific ligand for rotavirus P[11] in neonates and infants. *PLoS One*. 2013;8(11):e78113.
  115. Omatola CA, Olaniran AO. Rotaviruses: From Pathogenesis to Disease Control-A Critical Review. *Viruses*. 2022;14(5):875.
  116. Hyams JS, Krause PJ, Gleason PA. Lactose malabsorption following rotavirus infection in young children. *J Pediatr*. 1981;99(6):916-8.
  117. Seo N-S, Zeng CQ-Y, Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Kim KJ, et al. Integrins

- alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):8811–8.
118. Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio*. 2010;1(5):e00265-10.
  119. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, i sur. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17083.
  120. Bialowas S, Hagbom M, Nordgren J, Karlsson T, Sharma S, Magnusson K-E, i sur. Rotavirus and Serotonin Cross-Talk in Diarrhoea. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159660.
  121. Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, i sur. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):e1002115.
  122. Blutt SE, Conner ME. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(1):39–43.
  123. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, i sur. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet (London, England)*. 2003;362(9394):1445–9.
  124. Hemming M, Huhti L, Räsänen S, Salminen M, Vesikari T. Rotavirus antigenemia in children is associated with more severe clinical manifestations of acute gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(4):366–71.
  125. Alfajaro MM, Cho K-O. Evidences and consequences of extra-intestinal spread of rotaviruses in humans and animals. *Virusdisease*. 2014;25(2):186–94.
  126. Rivero-Calle I, Gómez-Rial J, Martínón-Torres F. Systemic features of rotavirus infection. *J Infect*. 2016;72 Suppl:S98–105.
  127. Gilger MA, Matson DO, Conner ME, Rosenblatt HM, Finegold MJ, Estes MK. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr*. 1992;120(6):912–7.
  128. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1983;309(2):72–6.
  129. Raúl Velázquez F, Calva JJ, Lourdes Guerrero M, Mass D, Glass RI, Pickering

- LK, i sur. Cohort study of rotavirus serotype patterns in symptomatic and asymptomatic infections in Mexican children. *Pediatr Infect Dis J.* 1993;12(1):54–61.
130. Reves RR, Hossain MM, Midthun K, Kapikian AZ, Naguib T, Zaki AM, i sur. An observational study of naturally acquired immunity to rotaviral diarrhea in a cohort of 363 Egyptian children. Calculation of risk for second episodes using age-specific person-years of observation. *Am J Epidemiol.* 1989;130(5):981–8.
131. Kumar A, Vlasova AN, Deblais L, Huang H-C, Wijeratne A, Kandasamy S, i sur. Impact of nutrition and rotavirus infection on the infant gut microbiota in a humanized pig model. *BMC Gastroenterol.* 2018;18(1):93.
132. Dennehy PH, Cortese MM, Bégué RE, Jaeger JL, Roberts NE, Zhang R, i sur. A case-control study to determine risk factors for hospitalization for rotavirus gastroenteritis in U.S. children. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(12):1123–31.
133. Newman RD, Grupp-Phelan J, Shay DK, Davis RL. Perinatal risk factors for infant hospitalization with viral gastroenteritis. *Pediatrics.* 1999;103(1):E3.
134. Rayani A, Bode U, Habas E, Fleischhack G, Engelhart S, Exner M, i sur. Rotavirus infections in paediatric oncology patients: a matched-pairs analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(1):81–7.
135. Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken RH. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr.* 1980;97(1):61–5.
136. Wood DJ, David TJ, Chrystie IL, Totterdell B. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J Med Virol.* 1988;24(4):435–44.
137. Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet (London, England).* 1975;1(7901):242–6.
138. Carlson JA, Middleton PJ, Szymanski MT, Huber J, Petric M. Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child.* 1978;132(5):477–9.
139. Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Chanock RM, Kapikian AZ, i sur. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J Pediatr.* 1977;91(2):188–93.
140. Leung AKC, Kellner JD, Davies HD. Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther.* 2005;22(5):476–87.

141. Athiyah AF, Utsumi T, Wahyuni RM, Dinana Z, Yamani LN, Soetjipto, i sur. Molecular Epidemiology and Clinical Features of Rotavirus Infection Among Pediatric Patients in East Java, Indonesia During 2015-2018: Dynamic Changes in Rotavirus Genotypes From Equine-Like G3 to Typical Human G1/G3. *Front Microbiol.* 2019;10:940.
142. Quee FA, de Hoog MLA, Schuurman R, Bruijning-Verhagen P. Community burden and transmission of acute gastroenteritis caused by norovirus and rotavirus in the Netherlands (RotaFam): a prospective household-based cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):598–606.
143. Lopman B, Vicuña Y, Salazar F, Broncano N, Esona MD, Sandoval C, i sur. Household transmission of rotavirus in a community with rotavirus vaccination in Quininde, Ecuador. *PLoS One.* 2013;8(7):e67763.
144. Ueda H, Tajiri H, Kimura S, Etani Y, Hosoi G, Maruyama T, i sur. Clinical characteristics of seizures associated with viral gastroenteritis in children. *Epilepsy Res.* 2015;109:146–54.
145. Velázquez FR. Protective effects of natural rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3 Suppl):S54-6.
146. Desselberger U, Huppertz H-I. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis.* 2011;203(2):188–95.
147. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine.* 2006;24(15):2718–31.
148. Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikian AZ. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 1990;161(4):667–79.
149. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, i sur. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1602–9.
150. O’Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994;169(3):504–11.
151. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical

- scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis*. 1990;22(3):259–67.
152. Clark HF, Borian FE, Bell LM, Modesto K, Gouvea V, Plotkin SA. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis*. 1988;158(3):570–87.
  153. Freedman SB, Eltorky M, Gorelick M. Evaluation of a gastroenteritis severity score for use in outpatient settings. *Pediatrics*. 2010;125(6):e1278-85.
  154. Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi Y, Enoki M, Suzuki T, Kilgore PE. Incidence and burden of rotavirus gastroenteritis in Japan, as estimated from a prospective sentinel hospital study. *J Infect Dis*. 2005;192 Suppl:S106-10.
  155. Givon-Lavi N, Greenberg D, Dagan R. Comparison between two severity scoring scales commonly used in the evaluation of rotavirus gastroenteritis in children. *Vaccine*. 2008;26(46):5798–801.
  156. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, i sur. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 2006;354(1):23–33.
  157. Salinas B, Pérez Schael I, Linhares AC, Ruiz Palacios GM, Guerrero ML, Yarzabal JP, i sur. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(9):807–16.
  158. Sowmyanarayanan T V, Ramani S, Sarkar R, Arumugam R, Warier JP, Moses PD, i sur. Severity of rotavirus gastroenteritis in Indian children requiring hospitalization. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 1):A167-72.
  159. Aslan A, Kurugol Z, Cetin H, Karakaşlılar S, Koturoğlu G. Comparison of Vesikari and Clark scales regarding the definition of severe rotavirus gastroenteritis in children. *Infect Dis (London, England)*. 2015;47(5):332–7.
  160. Lewis KDC, Dallas MJ, Victor JC, Ciarlet M, Mast TC, Ji M, i sur. Comparison of two clinical severity scoring systems in two multi-center, developing country rotavirus vaccine trials in Africa and Asia. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 1):A159-66.
  161. Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind,

- placebo-controlled trial. *Lancet* (London, England). 2010;376(9741):606–14.
162. Zaman K, Dang DA, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ, i sur. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* (London, England). 2010;376(9741):615–23.
163. Sow SO, Tapia M, Haidara FC, Ciarlet M, Diallo F, Kodio M, i sur. Efficacy of the oral pentavalent rotavirus vaccine in Mali. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 1):A71-8.
164. Riera-Montes M, O’Ryan M, Verstraeten T. Norovirus and Rotavirus Disease Severity in Children: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37(6):501–5.
165. Lorrot M, Bon F, El Hajje MJ, Aho S, Wolfer M, Giraudon H, i sur. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(3):361–8.
166. Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith W, Kitchin N, i sur. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):55–62.
167. Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, Rodrigo C, Salman N, Mezner Z, i sur. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(1 Suppl):S12-21.
168. Stefkovicová M, Simurka P, Juracková L, Hudecková H, Mad’ar R. Nosocomial rotaviral gastroenteritis in paediatric departments. *Cent Eur J Public Health*. 2008;16(1):12–6.
169. Gervasi G, Capanna A, Mita V, Zaratti L, Franco E. Nosocomial rotavirus infection: An up to date evaluation of European studies. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(9):2413–8.
170. Languépin J, Doit C, Cézard JP, Bingen E, Navarro J. Pediatric nosocomial diarrhea. *Pathol Biol (Paris)*. 2000;48(8):764–9.
171. Maille L, Beby-Defaux A, Bourgoin A, Koulmann L, Eucher V, Cardona J, i sur. Nosocomial infections due to rotavirus and respiratory syncytial virus in pediatric wards: a 2-year study. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2000;58(5):601–6.

172. Gianino P, Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, Sartore M, Russo R, i sur. Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *J Hosp Infect.* 2002;50(1):13–7.
173. Ringenbergs ML, Davidson GP, Spence J, Morris S. Prospective study of nosocomial rotavirus infection in a paediatric hospital. *Aust Paediatr J.* 1989;25(3):156–60.
174. Román Riechmann E, Wilhelmi de Cal I, Cilleruelo Pascual ML, Calvo Rey C, García García ML, Sánchez-Fauquier A. Nosocomial gastroenteritis and asymptomatic rotavirus and astrovirus infection in hospitalized children. *An Pediatr (Barc).* 2004;60(4):337–43.
175. Samadi AR, Huq MI, Ahmed QS. Detection of rotavirus in handwashings of attendants of children with diarrhoea. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;286(6360):188.
176. Wilde J, Van R, Pickering L, Eiden J, Yolken R. Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1992;166(3):507–11.
177. Bruijning-Verhagen P, Quach C, Bonten M. Nosocomial rotavirus infections: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2012;129(4):e1011-9.
178. Forster J, Guarino A, Perez N, Moraga F, Román E, Mory O, i sur. Hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis among European children younger than 5 years of age. *Pediatrics.* 2009;123(3):e393-400.
179. Štefkovičová M, Litvová S, Šimurka P, Göczeová J, Gajdošíková A, Krištúfková Z. Rotavirus type profile in nosocomial and community infections in Western Slovakia. *Folia Microbiol (Praha).* 2015;60(2):177–81.
180. Ogilvie I, Khoury H, Goetghebeur MM, El Khoury AC, Giaquinto C. Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. *BMC Infect Dis.* 2012;12:62.
181. Berner R, Schumacher RF, Hameister S, Forster J. Occurrence and impact of community-acquired and nosocomial rotavirus infections--a hospital-based study over 10 y. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88(426):48–52.
182. Fourquet F, Desenclos JC, Maurage C, Baron S. Acute gastro-enteritis in children in France: estimates of disease burden through national hospital discharge data.

- Arch Pediatr. 2003;10(10):861–8.
183. Frühwirth M, Heininger U, Ehiken B, Petersen G, Laubereau B, Moll-Schüler I, i sur. International variation in disease burden of rotavirus gastroenteritis in children with community- and nosocomially acquired infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(8):784–91.
  184. Johansen K, Hedlund K-O, Zwegyberg-Wirgart B, Bennet R. Complications attributable to rotavirus-induced diarrhoea in a Swedish paediatric population: report from an 11-year surveillance. *Scand J Infect Dis*. 2008;40(11–12):958–64.
  185. Harrington M, Butler K, Cafferkey M. Rotavirus infection in hospitalised children: incidence and impact on healthcare resources. *Ir J Med Sci*. 2003;172(1):33–6.
  186. Jusot J-F, Vanhems P, Benzait F, Berthelot P, Patural H, Teyssier G, i sur. The procedures of hygiene to control hospital-acquired diarrhoea in paediatric wards: a multicentre audit. *J Hosp Infect*. 2004;57(1):44–51.
  187. Zerr DM, Allpress AL, Heath J, Bornemann R, Bennett E. Decreasing hospital-associated rotavirus infection: a multidisciplinary hand hygiene campaign in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(5):397–403.
  188. Yen C, Cortese MM. Rotaviruses. U: Long SS, Fischer M, Prober CG, ur. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 5. izd. Amsterdam: Elsevier; 2018. str. 1122–1125.e3.
  189. Dhiman S, Devi B, Singh K, Devi P. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatography for Rotavirus Detection in Children Below Five Years with Acute Gastroenteritis. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(9):DC06-9.
  190. De Grazia S, Bonura F, Pepe A, Li Muli S, Cappa V, Collura A, i sur. Performance analysis of two immunochromatographic assays for the diagnosis of rotavirus infection. *J Virol Methods*. 2017;243:50–4.
  191. González-Serrano L, Muñoz-Algarra M, González-Sanz R, Portero-Azorín MF, Amaro MJ, Higuera P, i sur. Viral gastroenteritis in hospitalized patients: Evaluation of immunochromatographic methods for rapid detection in stool samples. *J Clin Virol*. 2020;128:104420.
  192. Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KMG, Piralla A, Baldanti F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of



- gastrointestinal viral infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(1):110–1.
193. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol*. 2004;31(4):259–65.
  194. Martella V, Terio V, Arista S, Elia G, Corrente M, Madio A, et al. Nucleotide variation in the VP7 gene affects PCR genotyping of G9 rotaviruses identified in Italy. *J Med Virol*. 2004;72(1):143–8.
  195. Gómara MI, Cubitt D, Desselberger U, Gray J. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3796–8.
  196. Carossino M, Barrandeguy ME, Erol E, Li Y, Balasuriya UBR. Development and evaluation of a one-step multiplex real-time TaqMan(®) RT-qPCR assay for the detection and genotyping of equine G3 and G14 rotaviruses in fecal samples. *Virology*. 2019;16(1):49.
  197. Kottaridi C, Spathis AT, Ntova CK, Papaevangelou V, Karakitsos P. Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes. *J Virol Methods*. 2012;180(1–2):49–53.
  198. Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59(1):132–52.
  199. UpToDate. Acute viral gastroenteritis in children in resource-rich countries: Management and prevention [Internet]. 2022 [pristupljeno 23.05.2023.]. Dostupno na: [https://www.uptodate.com/contents/acute-viral-gastroenteritis-in-children-in-resource-rich-countries-management-and-prevention?search=rotavirus&topicRef=2681&source=see\\_link#](https://www.uptodate.com/contents/acute-viral-gastroenteritis-in-children-in-resource-rich-countries-management-and-prevention?search=rotavirus&topicRef=2681&source=see_link#)
  200. Shumetie G, Gedefaw M, Kebede A, Derso T. Exclusive breastfeeding and rotavirus vaccination are associated with decreased diarrheal morbidity among under-five children in Bahir Dar, northwest Ethiopia. *Public Health Rev*. 2018;39(1):28.
  201. Krawczyk A, Lewis MG, Venkatesh BT, Nair SN. Effect of Exclusive Breastfeeding

- on Rotavirus Infection among Children. *Indian J Pediatr.* 2016;83(3):220–5.
202. World Health Organization (WHO). The treatment of diarrhoea [Internet]. 2005 [pristupljeno 23.05.2023.]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9241593180>
203. Tate JE, Patel MM, Steele AD, Gentsch JR, Payne DC, Cortese MM, i sur. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(4):395–407.
204. Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ, Lund JS, Mermelstein N, Bishop RF, i sur. Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol.* 1990;28(6):1367–74.
205. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1678–84.
206. Institute of Medicine. The prospects of immunizing against rotavirus. U: New vaccine development: diseases of importance in developing countries. Washington, DC: National Academy Press; 1986.
207. Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, André FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet (London, England).* 1984;1(8384):977–81.
208. Senturia YD, Peckham CS, Cordery M, Chrystie IA, Banatvala JE, André FE. Live attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet.* 1987;330(8567):1091–2.
209. Bernstein DI, Smith VE, Sander DS, Pax KA, Schiff GM, Ward RL. Evaluation of WC3 Rotavirus Vaccine and Correlates of Protection in Healthy Infants. *J Infect Dis.* 1990;162(5):1055–62.
210. Georges-Courbot MC, Monges J, Siopathis MR, ROUNGOU JB, Gresenguet G, Belec L, i sur. Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. *Res Virol.* 1991;142(5):405–11.
211. Clark H, Offit P, Glass R, Ward R. Rotavirus vaccines. U: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, ur. *Vaccines.* 4. izd. Philadelphia, PA: Elsevier; 2001. str. 1327–45.
212. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Arch Virol Suppl.*

1996;12:163–75.

213. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Pérez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl:S65-72.
214. Pérez-Schael I, Guntiñas MJ, Pérez M, Pagone V, Rojas AM, González R, i sur. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med.* 1997;337(17):1181–7.
215. Bernstein DI, Glass RI, Rodgers G, Davidson BL, Sack DA. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *JAMA.* 1995;273(15):1191–6.
216. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. *MMWR Recomm Rep.* 1999;48:1–20.
217. Murphy T V, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, i sur. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2001;344(8):564–72.
218. Peter G, Myers MG. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop. *Pediatrics.* 2002;110(6):e67.
219. Simonsen L, Viboud C, Elixhauser A, Taylor RJ, Kapikian AZ. More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. *J Infect Dis.* 2005;192 Suppl:S36-43.
220. Rothman KJ, Young-Xu Y, Arellano F. Age dependence of the relation between reassortant rotavirus vaccine (RotaShield) and intussusception. *J Infect Dis.* 2006;193(6):898
221. World Health Organization (WHO). Report of the Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 1--2 December, 2005. *Wkly Epidemiol Rec.* 2006;81(2):15–9.
222. Centers for Disease Control and Prevention. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999;48:1007.
223. Weijer C. The future of research into rotavirus vaccine. *BMJ.* 2000;321(7260):525-6.
224. Robinson CG, Hernanz-Schulman M, Zhu Y, Griffin MR, Gruber W, Edwards KM.

- Evaluation of anatomic changes in young children with natural rotavirus infection: is intussusception biologically plausible? *J Infect Dis.* 2004;189(8):1382–7.
225. Heaton PM, Goveia MG, Miller JM, Offit P, Clark HF. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. *J Infect Dis.* 2005;192 Suppl:S17-21.
226. Patel MM, Glass R, Desai R, Tate JE, Parashar UD. Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure? *Lancet Infect Dis.* 2012;12(7):561–70.
227. De Vos B, Vesikari T, Linhares AC, Salinas B, Pérez-Schael I, Ruiz-Palacios GM, *i sur.* A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(10 Suppl):S179-82.
228. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, *i sur.* Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006;354(1):11–22.
229. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, *i sur.* Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet.* 2007;370(9601):1757–63.
230. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):198–208.
231. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, *i sur.* Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med.* 2010;362(4):289–98.
232. Patel M, Shane AL, Parashar UD, Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl(01):S39-48.
233. Hungerford D, Smith K, Tucker A, Iturriza-Gómara M, Vivancos R, McLeonard C, *i sur.* Population effectiveness of the pentavalent and monovalent rotavirus vaccines: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1-19.
234. Schwartz LM, Halloran ME, Rowhani-Rahbar A, Neuzil KM, Victor JC. Rotavirus vaccine effectiveness in low-income settings: An evaluation of the test-negative

design. *Vaccine*. 2017;35(1):184–90.

235. Haber P, Patel M, Pan Y, Baggs J, Haber M, Museru O, i sur. Intussusception after rotavirus vaccines reported to US VAERS, 2006-2012. *Pediatrics*. 2013;131(6):1042–9.
236. Buttery JP, Danchin MH, Lee KJ, Carlin JB, McIntyre PB, Elliott EJ, i sur. Intussusception following rotavirus vaccine administration: Post-marketing surveillance in the National Immunization Program in Australia. *Vaccine*. 2011;29(16):3061–6.
237. Patel MM, López-Collada VR, Bulhões MM, De Oliveira LH, Bautista Márquez A, Flannery B, i sur. Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *N Engl J Med*. 2011;364(24):2283–92.
238. Velázquez FR, Colindres RE, Grajales C, Hernández MT, Mercadillo MG, Torres FJ, i sur. Postmarketing surveillance of intussusception following mass introduction of the attenuated human rotavirus vaccine in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(7):736–44.
239. Oberle D, Jenke AC, von Kries R, Mentzer D, Keller-Stanislawski B. Rotavirus vaccination: a risk factor for intussusception? *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2014;57(2):234–41.
240. Pollard SL, Malpica-Llanos T, Friberg IK, Fischer-Walker C, Ashraf S, Walker N. Estimating the herd immunity effect of rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2015;33(32):3795–800.
241. Velasquez-Portocarrero DE, Wang X, Cortese MM, Snider CJ, Anand A, Costantini VP, i sur. Head-to-head comparison of the immunogenicity of RotaTeq and Rotarix rotavirus vaccines and factors associated with seroresponse in infants in Bangladesh: a randomised, controlled, open-label, parallel, phase 4 trial. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(11):1606–16.
242. Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis*. 1993;168(2):282–7.
243. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, John J, Antony K, Taneja S, i sur. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*.

- 2014;383(9935):2136–43.
244. Kulkarni PS, Desai S, Tewari T, Kawade A, Goyal N, Garg BS, i sur. A randomized Phase III clinical trial to assess the efficacy of a bovine-human reassortant pentavalent rotavirus vaccine in Indian infants. *Vaccine*. 2017;35(45):6228–37.
  245. Isanaka S, Guindo O, Langendorf C, Matar Seck A, Plikaytis BD, Sayinzoga-Makombe N, i sur. Efficacy of a Low-Cost, Heat-Stable Oral Rotavirus Vaccine in Niger. *N Engl J Med*. 2017;376(12):1121–30.
  246. Bhan MK, Glass RI, Ella KM, Bhandari N, Boslego J, Greenberg HB, i sur. Team science and the creation of a novel rotavirus vaccine in India: a new framework for vaccine development. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9935):2180–3.
  247. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT, Nguyen THA, Nguyen DM, Yuhuan W, i sur. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 1):A114-21.
  248. Kirkwood CD, Steele AD. Rotavirus Vaccines in China: Improvement Still Required. *JAMA Netw open*. 2018;1(4):e181579.
  249. Vetter V, Gardner RC, Debrus S, Benninghoff B, Pereira P. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals. *Hum Vaccin Immunother*. 2022;18(1):1870395.
  250. World Health Organization (WHO). Rotavirus vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2021;96(28):301–20.
  251. World Health Organization (WHO). Rotavirus vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88(5):49–64.
  252. Vesikari T, Van Damme P, Giaquinto C, Dagan R, Guarino A, Szajewska H, i sur. European Society for Paediatric Infectious Diseases consensus recommendations for rotavirus vaccination in Europe: update 2014. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(6):635–43.
  253. The ROTA Council. Rotavirus Vaccine Introduction and Coverage [Internet]. 2022 [pristupljeno 08.03.2023.]. Dostupno na: [https://preventrotavirus.org/wp-content/uploads/2022/04/ROTA-Brief1-Introduction\\_2022-1.pdf](https://preventrotavirus.org/wp-content/uploads/2022/04/ROTA-Brief1-Introduction_2022-1.pdf)
  254. GAVI. GAVI Alliance press release: GAVI Alliance will finance rotavirus vaccine in

- world's poorest countries. [Internet]. 2006 [pristupljeno 14.05.2023.]. Dostupno na: <https://www.gavi.org/news/media-room/gavi-alliance-will-finance-rotavirus-vaccines-worlds-poorest-countries>
255. Mphahlele MJ, Groome MJ, Page NA, Bhagwandin N, Mwenda JM, Steele AD. A decade of rotavirus vaccination in Africa - Saving lives and changing the face of diarrhoeal diseases: Report of the 12(th) African Rotavirus Symposium. *Vaccine*. 2021;39(17):2319–24.
  256. Bibera GL, Chen J, Pereira P, Benninghoff B. Dynamics of G2P[4] strain evolution and rotavirus vaccination: A review of evidence for Rotarix. *Vaccine*. 2020;38(35):5591–600.
  257. EuroRotaNet. EuroRotaNet: Annual report 2018 [Internet]. 2019 [pristupljeno 17.05.2023.]. Dostupno na: [https://www.eurorotnet.com/wp-content/uploads/2019/09/EuroRotaNet\\_report-Sept\\_2019\\_v1.pdf](https://www.eurorotnet.com/wp-content/uploads/2019/09/EuroRotaNet_report-Sept_2019_v1.pdf)
  258. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, i sur. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(6):1365–73.
  259. Zou G. A Modified Poisson Regression Approach to Prospective Studies with Binary Data. *Am J Epidemiol*. 2004;159(7):702–6.
  260. Newcombe RG. MOVER-R confidence intervals for ratios and products of two independently estimated quantities. *Stat Methods Med Res*. 2016;25(5):1774–8.
  261. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(4):561–70.
  262. Steele AD, Madhi SA, Cunliffe NA, Vesikari T, Phua KB, Lim FS, i sur. Incidence of rotavirus gastroenteritis by age in African, Asian and European children: Relevance for timing of rotavirus vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(9):2406–12.
  263. Dóro R, László B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, i sur. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect Genet Evol*. 2014;28:446–61.
  264. Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, i sur. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol*.

1987;25(9):1757–62.

265. Bányai K, Gentsch JR, Glass RI, Új M, Mihály I, Szücs G. Eight-Year Survey of Human Rotavirus Strains Demonstrates Circulation of Unusual G and P Types in Hungary. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):393–7.
266. Abdel-Haq NM, Thomas RA, Asmar BI, Zacharova V, Lyman WD. Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2680–2.
267. Leshem E, Lopman B, Glass R, Gentsch J, Bányai K, Parashar U, i sur. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(9):847–56.
268. Gibory M, Bruun T, Flem E, Dembinski JL, Haltbakk I, Størdal K, i sur. Genetic diversity of rotavirus strains circulating in Norway before and after the introduction of rotavirus vaccination in children. *J Med Virol.* 2022;94(6):2624–31.
269. Durmaz R, Kalaycioglu AT, Acar S, Bakkaloglu Z, Karagoz A, Korukluoglu G, i sur. Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: report of rotavirus surveillance in Turkey. *PLoS One.* 2014;9(12):e113674.
270. Mhango C, Mandolo JJ, Chinyama E, Wachepa R, Kanjerwa O, Malamba-Banda C, i sur. Rotavirus Genotypes in Hospitalized Children With Acute Gastroenteritis Before and After Rotavirus Vaccine Introduction in Blantyre, Malawi, 1997–2019. *J Infect Dis.* 2022;225(12):2127–36.
271. Giri S, Kumar CPG, Khakha SA, Chawla-Sarkar M, Gopalkrishna V, Chitambar SD, i sur. Diversity of rotavirus genotypes circulating in children < 5 years of age hospitalized for acute gastroenteritis in India from 2005 to 2016: analysis of temporal and regional genotype variation. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):740.
272. Smith MJ, Clark HF, Lawley D, Bell LM, Hodinka RL, DiStefano DJ, i sur. The clinical and molecular epidemiology of community- and healthcare-acquired rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(1):54–8.
273. Babji S, Sindhu KN, Selvarajan S, Ramani S, Venugopal S, Khakha SA, i sur. Persistence of G10P[11] neonatal rotavirus infections in southern India. *J Clin Virol.* 2021;144:104989.



274. Shim JO, Son DW, Shim S-Y, Ryoo E, Kim W, Jung Y-C. Clinical Characteristics and Genotypes of Rotaviruses in a Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatr Neonatol*. 2012;53(1):18–23.
275. Mladenova Z, Korsun N, Geonova T, Iturriza-Gómara M. Molecular epidemiology of rotaviruses in Bulgaria: annual shift of the predominant genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(5):555–62.
276. Hanquet G, Ducoffre G, Vergison A, Neels P, Sabbe M, Van Damme P, i sur. Impact of rotavirus vaccination on laboratory confirmed cases in Belgium. *Vaccine*. 2011;29(29–30):4698–703.
277. Paulke-Korinek M, Kollaritsch H, Aberle SW, Zwazl I, Schmidle-Loss B, Vécsei A, i sur. Sustained low hospitalization rates after four years of rotavirus mass vaccination in Austria. *Vaccine*. 2013;31(24):2686–91.
278. Tate JE, Haynes A, Payne DC, Cortese MM, Lopman BA, Patel MM, i sur. Trends in national rotavirus activity before and after introduction of rotavirus vaccine into the national immunization program in the United States, 2000 to 2012. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(7):741–4.
279. Tate JE, Panozzo CA, Payne DC, Patel MM, Cortese MM, Fowlkes AL, i sur. Decline and change in seasonality of US rotavirus activity after the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatrics*. 2009;124(2):465–71.
280. Ai C-E, Steele M, Lopman B. Disease burden and seasonal impact of improving rotavirus vaccine coverage in the United States: A modeling study. *PLoS One*. 2020;15(2):e0228942.
281. Cubitt WD, Steele AD, Iturriza-Gomara M. Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: Emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. *J Med Virol*. 2000;61(1):150–4.
282. Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DW, Ramsay M, Desselberger U, Gray JJ. Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol*. 2000;38(12):4394–401.
283. Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Breuer T. Rotavirus Serotype G9 Is Associated with More-Severe Disease in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):312–4.
284. Saluja T, Dhingra MS, Sharma SD, Gupta M, Kundu R, Kar S, i sur. Association of

rotavirus strains and severity of gastroenteritis in Indian children. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(3):711–6.

285. Clark HF, Lawley DA, Schaffer A, Patacsil JM, Marcello AE, Glass RI, et al. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995-1996 season. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1434–8.
286. Arista S, Vizzi E, Ferraro D, Cascio A, Di Stefano R. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Arch Virol.* 1997;142(10):2065–71.

## 11. KRATKA BIOGRAFIJA

Maja Vrdoljak Pažur rođena je u Sinju 4. veljače 1990. godine, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2008. godine, a završila 2014. godine. Pripravnički staž doktora medicine odradila je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ gdje je 2015. g. i započela specijalizaciju iz pedijatrijske infektologije. Specijalistički ispit položila je 28. rujna 2022. godine. Autorica je ili koautorica više znanstvenih radova objavljenih u domaćim i stranim stručnim časopisima. Aktivno je sudjelovala na brojnim međunarodnim kongresima. Udana je i majka jedne djevojčice.