

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Leo Markovinović

**Usporedba kliničke djelotvornosti
probiotika *Lactobacillus reuteri* i
enteroadsorbenta polimetilsiloksana u
liječenju rotavirusnog gastroenteritisa u
djece u dobi od 6 do 36 mjeseci**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Goran Tešović

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Goranu Tešoviću na pomoći i podršci pri izradi disertacije. Osim toga, zahvaljujem prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji na pomoći u statističkoj obradi podataka, doktorici mr. sc. Tihani Kniewald na izradi baze podataka, prof. Arijani Pavelić i Mariji Fijuček na tehničkoj potpori te svima ostalima koji su mi na bilo koji način pomogli.

POPIS KRATICA

| | |
|---------|--|
| AST | aspartat aminotransferaza |
| ALT | alanin aminotransferaza |
| BDP | bruto domaći proizvod |
| CD | klasifikacija površinskih molekula (od engl. cluster of differentiation) |
| CFU | jedinice koje tvore kolonije (od engl. colony forming units) |
| CRP | C-reaktivni protein |
| DNK | deoksiribonukleinska kiselina |
| ESPGHAN | Europskodruštvo za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (od engl. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) |
| GUK | glukoza u krvi |
| HBGA | tkivni antigeni krvnih grupa (od engl. histo-blood group antigens) |
| HR | omjer rizika (od engl. hazard ratio) |
| HHV-6 | humani herpes virus - 6 |
| Ig | imunoglobulin |
| KKS | kompletna krvna slika |
| L | leukociti |
| LGG | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Gorbach-Goldin |
| mRNK | glasnička RNK (od engl. messenger ribonucleic acid) |
| PCR | lančana reakcija polimeraze (od engl. polymerase chain reaction) |
| PCT | prokalcitonin |
| RNK | ribonukleinska kiselina |
| RRV | rotavirus rezus majmuna (od engl. Rhesus Rotavirus) |
| SAD | Sjedinjene Američke Države |
| WHO | Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. World Health Organisation) |

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD I SVRHA RADA | 1 |
| 1.1. ROTAVIRUS | 1 |
| 1.1.1. Povijest | 1 |
| 1.1.2. Građa i svojstva rotavirusa | 2 |
| 1.1.3. Grupe rotavirusa | 3 |
| 1.1.4. Tipovi rotavirusa | 4 |
| 1.1.5. Ulaz virusa u stanicu i umnožavanje | 5 |
| 1.1.6. Imunost | 6 |
| 1.1.7. Podložnost rotavirusnoj infekciji prema dobi | 7 |
| 1.1.8. Patologija i patogenezna | 8 |
| 1.1.8.1. Mehanizam nastanka proljeva | 8 |
| 1.1.9. Epidemiologija | 9 |
| 1.1.10. Klinička slika | 11 |
| 1.1.11. Liječenje | 13 |
| 1.1.12. Cijepljenje | 15 |
| 1.2. PROBIOTICI | 18 |
| 1.3. ENTEROADSORBENSI | 20 |
| 2. HIPOTEZA | 22 |
| 3. CILJEVI | 23 |
| 4. ISPITANICI I METODE | 25 |
| 4.1. ISPITANICI | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. LABORATORIJSKE METODE | 28 |
| 4.3. STATISTIČKE METODE | 29 |
| 5. REZULTATI | 30 |
| 5.1. OBILJEŽJA DJECE S ROTAVIRUSNOM INFEKCIJOM | 31 |
| 5.1.1. Opći podaci | 31 |
| 5.1.2. Epidemiološki podaci | 33 |
| 5.1.3. Laboratorijski i klinički podaci | 35 |
| 5.2. USPOREDBA DJECE KOJA SU DOBIVALA ENTEROADSORBENS POLIMETILSILOKSAN (Enterogel) I PROBIOTIK <i>Lactobacillus reuteri</i> (BioGaia) | 37 |
| 5.2.1. Obilježja djece u dvije terapijske skupine | 37 |
| 5.2.2. Djelotvornost enteroadsorbensa polimetilsiloksana (Enterogel) u usporedbi s probiotikom <i>Lactobacillus reuteri</i> (BioGaia) u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa | 39 |
| 5.2.3. Sigurnost i podnošljivost enteroadsorbensa polimetilsiloksana (Enterogel) u usporedbi s probiotikom <i>Lactobacillus reuteri</i> (BioGaia) | 44 |
| 5.3. USPOREDBA VESIKARIJEVE I CLARKOVE LJESTVICE U KLASIFIKACIJI TEŽINE BOLESTI I PREDIKTIVNOSTI ZA TIJEK ROTAVIRUSNOG GASTROENTERITISA U DJECE U DOBI 6 - 36 MJESECI | 45 |
| 6. RASPRAVA | 50 |
| 6.1. REZULTATI | 51 |
| 6.1.1. Primarni ishod | 51 |
| 6.1.2. Sekundarni ishod | 52 |
| 6.1.3. Tercijarni ishod | 53 |
| 6.2. SIGURNOST I PODNOŠLJIVOST | 53 |

| | |
|--|----|
| 6.3. USPOREDBA VESIKARIJEVE I CLARKOVE LJESTVICE U KLASIFIKACIJI | |
| TEŽINE ROTAVIRUSNE INFEKCIJE | 54 |
| 6.4. OBILJEŽJA DJECE UKLJUČENE U ISTRAŽIVANJE | 55 |
| 6.4.1. Opći podaci | 55 |
| 6.4.2. Epidemiološki podaci | 56 |
| 6.4.3. Laboratorijski i klinički podaci | 59 |
| 6.5. PREDNOSTI I NEDOSTACI ISTRAŽIVANJA | 61 |
| 7. ZAKLJUČCI | 65 |
| 7.1. USPOREDBA DJELOTVORNOSTI TESTIRANOG I STANDARDNOG | |
| LJEKOVITOG SREDSTVA | 65 |
| 7.2. NEPOVOLJNA DJELOVANJA (NUSPOJAVE) ISPITIVANIH LJEKOVITIH | |
| SREDSTAVA | 65 |
| 7.3. USPOREDBA DVIJU KLINIČKIH LJESTVICA ZA OCJENU TEŽINE | |
| ROTAVIRUSNOG GASTROENTERITISA | 65 |
| 7.4. UČESTALOST NEKIH RJEDIH KLINIČKIH MANIFESTACIJA ROTAVIRUSNE | |
| INFEKCIJE | 66 |
| 7.5. UČESTALOST RIJETKIH KOMPLIKACIJA ROTAVIRUSNE INFEKCIJE | 66 |
| 8. SAŽETAK | 67 |
| 9. SUMMARY | 69 |
| 10. LITERATURA | 71 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 92 |

1. UVOD

Virusne crijevne infekcije čest su razlog hospitalizacije djece i odraslih i u razvijenim i u zemljama u razvoju. Radi se o infekcijama kratkog trajanja, ali velikog epidemijskog potencijala. Klinički se očituju povraćanjem i proljevom što rezultira naglim gubitkom tekućine koju je potrebno brzo nadoknaditi. To predstavlja velik problem u zemljama u razvoju zbog nedostatka pitke vode i slabe dostupnosti medicinske skrbi. Zbog toga dijarealne bolesti imaju značajan udio u smrtnosti djece u nerazvijenim zemljama (15-30 %) s tim da postotak smrtnosti raste obrnuto razmjerno visini BDP-a.^{1,2} Udio rotavirusnih infekcija u mortalitetu djece oboljele od dijarealnih bolesti iznosi 37 %, što predstavlja 5 % ukupnog mortaliteta djece mlađe od pet godina u svijetu.³

U većini zemalja incidencija bakterijskih i parazitarne crijevnih infekcija je u opadanju zbog poboljšanja sanitarnih uvjeta kao što su izgradnja vodovoda i kanalizacije i kloriranje vode za piće. S obzirom na visoku prevalenciju rotavirusnih infekcija, kako u razvijenim, tako i nerazvijenim zemljama, ne očekuje se smanjenje prevalencije usporedno s tim intervencijama.⁴

Uzročnici virusnih crijevnih infekcija su virusi iz obitelji Reoviridae (Rotavirus), Caliciviridae (Norovirus, Sapovirus), Adenoviridae (crijevni Adenovirus - skupina F, serotip 40 i 41), Astroviridae (Astrovirus) te neki iz roda Picornaviridae (Aichi virus). Po učestalosti rotavirus je na prvom mjestu, kako u razvijenim, tako i u zemljama u razvoju. Slijede ga norovirus, potom adenovirus, dok su ostali virusi značajno rjeđi po učestalosti.⁵

Svrha ovog rada jest ispitati novo ljekovito sredstvo za liječenje virusnog gastroenteritisa te opisati kliničke osobitosti rotavirusnog gastroenteritisa na našem području.

1.1. ROTAVIRUS

1.1.1. Povijest

Prvi je put virus s morfološkim obilježjima rotavirusa zamijećen elektronskim mikroskopom u uzorku crijeva miša i majmuna 1963. godine.⁶ Otuda prva imena - "virus epidemijske dijareje miša" i

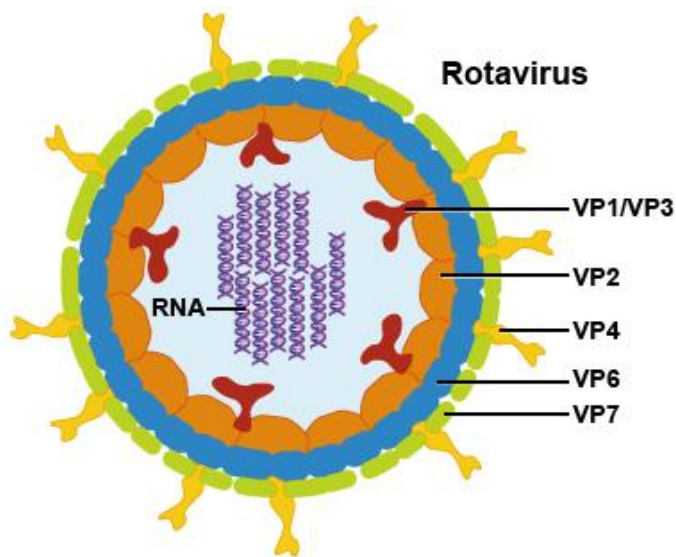
"simian agent 11". Zbog sličnosti s kotačem kasnije je nazvan rotavirus ("rota", lat. kotač). Bishop i sur. su 1973. dokazali isti virus u uzorku duodenuma djeteta s kliničkom slikom akutnog gastroenteritisa. To je bilo prvi put da se rotavirus povezuje s bolešću u ljudi.⁷ Ubrzo nakon toga su i brojni drugi istraživači potvrdili nazočnost rotavirusa u fecesu djece oboljele od akutnog gastroenteritisa. Osim toga, zabilježeno je da i životinjski i ljudski rotavirusi dijele isti grupni antigen stoga su klasificirani u rod rotavirus unutar obitelji Reoviridae.⁸

1.1.2. Građa i svojstva rotavirusa

Rotavirus je neovijeni virus ikozaedrnog oblika promjera oko 770 Å. Građen je od tri koncentrične proteinske školjke koje sadrže genom u sredini (Slika 1). Virusni genom sastoji se od 11 segmenata dvostruke RNK. S njim su strukturno čvrsto povezani VP1 protein (virusna polimeraza) i VP3 protein ("capping" enzim) koji su usidreni u blizini pora unutarnje školjke.⁹ Unutarnju školjku čini 120 kopija VP2 proteina. Na nju se nastavlja srednja školjka koju čini 780 kopija VP6 proteina u formi trimera. Srednja i unutarnja školjka zajedno s genomom čine transkripcijski aktivnu česticu.^{10, 11}

Vanjska školjka građena je od dva strukturna proteina - VP7 i VP4. Protein VP7 je glikoprotein i u formi trimera nastavlja se na srednju školjku. 60 kopija VP4 proteina usidreno je u VP6 proteinu, prolazi kroz vanjsku ovojnica i strši izvan virusa.¹² On je odgovoran za vezanje i prodiranje virusa u stanicu i kao takav glavni je čimbenik virulencije.¹³ Oba proteina vanjske školjke su antigeni neutralizacije virusa.¹⁴ Protiv proteina srednje školjke (VP6), iako nije direktno izložen, stvara se najjači imunološki odgovor i on čini grupni antigen rotavirusa. Kroz vanjsku i srednju školjku prodiru 132 vodena kanala.

Čestica rotavirusa je čvrsta i opire se inaktivaciji eterom, ali i otopinama klora koje služe za dezinfekciju otpadnih voda i vode za piće.¹⁵ Ipak, može se inaktivirati kelatorima kalcija i antisepticima koji sadrže visoke koncentracije etanola.¹⁶



Slika 1. Građa rotavirusa

(slika preuzeta s <https://www.immunizationinfo.com/rotavirus/>)

Genom rotavirusa sastoji se od 11 segmenata dvostruke RNK koji kodiraju šest strukturnih proteina (VP1-VP4, VP6 i VP7) i šest nestrukturnih (NSP1-NSP6). Dvostruka RNK može se ekstrahirati iz čestica virusa i odvojiti na poliakrilamid pomoću elektroforeze u 11 traka koje se vide nakon bojanja srebrom. Svaki rotavirus ima svoj karakteristični izgled u elektroforezi ("elektroforetip") što se koristi u epidemiološkim istraživanjima. Tipično se segmenti RNK grupe A rotavirusa slažu u četiri skupine koje sadrže segmente 1-4, 5 i 6, 7-9 te 10 i 11. Elektroforetipovi ostalih grupa rotavirusa isto se slažu u četiri grupe, ali im se distribucije razlikuju.^{17,18}

1.1.3. Grupe rotavirusa

Godine 1980. pronađen je virus u svinja morfološki identičan rotavirusu, ali mu je nedostajao grupni antigen. To je dovelo do otkrića novih grupa rotavirusa. Originalna grupa nazvana je A, a ostalih šest grupa označeno je slovima B-G. Rotavirusi su podijeljeni u grupe prema grupnom antigenu koji odgovara VP6 proteinu srednje školjke virusa.¹⁸ Za sada ima pet sigurno definiranih grupa (A-E), no postoje dokazi za postojanje još tri dodatne grupe (F-H). Za sada se zna da samo prve tri grupe (A-C)

uzrokuju bolest u ljudi, a od njih grupa A uzrokuje najveći dio.¹⁹ Zbog toga je prvenstveno prema grupi A usmjerena dijagnostika, ali i razvoj cjepiva.

1.1.4. Tipovi rotavirusa

Za neutralizaciju rotavirusa odgovorni su proteini vanjske školjke virusa VP4 i VP7. Zbog glikozilirane strukture VP7 protein nazvan je i G-antigen, a VP4 protein je zbog svoje osjetljivosti na proteazu nazvan P-antigen. Na osnovi genskih analiza do sada je utvrđeno 27 G tipova rotavirusa i 35 P tipova.²⁰ Za VP7 antigen genotipska klasifikacija odgovara fenotipskoj tako da se koristi označavanje brojevima, npr. G1. Za VP4 antigen genotip ne odgovara uvijek fenotipu odnosno serotipu (npr. P serotip 1A može imati genotip 4 ili genotip 8). Radi lakšeg snalaženja danas se najčešće koristi označavanje virusa običnim arapskim brojkama za G serotip, a za P antigen koristi se uglavnom samo genotip koji se stavlja u uglatu zagradu, kao npr. rotavirus grupe A G1P[8] ili P[8]G1.^{21, 22}

Rotavirus ima segmentirani genom koji čini jedanaest segmenata dvostruke RNK. Kao i ostali virusi sa segmentiranim genomom vrlo lako tvori rekombinante. Kada se jedna stanica zarazi dvama rotavirusima različitih serotipova pojedini segmenti oba genoma mogu se presložiti u jedan novonastali virus. Iako rotavirus može zaraziti jako velik broj vrsta, relativno rijetko se događa da virus specifičan za jednu vrstu uzrokuje infekciju u druge vrste. Čini se da to osobito vrijedi za križne infekcije između ljudskih i životinjskih serotipova. Ipak, unatoč toj činjenici, brojni su ljudski virusi koji imaju tragove "životinjskog" genoma. Ova izrazita sklonost preslagivanju genoma razlog je velikoj raznovrsnosti serotipova širom svijeta.²³

Istraživanja zadnjih desetljeća pokazala su da su najčešći G serotipovi 1-4 i 9, dok su najčešći P tipovi bili P[8] i P[4] i, u zadnje vrijeme, P[6]. Nazočnost pojedinog serotipa na nekom području može se razlikovati od sezone do sezone, ali isto tako isti serotip može dominirati više godina.²⁴ Opisane su i neobične kombinacije ljudskih i životinjskih serotipova kao i divljih i cjepnih tipova rotavirusa.²⁵ Iako ima nekih naznaka da bi cijepljenje moglo stvoriti promjenu u uobičajenoj distribuciji serotipova, za sada nema dovoljno čvrstih dokaza koji bi potvrdili tu pretpostavku.

Osim uobičajene grupe A, rotavirusi grupe B i C povremeno se pojavljuju kao uzročnici epidemija, osobito u Kini (grupa B) i Japanu (grupa C).^{26, 27} Ove grupe zabilježene su i u drugim dijelovima svijeta, ali u manjoj mjeri. Klinički je zanimljivo da u tim epidemijama uglavnom obolijevaju odrasli i djeca starija od tri godine. Osim toga, za vrijeme epidemija grupa B i C češće je zamijećen prijenos putem hrane i vode nego u epidemijama uzrokovanim grupom A.^{28, 29} Sve navedeno može unijeti zabunu i kliničara navesti na razmišljanje da se radi o drugoj etiologiji (alimentarna intoksikacija, norovirusna infekcija...). S druge strane, otežana je detekcija virusa jer su uobičajeni komercijalni dijagnostički testovi (lateks aglutinacija i enzimski imunoseji) bazirani na detekciji grupe A i njima nije moguće dokazati ostale grupe. Pri sumnji na infekciju rotavirusima non-A grupe potrebno je učiniti elektronsku mikroskopiju ili molekularnu dijagnostiku (PCR).¹⁹

1.1.5. Ulaz virusa u stanicu i umnožavanje

Glavnu ulogu u vezanju rotavirusa za stanicu ima VP4 protein. Da bi se virus mogao aktivirati potrebno je prvo da se tripsinom ili tripsinu sličnim proteazama podijeli VP4 protein u dva dijela VP5 i VP8 koji ostaju vezani za stanicu.³⁰ VP8 protein veže se za neki glikoprotein na površini stanice koji može biti različit ovisno o grupi rotavirusa. Neki životinjski rotavirusi vežu se za sialinsku kiselinu.³¹ Što se tiče rotavirusa koji uzrokuju bolest u ljudi, čini se da brojne molekule sudjeluju u vezivanju i prodiranju virusa u stanicu uključujući proteine toplinskog šoka, komponente gangliozida i integrine.³² Jedno istraživanje koje je uključivalo genotip P[14] pokazalo je da se VP8 protein vezao za glikane karakteristične za A-tip antigena krvne grupe (od engl. histo-blood group antigen, HBGA).³³ Druga su istraživanja pokazala da se drugi tipovi VP4 proteina mogu vezati za druge antigene krvnih grupa kao što su O, A i AB. Osim toga, pokazano je da se mogu vezati i za glikoproteine ljudske sline, mlijeka i sintetske oligosaharide krvnih grupa.³⁴ Antigeni krvnih grupa su ujedno i receptori za Norovirus.

Sam ulazak virusa u stanicu dosta je složen i nije do kraja razjašnjen. Činjenica je da on uključuje konformacijske promjene VP5 i VP8 proteina te VP7 protein u procesu koji nalikuje endocitozi ovijenih virusa.^{35, 36}

Da bi uopće došlo do virusne replikacije potrebno je da se uklone proteini vanjske školjke i izloži transkripcijski aktivna čestica (VP2-VP6 dvostruka školjka). Ona postaje aktivna kad virusna polimeraza (VP1) i "capping" enzim (VP3) počnu sintetizirati 11 virusnih mRNK. One izlaze iz stanice kroz kanale na vrhovima VP2 i VP6 slojeva i u staničnom citosolu se prevode. Nastali proteini NSP2 i NSP5 imaju ulogu u formiranju virusnih inkluzija u citosolu stanice koji se zovu viroplazme.^{37,38} U viroplazmi počinje sastavljanje čestica novih virusa. U kontaktu s proteinom VP2 prvo se umnožava jednostruka pozitivna RNK i nastaje 11 segmentna dvostruka RNK. Trimeri proteina VP6 međusobno se povezuju s VP2 proteinima i nastaje nova čestica s dvostrukom školjkom.³⁹ Ona se dalje povezuje s NSP4 proteinom i pupa u endoplazmatski retikulum gdje se dalje povezuje s VP4 i VP7 proteinima i tako nastaje kompletna virusna čestica.⁴⁰ Zrele virusne čestice nakupljaju se u endoplazmatskom retikulumu do propadanja stanice kad se virusi oslobađaju.⁴¹

1.1.6. Imunost

Unatoč brojnim istraživanjima još nije do kraja jasno što je osnova imunosti na rotavirusnu infekciju. Činjenica je da nakon rotavirusne infekcije ostaje jasan humoralni odgovor u vidu stvaranja protutijela razreda IgM, a poslije i IgA i IgG.^{42,43} Stanična imunost isto se prolazno može zamijetiti nakon preboljenja rotavirusne infekcije.^{44,45,46}

S obzirom na to da rotavirus ima velik broj antigena, postavlja se pitanje je li imunost serotipski specifična, grupno specifična ili možda kombinacija jednoga i drugoga. Činjenica je da svaka sljedeća rotavirusna infekcija pojačava imunost prema novoj rotavirusnoj infekciji.⁴⁷ Neka istraživanja na zamorcima pokazala su da bi imunost mogla biti serotipski specifična.⁴⁸ Međutim, postoje druga istraživanja, na miševima, koja pokazuju da povezanost nije tako jasna i da je imunost više povezana s razinom crijevnih IgA protutijela.⁴⁹

Novorođenčad inficirana rotavirusom zaštićena su od težeg gastroenteritisa u sljedeće 1-2 godine, ali ne i od reinfekcije.⁵⁰ Dojenčad koja su preboljela rotavirusni gastroenteritis ili čak asimptomatsku infekciju zaštićena su od obolijevanja, ali i od reinfekcije sljedeće godine.⁵¹ Zaštita nakon preboljenja

rotavirusne infekcije korelira s razinom protutijela u serumu i u stolici. Jedna velika studija provedena u Bangladešu pokazala je da su djeca koja su oboljela od rotavirusnog gastroenteritisa imala značajno nižu razinu homolognih i heterolognih protutijela nego djeca koja se nisu razboljela.⁵² Prema tome, čini se da je za imunost bitnija jačina imunološkog odgovora nego tipna specifičnost. Dokaz za to je i odlična heterotipna zaštita nakon cijepljenja monovalentnim G1P[8] cjepivom.⁵³

Provedeno je nekoliko istraživanja na miševima koja su pokazala da je za imunost protiv sljedeće rotavirusne infekcije važna sposobnost stvaranja protutijela, dok su CD8+ T-limfociti važni za rezoluciju infekcije.⁵⁴ Osobito su važna protutijela razreda IgA koja su važna i za rezoluciju infekcije i za zaštitu od sljedeće infekcije.⁵⁵ Ipak, do danas se ne zna glavni imunološki biljeg zaštite od rotavirusne infekcije.

1.1.7. Podložnost rotavirusnoj infekciji prema dobi

U ljudi najveća je osjetljivost na rotavirusnu infekciju u dobi od 6 do 24 mjeseca. S obzirom na to da je većina žena u generativnoj dobi bar jednom u životu preboljela rotavirusnu infekciju, pretpostavlja se da većina majki ima određenu razinu protutijela protiv rotavirusa klase IgG koja prolaze posteljicu. Većina novorođenčadi i male dojenčadi zaštićena su stoga u ranoj dobi od težeg rotavirusnog gastroenteritisa iako se mogu inficirati i/ili oboljeti.⁵⁶ Za sada nije jasno kako majčina protutijela štite od infekcije. Postoji mogućnost da ona pasivno prolaze u lumen crijeva i neutraliziraju rotavirus prije same infekcije. Osim transplacentarnog prijenosa protutijela dolazi u obzir i prijenos protutijela putem majčinog mlijeka. Bez obzira na način zaštite dojenčeta majčinim protutijelima, činjenica je da su infekcije u novorođenčadi i male dojenčadi blage ili asimptomatske.⁵⁷ Ukoliko dođe do takve infekcije u ranoj dobi, ona ne štiti dijete od sljedeće rotavirusne infekcije u starijoj dobi, ali su simptomi sljedeće infekcije znatno blaži.⁵⁰

Više studija je pokazalo da dojenje štiti od simptomatske rotavirusne infekcije.^{58, 59} Neke studije pokazale su samo zaštitu od teže simptomatske infekcije odnosno težeg gastroenteritisa. Majčino mlijeko može štititi dojenče na dva načina - direktno i indirektno. Majčino mlijeko štiti dojenče direktno jer sadrži protutijela, ali i jedan specifičan glikoprotein, laktadherin, čija razina u mlijeku obrnuto korelira s

vjerojatnošću simptomatske infekcije u dojenčeta.⁶⁰ Indirektno, dojenje djeteta bitno smanjuje mogućnost infekcije jer smanjuje vjerojatnost kontaminacije koja je moguća preko bočica, dudica i adaptiranog mlijeka. Negativna strana dojenja je to što se dojenjem neutralizira i cjepni rotavirus što bi moglo biti razlogom zašto je efikasnost cijepljenja u zemljama u razvoju značajno manja.⁶¹

Gotovo sva djeca do svog trećeg rođendana iskuse bar jednu rotavirusnu infekciju nakon koje zaostaje prisutnost protutijela dulje vrijeme, ako ne i doživotno. Ovisno o razini tih protutijela osoba može biti zaštićena od rotavirusne infekcije ili samo od težeg oblika bolesti.⁶²

1.1.8. Patologija i patogeneza

Nakon ingestije, rotavirusna infekcija počinje u početnom dijelu tankog crijeva i širi se distalno. Uzrokuje promjenu cilindričnog trepetljivog epitela u kuboidni što rezultira skraćanjem i prestankom rasta crijevnih resica. U lamini proprijii naseljavaju se retikularne stanice i mononukleari. Najizraženije su promjene u početnom tankom crijevu.⁶³ Čini se da virulentniji sojevi rotavirusa više napadaju proksimalni dio tankog crijeva, a manje virulentni distalni.⁶⁴ Slične promjene nađene su u uzorcima crijeva raznih životinja, od miševa do teladi.^{65, 66, 67} Ispitivanja uzoraka crijeva u ljudi su rijetka, ali i u tim ispitivanjima nađene su slične promjene kao i u životinja.⁶⁸ Nedvojbeno postoji jasan tropizam rotavirusa za enterocite tankog crijeva, no, danas se zna da rotavirusna infekcija uzrokuje i antigenemiju i viremiju i, shodno tome, rasap u druga tkiva i organe (jetru, središnji živčani sustav).^{69, 70, 71, 72}

Čimbenici virulencije rotavirusa nisu do kraja razjašnjeni. Ipak, više istraživanja na životinjama pokazuje da je virulencija povezana s genima za VP4 protein.⁷³ Ostali proteini koji bi mogli biti važni za virulenciju su VP3, VP7 i NSP4.⁷⁴

1.1.8.1. Mehanizam nastanka proljeva

Proljev je glavna klinička manifestacija rotavirusne infekcije. Nekad se mislilo da je glavni mehanizam nastanka proljeva malapsorpcija zbog smanjenog broja disaharidaza na vrhovima crijevnih resica. Posljedično većina šećera ostaje u lumenu crijeva i osmotski navlači vodu što ima proljev za

posljedicu. To je svakako jedan od mehanizama, ali nije i jedini. Zamijećeno je da proljev nastaje i prije histoloških promjena u crijevima. Iz toga slijedi da bi proljev mogao biti potaknut nekim toksinom ili ubrzanjem peristaltike crijeva. Kao uzrok obje ove pojave spominje se NSP4 protein koji bi mogao imati ulogu enterotoksina. On potiče ulazak kalcija u stanicu i sekreciju klorida. Osim toga, u pokusima na miševima zamijećeno je da NSP4 protein djeluje na crijevni živčani sustav. Blokiranje crijevnog živčanog sustava lijekovima u miševa imalo je za posljedicu smanjenje sekrecije tekućine odnosno blaži proljev. NSP4 protein također slabi tzv. "tijesne veze" među stanicama crijeva i omogućuje paracelularno istjecanje tekućine. Zamijećena je i povezanost između NSP4 proteina i sekrecije serotonina iz enterokromafinih stanica crijeva što bi moglo biti povezano s povraćanjem. Antitijela na NSP4 protein mogu smanjiti proljev u miševa.^{75, 76}

1.1.9. Epidemiologija

Prije uvođenja cijepljenja protiv rotavirusa rotavirusne infekcije bile su odgovorne za smrt oko pola milijuna djece svake godine odnosno 5 % od ukupno umrle djece mlađe od pet godina. Većina te djece umrla je u nerazvijenim zemljama Afrike i Azije.⁷⁷ U zapadnim zemljama rotavirus je bio uzrokom velikih troškova u zdravstvu jer je uzrokovao velik broj pregleda i hospitalizacija djece.⁷⁸ Zanimljivo je da je incidencija rotavirusa podjednaka u razvijenim i u nerazvijenim zemljama, međutim, u siromašnim zemljama praćena je znatno većom smrtnošću. Velika smrtnost u siromašnim zemljama ima brojne uzroke - neishranjenost, intestinalne koinfekcije, opći komorbiditeti djece, nedostupnost pitke vode i nedostupnost adekvatne medicinske skrbi. Osim toga, rotavirus je i jedan od najčešćih uzročnika hospitalnih infekcija na dječjim odjelima.^{79, 80}

Razlog velikog epidemijskog potencijala rotavirusa leži u velikoj čvrstoći odnosno postojanosti virusnih čestica u okolini, maloj infektivnoj dozi (10^3 viriona) i velikoj količini virusa u stolici (10^{11} virusnih čestica/mL stolice).^{81, 82} Iz navedenog se može pretpostaviti da se pri jednoj evakuaciji stolice (oko 100 mL) u okolinu ispusti 10^{13} virusnih čestica, odnosno ukupno 10^{10} (10 milijardi) infektivnih doza!

Virus se širi uglavnom fekalno-oralnim putem, bilo direktno ili preko kontaminiranih predmeta (kvake, igračke).⁸³ Iako su opisivane epidemije putem hrane i vode, osobito za rotaviruse B i C grupe, čini se da su one ipak rijetke.²⁸ Zbog eksplozivnog širenja epidemije sumnjalo se i na kapljični prijenos infekcije odnosno prijenos putem aerosola, ali to nije dokazano. Međutim, pokusi s miševima pokazali su da je moguće širenje rotavirusa u kavezima koji se ne dotiču, što sugerira mogućnost prijenosa aerosolom.⁸⁴ Smještaj u vrtiće ili domove za nemoćne svakako predstavlja rizik za obolijevanje od rotavirusa. Rotavirus je važan uzrok bolničkih infekcija osobito na dječjim odjelima.⁸⁵ Javlja se i kao uzročnik gastroenteritisa u putnika (putnička dijareja). U nekim sezonama zamijećene su i rotavirusne infekcije u djece koja su se vraćala s mora. Ostaje upitno je li morska voda tu poslužila kao vehikul prijenosa infekcije.⁸⁶

Glede sezonske pojavnosti rotavirusa može se reći da je to uglavnom zimska bolest. Epidemija obično kreće u jesen i traje do proljeća.⁸⁷ Od kasnog proljeća do rane jeseni rotavirusne infekcije su rijetke. U tropskim predjelima rotavirusne infekcije ne pokazuju izraženi sezonalitet.⁸⁸

Zemljopisno je zamijećeno da u SAD-u epidemija kreće od jugozapada i postupno se širi prema sjeveroistoku.⁸⁷ Slična pojava zamijećena je i u Europi gdje epidemija obično kreće u Španjolskoj i kreće se prema sjeveroistočnim dijelovima Europe.⁸⁹ Ova pojava nije povezana sa zemljopisnom širinom što govori protiv povezanosti s temperaturom ili vlažnošću zraka. Osim toga, na putu širenja epidemije zamijećeni su različiti sojevi virusa što bi govorilo protiv kontinuiranog širenja epidemije iz jednog mjesta.

Upitno je gdje se virus nalazi između dvije epidemije. Pretpostavlja se da bi se virus mogao polako umnožavati u podložnom domaćinu (čovjeku) i tako preživljavati do nastupa pogodnih uvjeta za širenje. Druga mogućnost je da virus preživljava negdje u okolini u inaktivnom obliku do početka sljedeće epidemije. Otkriti izvor rotavirusne epidemije dosta je teško jer je nađeno da u svakoj epidemiji simultano cirkulira više serotipova virusa.⁹⁰ Određeni serotip virusa može poticati iz određenog lokaliteta, može biti unesen iz drugog područja ili može nastati de novo genskom rekombinacijom.⁹¹

Nakon uvođenja redovitog cijepljenja protiv rotavirusa u SAD-u incidencija rotavirusnog gastroenteritisa kontinuirano opada i izostaju tipične zemljopisne pojave širenja infekcije u smjeru od jugozapada prema sjeveroistoku.⁹² U sezoni 2009-2010. prvi put nije dosegnut prag za početak epidemije.⁹³

1.1.10. Klinička slika

Simptomi rotavirusne infekcije obično nastupaju nakon inkubacije od 1 do 3 dana.⁹⁴ Klinička slika ovisi o tome je li bolesnik već imao nekakav kontakt s rotavirusom ili ne, a ovisi i o općoj kondiciji bolesnika. U bolesnika koji nemaju nikakvu imunost prema rotavirusu simptomi najčešće počinju naglo - mučninom, bolovima u trbuhu i povraćanjem. Nakon nekoliko sati javlja se i vrućica te učestale proljevaste stolice. U stolicama može biti sluzi, ali nema krvi niti leukocita.^{95,96} Stolice su karakteristična "kisela" mirisa i iskusne medicinske sestre ili njegovateljice u jaslama već prema mirisu stolice mogu pretpostaviti uzročnika bolesti. Oboljela djeca često izgledaju prostrirano - blijedo, klonulo i dehidrirano, obično su neraspoložena, nezadovoljna, odbijaju jesti i piti. Teže oboljeli imaju tipičan izgled lica s izraženim podočnjacima poput oboljelih od kolere. Prema kliničkoj bodovnoj ljestvici za ocjenjivanje težine akutnog gastroenteritisa, djeca s dokazanom rotavirusnom infekcijom imaju gotovo dvostruko težu bolest od onih koja su negativna na rotavirus.⁹⁷ U početku bolesti proljevu može prethoditi izražen meteorizam trbuha. Peristaltika može biti ubrzana ili usporena. Djeca već tada mogu biti dehidrirana zbog obilja tekućine koja se izlila u lumen crijeva. Nakon toga najčešće slijedi obilna stolica koja može sadržavati, ovisno o dobi i tjelesnoj masi djeteta, 100-500 mL tekućine. Broj stolica može biti različit, a kreće se od 3 do 30 stolica dnevno, najčešće 5-10 pražnjenja crijeva/24 h na vrhuncu bolesti. Vrućica traje obično 2-3 dana, isto kao i povraćanje. Nakon normalizacije temperature nastavlja se proljev još 2-3 dana uz postupni oporavak teka i normalizaciju stolice.

Stanje svijesti često je poremećeno i kreće se od blage usporenosti i neraspoloženja do letargije i konvulzija. Djeca sklona konvulzijama nerijetko dobiju konvulzije i u afebrilnom stanju. Konvulzije mogu biti i recidivirajuće sve do epileptičkog statusa. Uzrok leži vjerojatno u poremećaju acidobaznog i

elektrolitnog statusa, ali dolazi u obzir i direktno djelovanje virusa na središnji živčani sustav (putem toksina) ili indirektno, zbog imunološkog odgovora na virus.^{98,99} S obzirom na to da je likvorski nalaz obično uredan (citološki i biokemijski) govorimo o encefalopatiji, a ne o encefalitisu. Rijetko se nađe hipoglikorahija ili minimalna pleocitoza. Rotavirus se najčešće ne može dokazati u likvoru iako su opisani slučajevi dokazanog rotavirusnog meningoencefalitisa.^{100,101} Uz virus gripe i humani herpesvirus-6 (uzročnik trodnevne vrućice odnosno exanthema subitum), rotavirus je treći najčešći uzročnik infektivne encefalopatije u male djece. Nakon rehidracije i korekcije acidobaznog i elektrolitnog statusa obično slijedi i oporavak stanja svijesti.

Bolest koju uzrokuje rotavirus, prema kliničkim pokazateljima, obično je teža nego bolest koju uzrokuju drugi virusi (norovirus, adenovirus) i češće zahtijeva hospitalizaciju odnosno parenteralnu rehidraciju.¹⁰² Premda većina oboljele djece ima sva tri osnovna simptoma, vrućicu, povraćanje i proljev, u neke djece jedan simptom ili čak dva mogu izostati.¹⁰³ Novorođenčad i mala dojenčad koja su dobila protutijela od majke nerijetko imaju asimptomatsku infekciju ili se ona očituje blagim simptomima - pojačanim bljućkanjem ili povraćanjem kroz 1-2 dana, smanjenim tekom, jednokratnom vrućicom ili tek nešto mekšim stolicama od uobičajenih. Na rotavirus se u te djece posumnja samo ako starije dijete u obitelji ima jasnu kliničku sliku.¹⁰⁴

Djeca s rotavirusnom infekcijom obično imaju niske upalne parametre. Leukocitoza s neutrofilijom može biti posljedica povraćanja i dehidracije. C-reaktivni protein (CRP), prokalcitonin (PCT) i sedimentacija eritrocita obično su u granicama referentnih vrijednosti ili su tek blago povišenih vrijednosti. Rijetko se vidi CRP veći od 30 mg/L.⁹⁵ Dehidracija je najčešće izotonička, u manjem broju slučajeva je hipernatremijska. Zbog povraćanja i anoreksije nerijetko se u laboratorijskim nalazima registrira hipoglikemija, ali neki puta vidi se i hiperglikemija koja je vjerojatno posljedica izlučivanja adrenalina zbog hipovolemije i hipoglikemije.¹⁰⁵ U manjem broju slučajeva djeca tijekom rotavirusne infekcije imaju povišene jetrene probe. Porast transaminaza može biti posljedica direktnog djelovanja virusa na hepatocite ili ishemije zbog centralizacije krvotoka.¹⁰⁶

Većina djece inficirane rotavirusom ima viremiju bez obzira na težinu simptoma.⁷⁰ Ostaje upitno koliki je njen značaj. Svakako bi to moglo objasniti rijetke slučajeve aseptičnog meningitisa i encefalitisa. Činjenica je da djeca zaražena HIV-om nemaju težu kliničku sliku bolesti.¹⁰⁷ Djeca s urođenim imunodeficijencijama i ona s transplantiranom koštanom srži mogu imati težu bolest i produljeno izlučivanje virusa stolicom.^{108, 109}

Rotavirus se spominje kao mogući uzrok nekih rjeđih kliničkih entiteta kao što su nekrotizirajući enterokolitis,¹¹⁰ invaginacija crijeva¹¹¹ i atrezija žučnih vodova.¹¹² Za sada nema sigurnih dokaza koji bi povezali isključivo rotavirus s bilo kojim od tih sindroma, odnosno, rotavirus je vjerojatno samo jedan od mogućih uzročnika. Iako se nakon uvođenja cijepljenja protiv rotavirusa zamijetila povećana učestalost invaginacije (intususcepcije), čini se da infekcija divljim rotavirusom nije povezana s tom pojavom.¹¹³

1.1.11. Liječenje

Liječenje rotavirusnog gastroenteritisa je isključivo simptomatsko. Osnovni princip je što prije nadoknaditi izgublenu tekućinu i elektrolite. U blagim i umjerenim slučajevima dovoljna je rehidracija na usta otopinama glukoze i elektrolita. Preporučena oralna otopina od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) je niskoosmolarna i sadrži 75 mmol/L natrija, 20 mmol/L kalija, 65 mmol/L klorida, 75 mmol/L glukoze i 10 mmol/L citrata, ukupne osmolarnosti 245 mmol/L. Nažalost, velik broj djece ne tolerira peroralni unos, osobito na početku bolesti.¹¹⁴

U srednje teškim i težim slučajevima potrebna je parenteralna rehidracija. Osim toga, potrebno je snižavati temperaturu i voditi računa o ishrani. Premda se nekad jako vodilo računa o dijete u toku akutnog infektivnog gastroenteritisa, danas se zna da od restriktivnih režima prehrane nema neke koristi. S obzirom na to da je jedan od patogenetskih mehanizama proljeva malapsorpcija disaharida i osmotska dijareja, mislilo se da će se ograničavanjem unosa šećera i masnoća smanjiti gubitak vode i elektrolita. Brojna istraživanja su pokazala da nema dokazane koristi od takvih dijeta. Danas se zna da glukoza pospješuje reapsorpciju natrija, a time i vode, stoga se za dojenčad i malu djecu preporučuje normalna ishrana za dob.¹¹⁴

U većine djece dovoljno je ambulantno liječenje ili liječenje putem dnevne bolnice. Samo u težim slučajevima potrebna je klasična hospitalizacija uz 24-satni medicinski nadzor. Djecu koja su cirkulatorno nestabilna ili poremećene svijesti treba nadzirati u jedinici intenzivnog liječenja. Potrebno je čim prije suzbiti hipovolemiju, najbolje uzastopnim bolusima kristalodnih otopina (20 mL/kg tjelesne mase) do normalizacije tlaka, pulsa i diureze. Naravno, potreban je oprez u djece sa srčanim i bubrežnim bolestima zbog mogućeg volumnog preopterećenja. U slučajevima obilnog povraćanja i/ili dijareje potrebno je kontrolirati elektrolitni i acidobazni status. Čim se smiri nagon na povraćanje treba pokušati i oralnu rehidraciju.¹¹⁴

Specifičnog lijeka za rotavirus nema. Ipak, postoje brojni lijekovi i ljekovita sredstva koji pokazuju određeno povoljno djelovanje u akutnom rotavirusnom gastroenteritisu. U novije vrijeme popularni su probiotici koji pokazuju određeno povoljno djelovanje u vidu kraćeg trajanja bolesti i manjeg broja proljevastih stolica. Od bioloških preparata koji su imali određeno povoljno djelovanje u akutnom rotavirusnom gastroenteritisu navode se imuni bovini kolostrum,^{57, 115} ljudski imunoglobulin uzet oralno,¹¹⁶ mlijeko od rotavirusom imuniziranih krava¹¹⁷ te bovini imunoglobulin.¹¹⁸ Hiperimuni kokošji imunoglobulin Y također je pokazao povoljno djelovanje u dvostruko slijepim randomiziranim studijama na malom broju ispitanika.¹¹⁹

Od različitih antidijaroika neki lijekovi pokazuju povoljan efekt, a u nekih potencijalne nuspojave poništavaju moguće povoljno djelovanje. Antimotilitetni lijekovi i agonisti opijatnih receptora (loperamid, kombinacije difenoksilata i atropina) imaju brojne nuspojave u djece od kojih su važnije letargija, paralitički ileus, toksični megakolon i depresivno djelovanje na središnji živčani sustav sve do kome. Zbog toga su ti lijekovi izbačeni iz preporuka za liječenje u djece.^{120, 121, 122}

Od antisekretornih lijekova u odraslih se može primijeniti bizmutov subsalicilat.¹²³ Unatoč povoljnom djelovanju u odraslih, zbog potencijalnog toksičnog djelovanja salicilata ne preporučuje se njegova upotreba u djece.¹¹⁴ U antisekretorne lijekove spada i noviji lijek racekadotril, inhibitor enkefalinaze. Nekoliko radova pokazalo je da se upotrebom racekadotрила u akutnom infektivnom gastroenteritisu smanjuje gubitak tekućine stolicom do 50 %.^{124, 125} Slični rezultati postignuti su i u dječaka

s dokazanom rotavirusnom infekcijom.¹²⁶ Prema smjernicama ESPGHAN 2014. racekadotril se može koristiti u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa.¹¹⁴

Enteroadsorbensi su inertni lijekovi mineralnog podrijetla koji imaju izraženo svojstvo adsorpcije. Ideja je da se adsorpcijom virusa u lumenu crijeva spriječi njihovo vezanje za stanice. Tako se sprječava njihovo prodiranje u stanicu te posljedično oštećenje crijeva. Nekada se u svrhu liječenja infektivnih proljeva često koristio medicinski ugljen (*carbo animalis*). Danas se on uglavnom koristi kao pomoćno sredstvo prilikom trovanja. Novije sredstvo - diosmektit (dioktahedral smektit) pokazalo se donekle učinkovitim u liječenju proljeva u djece, bez značajnijih nuspojava, pa se isto može primjenjivati u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa.¹²⁷ Na tržištu postoje još neki enteroadsorbensi kao što su kaolin-pektin i atapulgit-aktivni ugljen. Premda inicijalna istraživanja pokazuju povoljno djelovanje tih enteroadsorbensa, za sada je premali broj kvalitetnih istraživanja da bi se njihova rutinska primjena mogla preporučiti. U enteroadsorbense spada i još jedan noviji pripravak - polimetilsiloksan (Enterosgel®) čije djelovanje smo ispitivali našim istraživanjem.

Na kraju, može se spomenuti i antimikrobni lijek, nitazoksanid, lijek izbora za liječenje kriptosporidioze i giardioze te još nekih protozoalnih i parazitarnih infekcija. U jednom istraživanju pokazao je povoljno djelovanje u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa u djece u dobi 1-24 mj.¹²⁸ Za nitazoksanid vrijedi isto kao i za većinu prije navedenih lijekova: potrebna su dodatna i kvalitetnija istraživanja da bi se njegova upotreba mogla rutinski preporučivati.¹¹⁴

1.1.12. Cijepljenje

S obzirom na vrlo veliku incidenciju rotavirusne infekcije u cijelom svijetu, visok morbiditet i mortalitet te velike troškove zdravstvene skrbi, razvoj rotavirusnog cjepiva predstavljao je logičan imperativ, kako za zemlje u razvoju tako i za one razvijene. Iskustveno se znalo da preboljenje rotavirusne infekcije predstavlja zaštitu od teže rotavirusne bolesti u budućnosti stoga je razvoj cjepiva bio usmjeren u pravcu živih vakcina. Segmentirani genom rotavirusa omogućava relativno laku produkciju rekombinantnih sojeva. Inicijalno su korišteni bovini i majmuski sojevi za dobivanje vakcina, no rezultati

su bili ispod očekivanja.^{129, 130, 131, 132} Da bi životinjske sojeve više približili ljudskima i da bi se postigao bolji imunološki odgovor, u životinjske sojeve rotavirusa umetnuti su geni za VP4 i VP7 protein ljudskih sojeva rotavirusa.^{133, 134, 135, 136, 137} Taj princip doveo je kasnije do proizvodnje prve registrirane vakcine - Rotashield®.^{138, 139}

Rotashield® vakcina nastala je iz rotavirusa rezus majmuna (RRV). S obzirom na to da je majmunski soj imao slabu imunogenost, njemu su dodani sojevi koji su sadržavali genom za VP7 protein ljudskih serotipova G1, G2 i G4, a G3 serotip bio je od soja RRV. Takva vakcina bila je tetravalentna. Pružala je dobru zaštitu, osobito od teže bolesti.¹⁴⁰ Glavni nedostatak bila je nešto veća učestalost vrućice nakon prve doze.^{141, 142, 143} Nakon licenciranja te vakcine u SAD 1998. godine, u roku manjem od godinu dana zamijećen je porast broja invaginacija u djece 3-14 dana nakon prve doze.^{144, 145} Rizik je bio otprilike 1:10000-12000 doza.¹⁴⁶ Rizik je bio veći za djecu stariju od 90 dana.¹⁴⁷ Unatoč tome što je djelotvornost cjepiva bila velika (gotovo 100 % u prevenciji hospitalizacije zbog rotavirusne infekcije), cjepivo je ubrzo povučeno s tržišta od strane proizvođača.¹⁴⁸

Drugo cjepivo koje je licencirano (2004. u Meksiku, 2008. u SAD-u) je Rotarix®. To je cjepivo bazirano na ljudskom soju 89-12, serotipa G1P[8]. Ovaj soj potiče od djeteta koje je njime bilo inficirano u državi Ohio, SAD. Soj je atenuiran multiplim pasažama u kulturama tkiva.¹⁴⁹ Konačni purificirani soj nazvan je RIX 4414 koji je kasnije dobio tržišno ime Rotarix.¹⁵⁰ Dakle, to je monovalentno cjepivo, u cijelosti podrijetla od ljudskog soja rotavirusa. Cjepivo je pokazalo dobru učinkovitost.¹⁵¹ Prema prvim istraživanjima u Finskoj tijekom dvije sezone zaštita od rotavirusne bolesti bila je 72 %, a od teže bolesti 85 %.¹⁵² Cijepljenje ovim cjepivom nije bilo praćeno vrućicom. Još važnije, nije bilo praćeno invaginacijom.¹⁵³ Kasnija velika istraživanja pokazala su još bolju zaštitnost, čak i protiv heterotipnih sojeva.

Treće cjepivo koje je licencirano (2006. SAD) je RotaTaq®. Ono je podrijetlom iz bovinog soja WC3. Taj soj se slabo razmnožava u ljudskim crijevima, ali potiče stvaranje neutralizirajućih protutijela klase IgG i IgA.¹⁵⁴ Kako su inicijalna istraživanja pokazala značajnu zaštitnost, ovaj soj je rekombiniran s genima rotavirusa ljudskog podrijetla za proteine VP4 i VP7. Cjepivo je kombinacija pet rekombinantnih

sojeva virusa koji sadrže VP7 proteine od ljudskih sojeva G1, G2, G3 i G4 te gen ljudskog soja za protein VP4 genotipa P[8], tako da je cjepivo peterovalentno (RV5). Ostali proteini su bovinog podrijetla.¹⁵⁵ I za ovo cjepivo potvrđena je dobra efikasnost i mala učestalost nuspojava. Cijepljenje nije praćeno vrućicom i nije povezano s invaginacijom.^{156, 157} U SAD-u je masovna imunizacija ovim cjepivom dovela do značajnog smanjenja pojavnosti bolesti i hospitalizacija.¹⁵⁸ U sezoni 2009/2010. godine prvi put nije dosegnut prag za proglašenje rotavirusne epidemije. Broj oboljelih od rotavirusnog gastroenteritisa smanjio se ne samo u cijepljenoj populaciji nego i među starijom djecom i odraslima.¹⁵⁹

Oba danas licencirana cjepiva (Rotarix i RotaTeq) pružaju dobru zaštitu i imaju malu učestalost nuspojava. Ipak, oba cjepiva pokazuju značajno manju zaštitnost u zemljama u razvoju. Što je zemlja siromašnija, veća je vjerojatnost neuspjeha cijepljenja.¹⁶⁰ Nije do kraja jasan razlog te pojave. Mogući razlozi su sljedeći: dojenje i posljedično neutralizacija cjepnog soja majčinih protutijelima, koinfekcije s drugim virusima, slabija ishranjenost djece i stoga slabija mogućnost stvaranja protutijela.¹⁶⁰ Ipak, bez obzira na smanjenu efikasnost cjepiva u nerazvijenim zemljama, u konačnici je tamo korist od cijepljenja najveća jer je i smrtnost djece od rotavirusnog gastroenteritisa u tim zemljama najveća.

I dalje se prate moguće nuspojave licenciranih cjepiva. U nekim zemljama zamijećen je blagi porast invaginacija nakon cijepljenja s oba cjepiva (Brazil, Meksiko, Australija). Za sada je broj djece s invaginacijom daleko ispod onoga koji je zamijećen uz Rotashield i smatra se da korist od cijepljenja višestruko nadmašuje eventualni rizik od invaginacije.

Zbog smanjene efikasnosti današnjih živih cjepiva u siromašnim zemljama i dalje se radi na razvijanju neživih cjepiva. U prekliničkim studijama su korišteni inaktivirani virusi, virusima slične čestice, DNK vaccine i virusni proteini VP4, VP6 i VP7. Protein VP6 pokazao je dobru zaštitnost u miševa, a inaktivirani ljudski soj CDC-9 pokazao je dobru zaštitnost u gnotobiotičkih zamoraca.¹⁶¹ Ostaje za vidjeti hoće li se postići sličan stupanj zaštite i u ljudi.

1.2. PROBIOTICI

Po definiciji probiotici su živi mikroorganizmi čijom konzumacijom očekujemo određeno povoljno djelovanje na zdravlje.¹⁶² Termin "probiotik" postao je popularan 80-ih godina dvadesetog stoljeća premda sama ideja probiotika potiče od ruskog nobelovca Éliea Metchnikoffa. On još 1907. godine u djelu "Produljenje života: Optimističke studije" navodi da bi se dugovječnost bugarskih seljaka mogla povezati s njihovom navikom konzumacije fermentiranog mlijeka (jogurta). Razlog bi mogao biti zamjena "loših bakterija" u crijevima "dobrim bakterijama".¹⁶³

Zadnjih dvadesetak godina svjedoci smo prave tržišne ekspanzije raznih probiotika. Probiotici se prodaju s napomenom da poboljšavaju imunost, djeluju povoljno u liječenju i prevenciji proljeva, alergija, autoimunih bolesti i sl. Iako postoje brojni radovi u kojima je pokazano određeno povoljno djelovanje probiotika na imunološki sustav ili smanjenje simptoma određenih bolesti, mali je broj kvalitetnih radova, dvostruko slijepih, placebo kontroliranih studija kojima se nedvojbeno pokazuje povoljan učinak probiotika.¹⁶⁴ Rezultate različitih istraživanja teško je usporediti iz više razloga: nije jasno definirana "zdrava" mikrobiota, nije jasno definiran pojam imunološkog zdravlja, teško je odrediti točnu dozu probiotika i utjecaj dijetnog režima na probiotike, često su nejasno definirane ciljane skupine ispitanika, a poznato je da se crijevna mikrobiota razlikuje po dobi.¹⁶⁵ Crijevna mikrobiota je zadnjih godina predmet intenzivnih istraživanja jer se ona smatra jednim od glavnih imunoloških "organa" u tijelu. Njezina homeostaza odnosno poremećaj homeostaze dovode se u vezu s brojnim gastrointestinalnim tegobama, ali i bolestima izvan probavnog trakta.¹⁶⁶ Upotrebom novijih metoda kao što je metagenomika moći će se točnije definirati normalna crijevna flora u zdravlju i bolesti te utjecaj pojedinih probiotika na mikrobiotu.¹⁶⁷ Povoljno djelovanje probiotika moglo bi imati više mehanizama - kompeticiju s patogenim bakterijama za nutrijente, inhibiciju adhezije patogena za vezna mjesta na crijevnom epitelu, direktni antagonizam prema patogenima (posredstvom bakteriocina) ili indirektno djelovanje stimulacijom crijevnog imunološkog sustava.¹⁶⁸

Prvi rad koji je opisao djelovanje probiotika u djece s akutnim infektivnim proljevom bio je rad Isolaurija i suradnika iz 1991. godine.¹⁶⁹ U tom radu dokazano je da *Lactobacillus casei* GG (kasnije

preimenovan u *L. rhamnosus* GG, krat. LGG) dovodi do bržeg oporavka i kraćeg trajanja proljeva. Slijedili su radovi istih autora koji su dokazali povoljno djelovanje LGG-a na humoralnu imunost u djece s proljevom i nedjelotvornost inaktiviranog LGG-a u poticanju humoralne imunosti.^{170, 171} Prvi rad s *L. reuteri* u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa u djece bio je rad Shornikove i suradnika iz 1997. godine.¹⁷² U tom radu je na malom uzorku djece (N=40) pokazana djelotvornost probiotika koja se očitovala u manjoj učestalosti proljeva u liječenoj skupini. Drugi rad iste autorice pokazao je da je kraće trajanja proljeva povezano s ranijim davanjem i većom dozom probiotika.¹⁷³

Rosenfeldt i suradnici istraživali su ulogu *L. reuteri* u liječenju akutnog infektivnog proljeva u djece.¹⁷⁴ U tom istraživanju 69-ero djece bilo je podijeljeno u dvije skupine. Djeca koja su dobivala probiotik imala su manje učestale stolice od one koja su dobivala placebo, ali bez statističke značajnosti. No, nakon 5 dana od početka liječenja, samo troje liječene djece je još imalo proljev za razliku od skupine koja je dobivala placebo u kojoj je 13-ero djece nakon završetka pokusa i dalje imalo proljev. Djeca liječena probiotikom kraće su ostala u bolnici i kraće su izlučivala rotavirus od one koja su primala placebo. Isti autori istraživali su djelotvornost probiotika u djece s blažim gastroenteritisom koja su liječena ambulantno. Rezultati su pokazali djelotvornost probiotika u smislu skraćivanja trajanja proljeva, osobito u djece u koje je rano započeto liječenje.¹⁷⁵

Postoje i radovi koji govore protiv djelotvornosti probiotika. Costa Ribeiro i suradnici pokazali su na skupini djece s težim akutnim gastroenteritisom izostanak očekivanog povoljnog učinka davanja LGG-a.¹⁷⁶ Wanke i Szajewska istraživali su smanjuje li se učestalost bolničkih rotavirusnih infekcija davanjem *L. reuteri*. Nije bilo nikakvog smanjenja incidencije u odnosu na kontrolnu skupinu koja je dobivala placebo.¹⁷⁷

Od brojnih probiotika na tržištu samo je nekoliko njih pokazalo djelotvornost u više randomiziranih kontroliranih studija. Najbolje su proučeni *Lactobacillus rhamnosus* GG i *Saccharomyces boulardii* i za njih postoji čvrsta preporuka za upotrebu u akutnom gastroenteritisu. Osim toga, preporuka postoji, premda nešto lošije evidentirana, i za *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Efikasnost probiotika u

liječenju akutnog gastroenteritisa povezana je s dozom^{178, 179} tako da za LGG ona iznosi bar 10^{10} CFU/dan, za *S. boulardii* 250-750 mg/dan, a za *L. reuteri* $10^8 - 4 \times 10^8$ CFU/dan.

1.3. ENTEROADSORBENSI

Adsorpcija je površinsko vezanje manje kondenzirane supstancije za jače kondenziranu, npr. plina na ugljen, a primjenjuje se za uklanjanje nepoželjnih sastojaka iz tekućina i plinova.¹⁸⁰ U medicini se koriste razni adsorbensi. Najpoznatiji je medicinski ugljen (*carbo animalis*). Danas se uglavnom koristi kao enteroadsorbens prilikom trovanja gljivama ili lijekovima.¹⁸¹ Nekad se često koristio i u liječenju akutnog gastroenterokolitisa, ali je danas za tu svrhu opsolentan i zamijenjen drugim adsorbensima i lijekovitim sredstvima. Osim medicinskog ugljena kao enteroadsorbensi se koriste i druge mineralne tvari koje su podrijetlom gline, a po sastavu silikati aluminijski i/ili magnezijev te njihove kombinacije. Na tržištu zapadnih zemalja nalaze se još kaolin-pektin, atapulgit-aktivni ugljen i deosmektit. Prva dva se ne preporučuju u svrhu liječenja akutnog gastroenteritisa jer nema dovoljno kvalitetnih studija koje bi opravdale njihovu upotrebu u tu svrhu.¹¹⁴ Postoji nekoliko dobrih novijih istraživanja koja pokazuju povoljno djelovanje deosmektita u liječenju akutnog gastroenteritisa, ali niti jedno nije učinjeno u razvijenim zemljama.¹⁸² Zaključak je Europskog udruženja za dječju gastroenterologiju i hepatologiju (krat. ESPGHAN) da se deosmektit može razmotriti u liječenju akutnog gastroenteritisa u djece.¹¹⁴

Polimetilsiloksan (Enterogel) je organosilikonski materijal koji ima jedinstvene adsorptivne sposobnosti. Slabo veže tvari niske molekularne mase (do 1,5 kDa) dok, naprotiv, dobro adsorbira tvari velike molekularne mase kao što su bjelančevine i bakterijski toksini. Izrazito je hidrofoban i ne apsorbira se iz probavog trakta.¹⁸³

Početna istraživanja s polimetilsiloksanom pokazala su njegovu netoksičnost i potencijalnu korisnost u liječenju brojnih abdominalnih bolesti - divertikulitisa, peptičkog ulkusa, virusnog hepatitisa, jetrene i bubrežne insuficijencije te u brojnim drugim indikacijama.^{184, 185, 186, 187, 188, 189} Dzyublik, Shun'ko i Barbova istražili su djelovanje Enterosgela u liječenju akutnog gastroenteritisa u novorođenčadi.

Istraživanje je provedeno na 150 novorođenčadi s akutnim gastroenteritisom, s tim da je u 50-ero dokazana rotavirusna infekcija.^{190,191} U djece koja su liječena Enterosgelom došlo je do značajnog poboljšanja po gotovo svim kliničkim kriterijima - imala su brži klinički oporavak, kraće trajanje vrućice, proljeva, hiperbilirubinemije, izlučivanja virusa stolicom i bolničkog liječenja. Imala su i manju učestalost komplikacija - nekrotizirajućeg enterokolitisa i toksikoze.

Drugo istraživanje koje se tiče uporabe Enterosgela u rotavirusnim infekcijama u djece je ono Sharonine i suradnika,¹⁹² međutim, u tom je radu Enterosgel samo jedan od korištenih preparata, tako da nije do kraja jasna njegova uloga. Navodi se samo da su djeca liječena enteroadsorbensima imala kraće trajanje proljeva (4 : 5,5 dana) i kraće trajanje bolničkog liječenja (6,5 : 7,5 dana) u odnosu na djecu koja nisu primala enteroadsorbens. U istraživanju Uchaikina i suradnika¹⁹³ na 40-ero djece s akutnim crijevnim infekcijama uspoređeno je djelovanje Enterosgela i furazolidona i pokazano je da su djeca liječena Enterosgelom imala brži oporavak i kraće trajanje simptoma. Iz navedenog možemo pretpostaviti povoljno djelovanje Enterosgela u liječenju akutnog rotavirusnog gastroenteritisa.

2. HIPOTEZA

Enteroadsorbens polimetilsiloksan novo je lijekovito sredstvo na hrvatsom tržištu. Uvidom u dosadašnja istraživanja pretpostavljamo da će njegova djelotvornost u liječenju akutnog rotavirusnog gastroenteritisa biti jednaka djelotvornosti dosadašnjeg standarda odnosno probiotika. Za probiotik smo izabrali *L. reuteri* DSM 17938.

3. CILJEVI

Glavni cilj:

- Ispitati djelotvornost novog ljekovitog sredstva enteroadsorbensa polimetilsiloksana (Enterogel®) u liječenju akutnog rotavirusnog gastroenteritisa u djece u dobi 6-36 mjeseci. Da bismo to ispitali usporedili smo standardno ljekovito sredstvo, probiotik *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri* DSM 17938 - BioGaia®) s novijim, enteroadsorbensom polimetilsiloksanom u vidu otvorene randomizirane kontrolirane studije. Ovu vrstu studije izabrali smo zbog različitih fizičkih svojstava lijeka (kapi vs. gel) te zbog toga nismo mogli napraviti bolji odnosno dvostruko slijepi pokus.

Ostali ciljevi:

- Utvrditi moguća nepovoljna djelovanja (nuspojave) oba ispitivana ljekovita sredstva.
- Analizirati klinička obilježja djece s rotavirusnom infekcijom i primijeniti postojeće dvije ocjenske ljestvice za kliničku procjenu težine bolesti uzrokovane rotavirusom, Vesikarijevu i Clarkovu te ispitati svrstavaju li obje ljestvice ispitanike na isti način, odnosno u istu težinsku skupinu. Težinu bolesti ćemo poslije usporediti u obje skupine bolesnika, u onih koji su primali ispitivani lijek (Enterogel) i u onih koji su primali standard (BioGaia). Prema dosadašnjim istraživanjima na relativno velikom broju ispitanika ove dvije ljestvice ne svrstavaju bolesnike na isti način (Vesikarijeva ljestvica svrstava veći dio bolesnika u skupinu s "teškim oblikom bolesti").^{194, 195}

- Utvrditi učestalost nekih rjeđih manifestacija rotavirusne infekcije kao što su konvulzije, povišene vrijednosti jetrenih transaminaza, osipa, respiratornih simptoma te utvrditi učestalost respiratorne ili crijevne koinfekcije.
- Utvrditi učestalost nekih rijetkih komplikacija rotavirusne infekcije kao što su postinfektivna enteropatija, bakterijemija iz crijeva, serumska bolest, reaktivni artritis i dr.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. ISPITANICI

Ispitanici su djeca s dokazanom rotavirusnom infekcijom liječena u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu putem dnevne bolnice i/ili klasične hospitalizacije u razdoblju od siječnja 2013. do svibnja 2017. godine.

Uključni kriteriji za studiju bili su:

1. suglasnost roditelja ili staratelja
2. dob 6-36 mjeseci u trenutku uključenja u studiju
3. trajanje simptoma bolesti manje od 48 h do primjene prve doze ispitivanog lijeka
4. dokazana rotavirusna infekcija standardnom (imunokromatografskom) metodom

Isključni kriteriji za studiju bili su:

1. preboljenje rotavirusne infekcije u anamnezi djeteta
2. prethodno cijepljenje protiv rotavirusa
3. teže kronične bolesti koje bi mogle imati utjecaj na ishod liječenja kao što su imunodeficijencije, srčana insuficijencija, kronične bolesti probavnog sustava (upalne bolesti crijeva, malapsorpcija, alergija na sastojke hrane, insuficijencija jetre ili gušterače i dr.).

Nakon inicijalnog pregleda u hitnoj prijemnoj ambulanti Klinike, ovisno o stanju djeteta, a u dogovoru s roditeljima, predlaže se primitak djeteta u dnevnu bolnicu odnosno u bolnicu klasičnom hospitalizacijom radi parenteralne rehidracije. Za vrijeme boravka u dnevnoj bolnici dijete se opservira, prate se njegove vitalne funkcije, broj stolica, mokrenje, uzimanje tekućine, tjelesna temperatura i dr. Nakon isteka infuzije dijete se otpušta kući s preporukom kontrole u dnevnoj bolnici sljedeći dan ili po potrebi, ovisno o stanju djeteta prema procjeni dežurnog liječnika.

Anamnestičke podatke uzimali su dežurni liječnici od roditelja ili staratelja u pratnji uz nadopunu od strane ispitivača. Stanje djeteta pri prijemu procijenili su dežurni liječnici, odnosno liječnici koji su u tom trenutku radili u ambulanti za hitan prijem djece.

Po dokazivanju rotavirusne infekcije roditeljima je predloženo sudjelovanje u našem istraživanju kojim bi se ispitivala djelotvornost novog ljekovitog sredstva polimetilsiloksana (Enterosgel) u usporedbi sa standardnim sredstvom - probiotikom (BioGaia). U skladu s tim roditelji su dobili "Obavijest za ispitanika" kojim su obaviješteni o detaljima istraživanja, njihovoj ulozi i mogućim prednostima i nedostacima sudjelovanja u istraživanju. Roditelji, odnosno staratelji, koji su pročitali Obavijest za ispitanika, potom su potpisali "Obaviješteni pristanak" i time je njihovo dijete postalo sudionikom istraživanja.

Roditelji koji su pristali da njihovo dijete sudjeluje u istraživanju dobili su nasumično jedno ljekovito sredstvo (Enterosgel ili BioGaia) s potrebnim uputama o načinu primjene i "Upitnik" za praćenje simptoma bolesti kod kuće. S obzirom na to da postoji dokaz da doza probiotika linearno korelira s učinkovitošću, a nisu zapažene nuspojave vezane uz povećanje doze, mi smo u našem istraživanju odlučili povećati terapijsku dozu *L. reuteri* s preporučene $1-4 \times 10^8$ na $1,2 \times 10^9$ CFU/dan. Enterosgel je primijenjen u dozi i na način kako to proizvođač preporučuje. Randomizacija ljekovitog sredstva je provedena računalno generiranom tablicom metodom permutiranih blokova (nasumična veličina bloka od 2 do 6) te su djeca pri uključivanju u studiju dobila jedan ili drugi lijek pri čemu se strogo poštivao prethodno generiran randomiziran slijed lijekova.

Upitnik kojeg su dobili roditelji služio je za bilježenje i praćenje simptoma bolesti djeteta kod kuće. Upitnik sadržava ime i prezime djeteta, redni broj, dob djeteta te tablicu za upis kliničkih podataka o tjelesnoj temperaturi, broju povraćanja te broju i konzistenciji stolica po danima. Kao prvi dan bolesti zabilježen je prvi dan simptoma – vrućice, povraćanja i/ili proljeva. Svaki bolesnik uključen u studiju praćen je osam dana od početka bolesti. Roditelji su upisivali podatke o tjelesnoj temperaturi mjerenoj rektalno. Podatke o broju povraćanja te broju i konzistenciji stolica upisivali su prema vlastitoj procjeni, a prema uputama koje su dobili od voditelja istraživanja. Kako bi se olakšalo vraćanje Upitnika ispitivaču, roditelji su s Upitnikom istovremeno dobili adresiranu kuvertu s poštanskom markom. U istraživanje su uključena samo djeca koja su ispunjavala kriterije za uključivanje i ako je poštom vraćen Upitnik.

Za prospektivan i retrospektivan upis svih kliničkih i laboratorijskih podataka za djecu uključenu u istraživanje kreirana je baza podataka (Microsoft Access 2007). (Slika 2).

The form is divided into several main sections:

- Pacijent:** PREZIME, IME, Spol (1: muško, 2: žensko), Datum rođenja, Dob pri početku simptoma (god), Dan bolesti pri prijemu, Bolnička infekcija, Koji dan hospitalizacije se pojavila bolnička infekcija, KI - BOLNIČKA INFEKCIJA (re hosp. <72h od otpusta ili poč. simptoma >48h od prijema), Datum otpusta, Broj dana dbib, Trajanje bolesti, Trajanje bolesti do otpusta hospitalizacije, Trajanje bolesti.
- Uspostava:** hosp/DB/ambulantna, hospitalizacija: 1 (dnevna bolnica), 2 (ambulantna), 3 (db+hosp), 4.
- Klinička slika:** Procjena težine općeg stanja pri prijemu (dobro, blaže poremećeno, srednje teško, teško), Respiratorni simptomi (DA: 1, NE: 2), Respiratorna koinfekcija (DA: 1, NE: 2), Koja koinfekcija, Resp. izolat, Crijevna koinfekcija (DA: 1, NE: 2), GI izolat, konvulzije (DA: 1, NE: 2), Komplikacije rota infekcije (Postinf. enteropatija, Bakterijemija), Hemokultura izolat, Kozne promjene, Ostale komplikacije.
- LAB. NALAZI:** SE, CRP, L, seg, urea, kreatinin, Na, K, Cl, AST, ALT, pH, BE, urin keto, stolica cito, neutrofili, UZV abdomena (b.o., nije b.o., nije raden).
- Skorovi:** Vesikari SCORE, Clark SCORE, Ukupan broj stolica.
- EPIDEMIOLOŠKI PODACI:** Dojenje (NE, DA <1mj, DA <=6mj, DA >6mj, DA još se doji), Kronična bolest (NE, DA), Kolektiv (jaslice/vrtić) (DA, NE), Član obitelji s povraćanjem/proljevom unatrag 1 tj. (DA, NE), Mjesto stanovanja (Sredina, Gradsko, Ruralna).
- Other:** Nuspojave, Komentar, MKB šifre otpusnih dg (MKB1: A08.0, MKB2, MKB3).

Slika 2. Obrazac za upis podataka za djecu s rotavirusnom infekcijom u istraživanju

U ovom istraživanju korištene su postojeće ocjenske ljestvice za procjenu težine rotavirusne infekcije kod djece: Vesikarijeva⁹⁷ i Clarkova ljestvica.¹³⁵ Na Slici 2 vidi se koje kliničke parametre pojedina ocjenska ljestvica uzima u obzir, a vidljivo je i da su to kategorijske varijable.

4.2. LABORATORIJSKE METODE

Osnovne biokemijske, hematološke i biokemijske pretrage učinjene su na Odjelu za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom pri Centralnom dijagnostičkom laboratoriju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

Krvna slika učinjena je na automatskom brojaču marke Beckman Coulter UniCel DxH 800, USACoulter. Iznimno, kada je brojač registrirao prevelika odstupanja, diferencijalna krvna slika provjerena je mikroskopiranjem.

Osnovne biokemijske pretrage (GUK, ureja, kreatinin, elektroliti, AST, ALT) učinjene su na biokemijskom analizatoru marke Beckman Coulter AU 680, USA.

Acidobazni status učinjen je na aparatu Siemens Healthineers RapidLab 348, Germany.

Mikrobiološke analize učinjene su u Zavodu za kliničku mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti.

Za dokazivanje rotavirusne infekcije koristio se komercijalni imunokromatografski test Rota-AdenoGnost test[®] (BioGnost, Hannover, Germany).

Analiza respiratornih sekreta za djecu s respiratornim koinfekcijama učinjena je, kako je to i uobičajeno, u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u Odsjeku za respiratorne viruse (respiratorni sincicijski virus, humani metapneumovirus, virusi parainfluenze, adenovirus) te Odsjeku za molekularnu dijagnostiku (dijagnostika i tipizacija virusa influenze).

4.3. STATISTIČKE METODE

Podaci o ispitanicima u času uključenja u studiju sažeti su metodama deskriptivne statistike prema tretmanu. Primarna i sekundarna mjera djelotvornosti (vrijeme do izlječenja, vrijeme do otpusta iz bolnice) analizirani su regresijom proporcionalnog hazarda. Razlika između tretmana izražena je kao omjer hazarda (engl. "hazard ratio", HR), tj. trenutni relativni rizik za događaj (izlječenje, otpust). Analiza je učinjena bez (univarijatna) i s (multivarijatna) podešenjem za svojstva bolesnika na početku liječenja. "Učinci" tih kovarijata također su iskazani kao HR. Tercijarna mjera djelotvornosti (ukupan broj stolica) uspoređena je između tretmana samo u univarijatnom testu (Mann-Whitney test za razliku medijana). Podaci o neželjenim učincima ("nuspojave") sažeti su kao postoci. Podaci o epidemiološkim svojstvima bolesnika analizirani su metodama deskriptivne statistike.

Za usporedbu Clarkove i Vesikarijeve ljestvice, namjera je bila procijeniti njihovu brojčanu podudarnost, što se, s obzirom na različito bodovanje pojedinih simptoma, pokazalo neprikladnim. Stoga je odnos dva skora procijenjen na temelju jednostavne linearne regresije, a svaki je skor pojedinačno procijenjen kao mogući prognostički čimbenik vremena do izlječenja, u regresijskoj analizi vremena do izlječenja sa skorom kao nezavisnom varijablom.

Korišten je računalni program SAS for Windows 9.4 (SAS Inc., Cary, NC) licenciran na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

5. REZULTATI

Ispitanici uključeni u ovo istraživanje su djeca u dobi od šest mjeseci do tri godine, s dokazanom rotavirusnom infekcijom unutar prvih 48 h bolesti, bez obzira je li dijete rotavirusnu infekciju akviriralo u općoj populaciji ili u sklopu bolničke infekcije (bolnička infekcija je definirana pojavom simptoma bolesti nakon 48 h od primanja u bolničku ustanovu ili pojavom simptoma unutar 72 h nakon prethodnog boravka u nekoj bolničkoj ustanovi). U sve djece uključene u ovo istraživanje bila je potrebna parenteralna rehidracija stoga su liječena putem dnevne bolnice ili klasičnom hospitalizacijom u Zavodu za infektivne bolesti djece Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu u razdoblju od siječnja 2013. godine do svibnja 2017. godine. Nakon informiranog pristanka roditelja djeca su nasumično dobila ili lijek 1 (ispitivani lijek) ili lijek 2 (standardni lijek) unutar prvih 48 h sati od početka bolesti.

Nakon poboljšanja općeg stanja djeca su otpuštena kući. Kako bi se dobio uvid u tijek rotavirusne infekcije i eventualne tegobe pri primjeni ispitivanih lijekova kod svakog pojedinog djeteta roditelji su po otpustu popunjavali Upitnik koji je potom trebao biti vraćen ispitivaču.

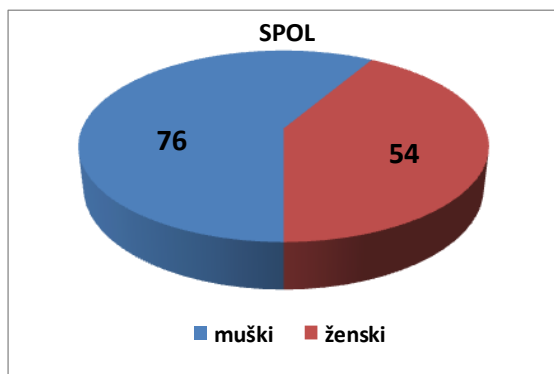
U ovo istraživanje je uključeno inicijalno 149 djece koja su nakon informiranog pristanka roditelja dobivali lijek 1 ili 2. Međutim, 19 anketa nije vraćeno te podaci za tu djecu nisu uzeti u statističku analizu. Broj djece za koju su retrogradno kompletirani svi klinički podaci uvidom u popunjene ankete je 130.

Broj djece koja su nakon randomiziranog odabira lijeka dobila Enterosgel jednak je broju djece koja su dobila BioGaiu i iznosi 65 djece u svakoj grupi.

5.1. OBILJEŽJA DJECE S ROTAVIRUSNOM INFEKCIJOM

5.1.1. Opći podaci

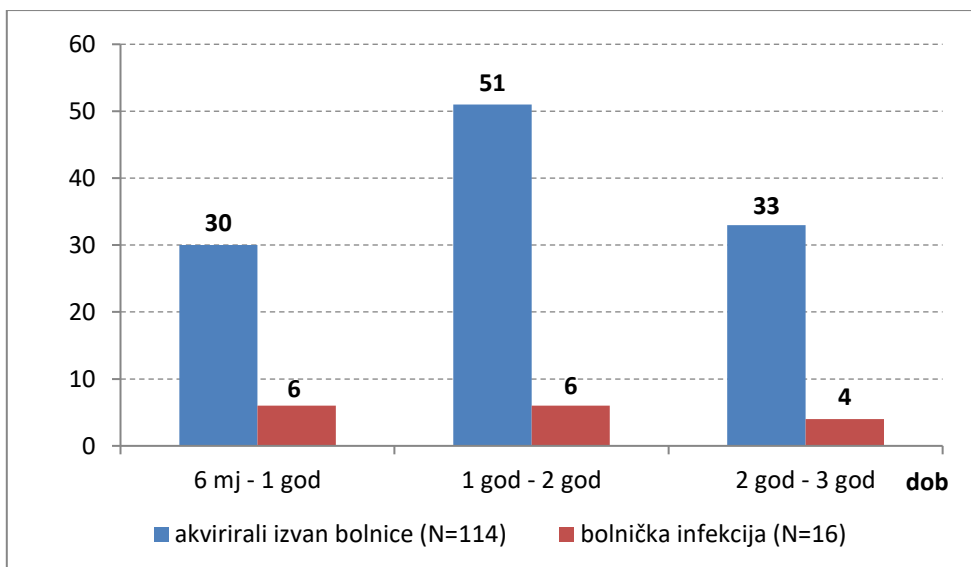
Od 130 djece u dobi od šest mjeseci do tri godine uključenih u statističku analizu, dječaka je bilo 76 (58,5 %), a djevojčica 54 (41,5 %) (Slika 3). Medijan dobi djece pri prijemu u dnevnu bolnicu ili hospitalizaciju bio je 1,42 godine (min 0,53 godine, max 2,99 godine).



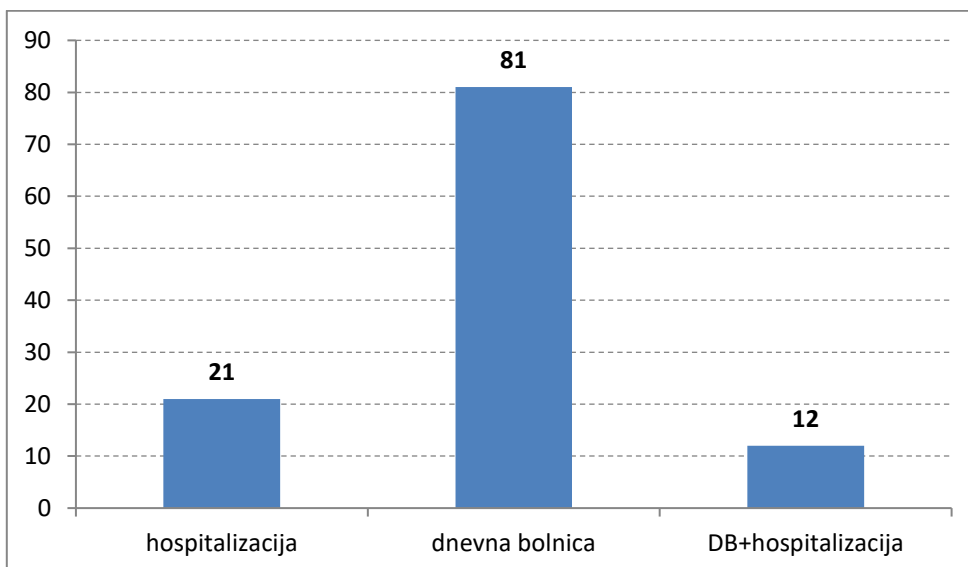
Slika 3. Raspodjela djece s rotavirusnom infekcijom po spolu (N=130)

Djece koja su dobila rotavirusnu infekciju u dobi od 6 mjeseci do 1 godinu bilo je 36, djece u dobi 1-2 godine bilo je 57, a djece u dobi 2-3 godine bilo je 37. Relativno mali broj djece s bolničkom rotavirusnom infekcijom uključen je u ovo istraživanje (N=16). Na Slici 4 prikazana je raspodjela djece po dobi prema mjestu zaražavanja rotavirusom.

Od 114 djece koja su akvirirala rotavirusnu infekciju izvan bolničke sredine 21 dijete (18,4 %) je zbrinjavano na bolničkom odjelu, 81 dijete (71,1 %) u dnevnoj bolnici, a 12 djece (10,5 %) je, nakon inicijalne parenteralne rehidracije u dnevnoj bolnici, zbog daljnjeg učestalog povraćanja i/ili proljeva hospitalizirano te je boravilo na odjelu do poboljšanja odnosno regresije simptoma (Slika 5).



Slika 4. Raspodjela djece s rotavirusnom infekcijom prema dobnim skupinama i mjestu akviriranja rotavirusne infekcije



Slika 5. Broj djece s rotavirusnom infekcijom iz opće populacije prema mjestu zbrinjavanja u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu (N=114)

5.1.2. Epidemiološki podaci

Rotavirusna infekcija, poput još nekih crijevnih infekcija, ima veliki epidemijski potencijal te se uobičajeno pri pregledu djece s gastrointestinalnim simptomima rutinski postavljaju pitanja pohađa li dijete kolektiv (jaslice, dječji vrtić), je li dijete bilo u kontaktu sa slično bolesnim osobama i je li itko od ukućana recentno imao slične gastrointestinalne simptome.

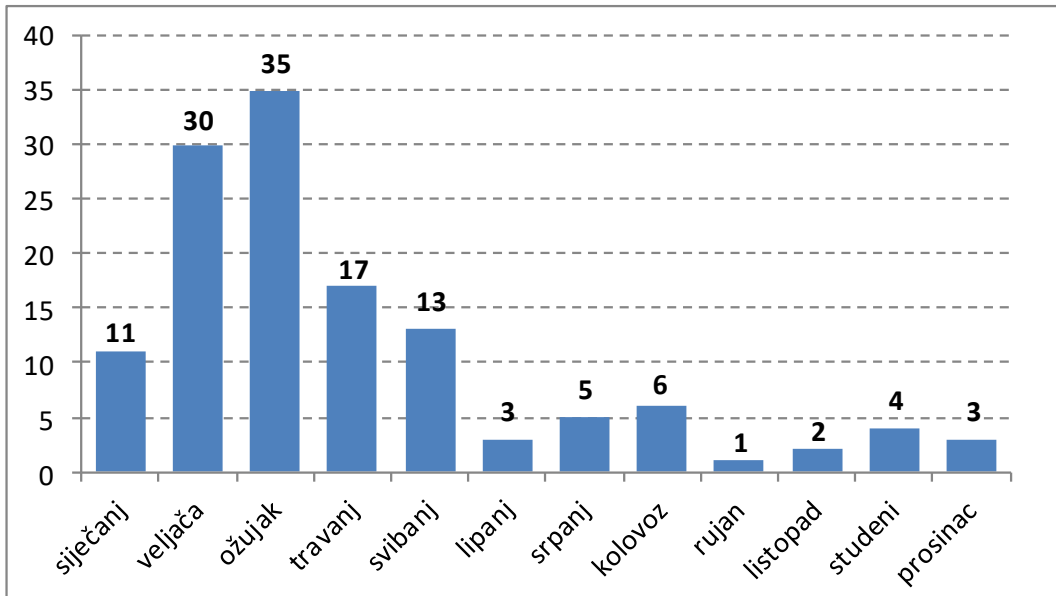
Od 130 djece uključenih u ovo istraživanje, 22 djece (16,9 %) imalo je člana obitelji sa sličnim gastrointestinalnim simptomima recentno ili istovremeno, a 108 djece nije bilo u kontaktu sa slično bolesnom osobom.

U kolektiv je išlo 55 djece (42,3 %), a 75 (57,7 %) nije. S obzirom na to da u Hrvatskoj djeca u dojenačkoj dobi uobičajeno ne idu u kolektiv, analizirano je 94 djece u dobi iznad 12 mjeseci, no rezultat nije bitno drugačiji: 54 od 94 ide u kolektiv (57,4 %), a 40 ne ide (42,6 %).

Od ukupnog broja djece uključenih u istraživanje iz gradske sredine je 102 djece (od toga 71 dijete živi u Zagrebu), a tek 27 je iz ruralne sredine.

Iako se smatra da je rotavirusna infekcija zimska bolest i veći broj oboljelih obično se registrira od jeseni pa sve do proljeća, raspodjela djece uključene u ovo istraživanje tome ne odgovara u potpunosti. Najveći broj djece zabilježen je od polovice zime do ranog proljeća (Slika 6). Broj djece iz ovog istraživanja koja su se razboljela u mjesecima siječanj - svibanj je 106 (81,5 %).

Podaci o dojenju su poznati za 95 djece: petero djece nije dojeno, devetero djece je dojeno samo u novorođenačkoj dobi, 32 djece je dojeno prvih šest mjeseci, a 31 dijete dulje od 6 mj. Pri pojavi simptoma bolesti 18 djece se još dojilo.



Slika 6. Raspodjela djece s rotavirusnom infekcijom prema kalendarskim mjesecima (N=130)

5.1.3. Laboratorijski podaci

Pri prijemu u dnevnu bolnicu/hospitalizaciju radi parenteralne rehidracije pri venepunkciji uzeta je krv za osnovne biokemijske pretrage (opseg pretraga odredio je dežurni liječnik u ambulanti za hitni prijem prema procijenjenom kliničkom stanju djeteta). Uobičajene biokemijske pretrage pri prijemu dehidriranog djeteta radi parenteralne rehidracije su: CRP, KKS, GUK, ureja, kreatinin, elektroliti, AST, ALT, a u manjeg broja djece koja izgledaju teže bolesno određuje se i acidobazni status i urin. Nisu svoj djeci rađene sve pretrage. Hospitaliziranoj djeci koja su dobila nozokomijalnu rotavirusnu infekciju navedene rutinske hematološke i biokemijske pretrage učinjene su pri kliničkom pogoršanju uz pojavu simptoma rotavirusne infekcije.

Medijan CRP-a (za 128 djece) iznosio je 4,45 mg/L (min 0,1 mg/L, max 44,8 mg/L). Medijan za leukocite u perifernoj krvi (za 128 djece) iznosio je $10,15 \times 10^9/L$ (min $3,3 \times 10^9/L$, max $30,6 \times 10^9/L$).

Elektrolitski disbalans je očekivan tijekom dehidracije zbog povraćanja i/ili proljeva. Od 130 djece hipernatremiju je imalo četvero djece (3,1 %), a hiponatremiju desetero (7,7 %). Hipokalijemiju je imalo četvero djece (3,1 %).

Tijekom dehidracije moguća je povišena vrijednost ureje (prerenalni uzrok). Medijan vrijednosti za ureju za 129 djece bio je 5,3 mmol/L (min 0,5 mmol/L, max 10,4 mmol/L) te je unatoč kliničkoj dehidraciji samo 48 djece (37,2 %) imalo povišenu vrijednost ureje iznad referentne vrijednosti za dob. Kreatinin je određen u 34 djece, a povišenu vrijednost je imalo dvoje djece (5,9 %).

Transaminaze (AST i ALT) su određene za 109 djece. Medijan vrijednosti za AST je bio 48 U/L (min 19 U/L, max 72 U/L), a medijan za ALT 30 U/L (min 9 U/L, max 140 U/L). Sva djeca uključena u ovo istraživanje imala su vrijednosti AST-a unutar referentnih vrijednosti za dob, a povišene vrijednosti ALT-a je imalo je 11 od 109 djece (10,1 %).

Djeci koja su pri inicijalnom pregledu bila srednje teškog općeg stanja (34 od 130) određen je acidobazni status. U metaboličkoj acidozi bilo je devetero djece.

Od 130 ispitivane djece svega dvoje je imalo crijevnu koinfekciju, u oba slučaja radilo se o infekciji bakterijom *C. jejuni*. Jedno dijete je imalo koinfekciju s HHV-6 virusom (trodnevnu vrućicu, "šestu" bolest).

Od ukupnog broja ispitanika njih 28-ero (21,5 %) imalo je respiratorne simptome odnosno neku respiratornu koinfekciju. U njih 16 respiratorni simptomi opisani su kao respiratorni katar, četvero je imalo upalu srednjeg uha (otitis media), troje bronhiolitis, dvoje pneumoniju i jedno gripu. Neki od njih imali su i dokazane uzročnike iz sekreta dišnih putova - u četvero je dokazani uzročnik bio respiratorni sincicijski virus (RSV), a po jedan izolat bio je adenovirus, virus parainfluence i virus influence.

Samo je jedno dijete imalo febrilne konvulzije u sklopu rotavirusne infekcije, a jedno je imalo blažu urtikariju koja je spontano prošla. Niti u jednog djeteta nismo zabilježili reaktivni artritis, hematološke poremećaje (neutropeniju, trombocitopeniju, anemiju), nodozni eritem, vaskulitis ili slične imunološki posredovane poremećaje.

U jednog djeteta dokazali smo bakterijemiju uzrokovanu bakterijom *E. faecalis*, no, u tog djeteta radilo se o urosepsi. Isti uzročnik dokazan je i iz urinokulture, dok je rotavirusni enteritis bio zapravo bolnička infekcija. Dakle, nije se radilo o bakterijemiji iz crijeva nego iz urotrakta.

Niti u jednog djeteta nije zabilježena postinfektivna enteropatija.

5.2. USPOREDBA DJECE KOJA SU DOBIVALA ENTEROADSORBENS

POLIMETILSILOKSAN (Enterogel) I PROBIOTIK *Lactobacillus reuteri* (BioGaia)

5.2.1. Obilježja djece u dvije terapijske skupine

Od 130 djece uključene u ovo randomizirano otvoreno kliničko istraživanje po 65 ih je bilo u svakoj terapijskoj skupini. Njihova su glavna obilježja, demografska, klinička i laboratorijska, pri započinjanju liječenja sažeta u Tablici 1. Dvije su skupine bile sasvim slične u svim aspektima. Za ukupno 16 djece (6 u skupini Enterogel, 10 u skupini BioGaia) rotavirusna infekcija je bila bolnička infekcija, a oko 3/4 djece u svakoj skupini bilo je blaže poremećnog općeg stanja. Sva djeca uključena u ovo istraživanje su parenteralno rehidrirana ili u dnevnoj bolnici ili tijekom bolničkog liječenja. Manji dio djece je nakon inicijalnog zbrinjavanja u dnevnoj bolnici zaprimljen na odjel klasičnom hospitalizacijom. Ukupni bodovi (skorovi) na Vesikarijevoj i Clarkovoj ljestvici težine kliničkih simptoma bili su praktično identični u obje skupine, kao i svi relevantni laboratorijski nalazi (Tablica 1).

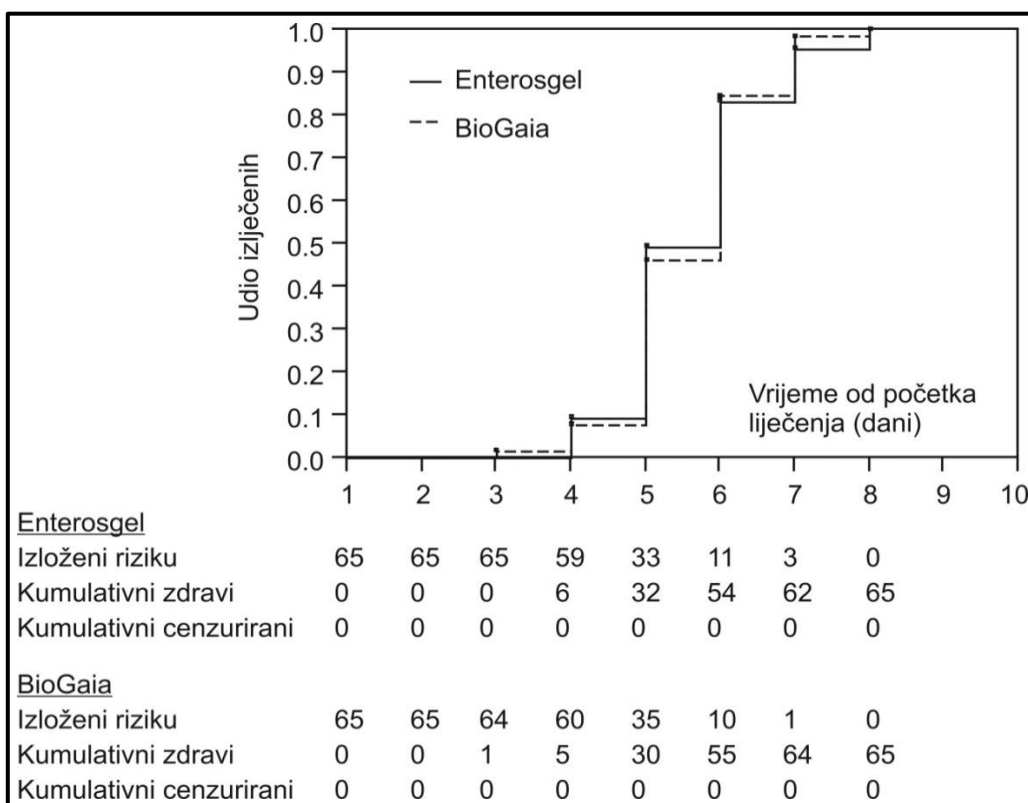
Tablica 1. Osnovna obilježja djece s rotavirusnom infekcijom u dvije terapijske skupine

| | Enterogel® | BioGaia® |
|---|-------------------|-----------------|
| DEMOGRAFSKI PODACI | | |
| N | 65 | 65 |
| Dob (mjeseci) | 17,4 (6,4-35,8) | 15,3 (6,3-35,9) |
| Dječaci | 39 (60,0) | 37 (56,9) |
| KLINIČKA OBILJEŽJA | | |
| Dan bolesti na početku studije (dani) | 1 (1-3) | 2 (1-2) |
| Opće stanje na početku studije | | |
| Dobro | 2 (3,1) | 1 (1,5) |
| Blaže poremećeno | 47 (72,3) | 49 (75,4) |
| Srednje teško | 16 (24,6) | 15 (23,1) |
| Teško | 0 | 0 |
| Način rehidracije | | |
| Oralna | 0 | 0 |
| Parenteralna | 65 (100) | 65 (100) |
| Vesikarijeva ljestvica kliničkih simptoma | 18 (11-20) | 17 (11-20) |
| Clarkova ljestvica kliničkih simptoma | 15 (9-20) | 15 (9-20) |
| Ukupan broj stolica | 23 (4-86) | 25 (6-84) |
| Respiratorni simptomi | 11 (16,9) | 17 (26,2) |
| Respiratorna koinfekcija | 7 (10,8) | 13 (20,9) |
| Gastrointestinalna koinfekcija | 2 (3,1) | 0 (0) |
| Bolnička infekcija | 6 (9,2) | 10 (15,4) |
| LABORATORIJSKI NALAZI | | |
| C-reaktivni protein (mg/L) | 4,0 (0,2-44,8) | 4,7 (0,1-41,7) |
| Broj leukocita ($\times 10^9/L$) | 9,5 (3,8-30,6) | 10,8 (3,3-27,3) |
| Udio neutrofilnih leukocita (%) | 72 (18-92) | 67 (10-95) |
| Urea u krvi (mmol/L) | 5,8 (0,5-10,4) | 5,1 (2,4-8,9) |
| Natrij (mmol/L) | 138 (131-144) | 138 (132-145) |
| Kalij (mmol/L) | 4,1 (3,2-5,1) | 4,3 (3,2-5,2) |
| Kloridi (mmol/L) | 102 (96-111) | 103 (96-113) |
| Aspartat aminotransferaza (IJ/L) | 50 (19-72) | 46 (22-71) |
| Alanin aminostransferaza (IJ/L) | 30 (10-140) | 30 (9-52) |
| MJESTO ZBRINJAVANJA BOLESNIKA | | |
| Hospitalizacija | 14 (21,5) | 19 (29,2) |
| Dnevna bolnica | 45 (69,2) | 38 (58,5) |
| Dnevna bolnica potom hospitalizacija | 6 (9,2) | 8 (12,3) |

5.2.2. Djelotvornost enteroadsorbensa polimetilsiloksana (Enterosgel) u usporedbi s probiotikom

Lactobacillus reuteri (BioGaia) u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa

Primarna mjera djelotvornosti u ovom kliničkom pokusu bilo je vrijeme (u danima) do izlječenja rotavirusnog gastroenteritisa. Izlječenje je definirano kao prva formirana stolica uz izostanak drugih simptoma rotavirusne infekcije (vrućica, povraćanje) ili izostanak stolice i drugih simptoma u trajanju 24 h i više ili vraćanje na uobičajen obrazac pražnjenja crijeva. Slika 7 sažima kumulativno postizanje izlječenja u dvije skupine: sva su djeca izliječena do najkasnije 8 dana od početka istraživanja s dinamikom potpuno usporedivom za dva tretmana – Kaplan-Meier procjena medijana vremena do izlječenja u obje je skupine iznosila 6 dana.



Slika 7. Kaplan-Meier krivulje kumulativnog ozdravljenja u dvije skupine djece s rotavirusnim gastroenteritisom

Tablica 2 prikazuje rezultate univarijatne i multivarijatne usporedbe dva tretmana (tretman 1: BioGaia; tretman 2: Enterogel) u pogledu (trenutnog) rizika izlječenja rotavirusnog gastroenteritisa (sažeti su rezultati regresije proporcionalnog hazarda). Bez podešenja za bilo kakve kovarijate (univarijatni model), trenutni rizik izlječenja (vjerojatnost) uz Enterogel bio je praktično identičan kao uz probiotik BioGaia (HR=0.94, 95 % CI 0,65-1,36; p=0,754). Isto vrijedi za odnos dva tretmana i u dva multivarijatna modela – Model 1 u Tablici 2 (HR=0,89, 95 % CI 0,60-1,32; p=0,567) u kojem je, uz druge kovarijate, uključen skor težine bolesti po Vesikarijevoj ljestvici te Model 2 u Tablici 2 (HR=1,06, 95 % CI 0,75-1,49; p=0,816) u kojem je uz druge kovarijate uključen skor težine bolesti po Clarkovoj ljestvici (umjesto Vesikarijave ljestvice).

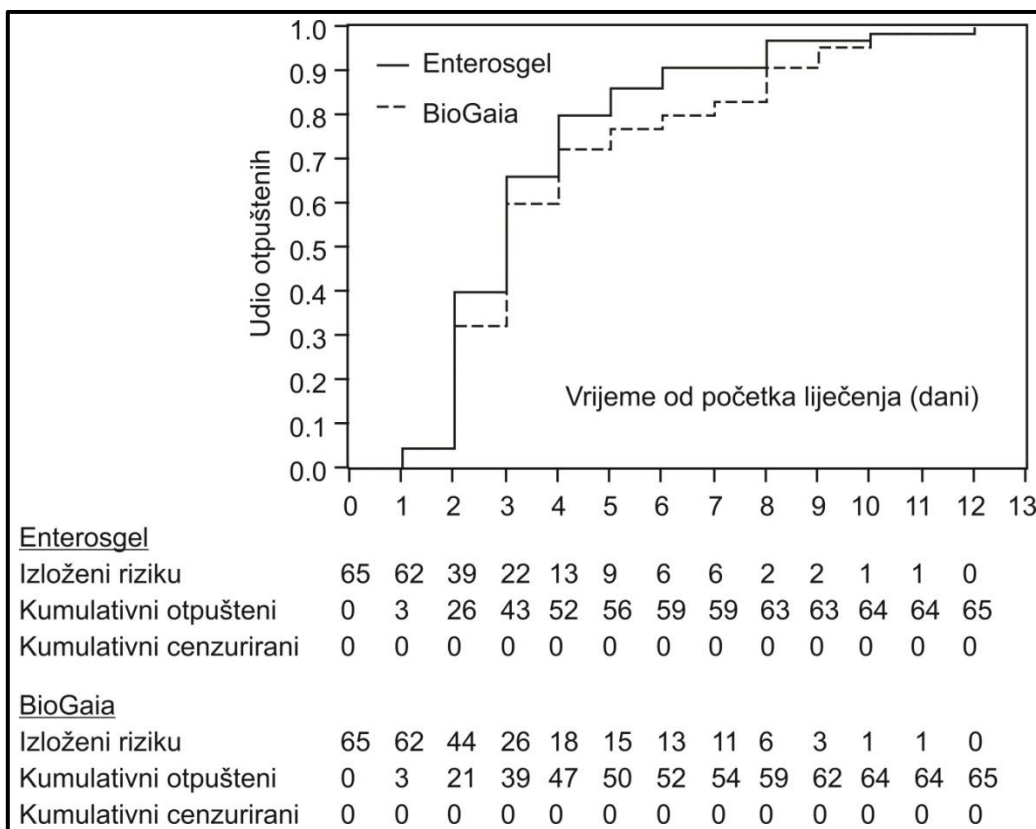
Multivarijatni modeli su primijenjeni kako bi se odredila sasvim nepristrana razlika između dva tretmana (bez obzira na randomizaciju), a kovarijate su uključene na temelju pretpostavke da bi možda mogle utjecati na ishod liječenja: dob, spol, radi li se o bolničkoj infekciji (pretpostavka je da djeca hospitalizirana prije razvoja rotavirusnog gastroenteritisa zbog nekog drugog stanja mogu imati drugačiji tijek bolesti), postoji li gastrointestinalna koinfekcija, dan trajanja bolesti pri uključanju u studiju (da se uzme u obzir ukupno trajanje bolesti budući da je spontano prolazna) i jedna od dvije ljestvice za ocjenu težine bolesti (Vesikari ili Clark). Osim što pokazuju da između dva tretmana nema neke relevantne razlike, rezultati u Tablici 2 daju i neke dodatne informacije – njih, međutim, treba shvatiti kao „usputne“, jer analiza nije ni zamišljena niti provedena da bi otkrila neku nezavisnu združenost pojedinih od njih s „brzinom izlječenja“, već da bi se procijenila nepristrana razlika između tretmana (modeli bi izgledali drugačije da im je namjena bila drugačija). Imajući to u vidu, oba multivarijatna modela ukazuju da je (trenutni) rizik ozdravljenja (HR) bio veći u starije djece (za oko 10 % relativno, za svaka 2 mjeseca starije dobi); da je bio manji kada se radilo o bolničkoj infekciji (za oko 93-95 % relativno) te da je bio manji što je skor na Vesikarijevoj ljestvici bio viši (za oko 51 % relativno, za svaka 2 boda skora više), odnosno što je skor na Clarkovoj ljestvici bio viši (za oko 35 % relativno, za svaka 2 boda skora više).

Tablica 2. Rezultati univarijatne i multivarijatne usporedbe dvaju tretmana u pogledu (trenutnog) rizika izlječenja rotavirusnog gastroenteritisa

| | HR (95 % CI) | P |
|--|---------------------|----------|
| UNIVARIJATNI MODEL | | |
| Enterogel® vs. BioGaia® | 0,94 (0,65-1,36) | 0,754 |
| MULTIVARIJATNI MODEL 1 | | |
| Enterogel® vs. BioGaia® | 0,89 (0,60-1,32) | 0,567 |
| Dob (za 2 mjeseca) | 1,11 (1,05-1,16) | <0,001 |
| Dječaci (vs. djevojčice) | 0,68 (0,45-1,03) | 0,069 |
| Bolnička infekcija (vs. izvanbolnička) | 0,07 (0,03-0,16) | <0,001 |
| Gastrointestinalna koinfekcija (vs. nema) | 0,49 (0,15-1,63) | 0,242 |
| Dan trajanja bolesti pri početku liječenja (za 1 dan) | 1,30 (0,95-1,78) | 0,102 |
| Skor na Vesikarijevoj ljestvici težine bolesti (za 2 boda) | 0,49 (0,38-0,63) | <0,001 |
| MULTIVARIJATNI MODEL 2 | | |
| Enterogel® vs. BioGaia® | 1,06 (0,75-1,49) | 0,816 |
| Dob (za 2 mjeseca) | 1,07 (1,03-1,12) | 0,002 |
| Dječaci (vs. djevojčice) | 0,71 (0,48-1,04) | 0,078 |
| Bolnička infekcija (vs. izvanbolnička) | 0,05 (0,02-0,11) | <0,001 |
| Gastrointestinalna koinfekcija (vs. nema) | 0,83 (0,19-2,51) | 0,834 |
| Dan trajanja bolesti pri početku liječenja (za 1 dan) | 1,42 (1,02-1,95) | 0,036 |
| Skor na Clarkovoj ljestvici težine bolesti (za 2 boda) | 0,65 (0,54-0,79) | <0,001 |

Sekundarna mjera djelotvornosti dvaju tretmana bilo je vrijeme od uključenja u studiju do prestanka bolničkog liječenja (bilo kojeg oblika): naime, u neke djece bolničko liječenje je moglo biti i dulje od trajanja bolesti (npr. djeca u kojih je rotavirusni gastroenteritis nastao kao hospitalna infekcija, a oni su prethodno hospitalizirani zbog nekog drugog stanja pa zbog tog istog stanja produljuju daljnje bolničko liječenje; ili je pak sam gastroenteritis izliječen, ali je potreban dodatni oporavak), ili pak kraće (npr. povoljan tijek bolesti gdje je kratkotrajna hospitalizacija bila dostatna pa se nastavak liječenja mogao provesti u kućnoj njezi, odnosno uz ambulantni nadzor). Ovaj pokazatelj nije izravno ilustrativan za samu djelotvornost tretmana, ali govori i o djelotvornosti i o mogućem utjecaju tretmana na eventualne komplikacije bolesti, odnosno ilustrativan je za cjelokupni tijek bolesti i mogući utjecaj tretmana. Slika 8

sažima kumulativno postizanje prekida bolničkog liječenja: sva su djeca prekinula bolničko liječenje do najkasnije 12 dana od početka studije s dinamikom potpuno usporedivom za dva tretmana – Kaplan-Meier procjena medijana vremena do otpusta u obje je skupine iznosila 3 dana.



Slika 8. Kaplan-Meier krivulje kumulativnog otpusta iz bolnice u dvije skupine djece s rotavirusnim gastroenteritisom

U Tablici 3 sažeti su rezultati dvaju multivarijantnih modela regresije proporcionalnog hazarda – identična onima u Tablici 2, samo što je analizirano vrijeme do otpusta iz bolnice (a ne do izlječenja gastroenteritisa). I u jednom (uključuje Vesikarijevu ljestvicu težine bolesti) i u drugom (uključuje Clarkovu ljestvicu težine bolesti), nije bilo razlike između dva tretmana u pogledu (trenutnog) rizika za otpust s bolničkog liječenja: HR=1,17 (95 % CI 0,80-1,72; p=0,419) i HR=1,25 (95 % CI 0,86-1,83; p=0,239).

Kao i prethodna, i ova analiza daje i još neke „usputne“ informacije: tako je (baš kao i rizik izlječenja), rizik za otpust iz bolnice bio veći u starije djece (za 7 % relativno, za svaka 2 mjeseca više), a bio je niži u djece gdje je rotavirusni gastroenteritis nastupio kao bolnička infekcija (za oko 93 % odnosno 95 % relativno). Rizik je bio manji što je bolest bila teža, po Vesikarijevoj (za 18 % relativno) ili po Clarkovoj ljestvici (za 19 % relativno). Prema Modelu 2, što je liječenje započeto u kasnijem danu trajanja bolesti, rizik otpusta iz bolnice bio je viši (za 42 % relativno) – odražavajući dijelom i spontano prolaznu prirodu bolesti. Ukupno, rezultati ove analize u skladu su s rezultatima analize primarne mjere djelotvornosti.

Tablica 3. Rezultati multivarijatne usporedbe dvaju tretmana u pogledu (trenutnog) rizika otpusta s bolničkog liječenja djece s rotavirusnim gastroenteritisom

| | HR (95 % CI) | P |
|--|---------------------|----------|
| MULTIVARIJATNI MODEL 1 | | |
| Enterogel® vs. BioGaia® | 1,17 (0,80-1,72) | 0,419 |
| Dob (za 2 mjeseca) | 1,07 (1,02-1,11) | 0,005 |
| Dječaci (vs. djevojčice) | 0,67 (0,46-0,99) | 0,041 |
| Bolnička infekcija (vs. izvanbolnička) | 0,07 (0,03-0,15) | <0,001 |
| Gastrointestinalna koinfekcija (vs. nema) | 0,49 (0,11-1,40) | 0,242 |
| Dan trajanja bolesti pri početku liječenja (za 1 dan) | 1,30 (0,95-1,79) | 0,102 |
| Skor na Vesikarijevoj ljestvici težine bolesti (za 2 boda) | 0,82 (0,74-0,92) | <0,001 |
| MULTIVARIJATNI MODEL 2 | | |
| Enterogel® vs. BioGaia® | 1,25 (0,86-1,83) | 0,239 |
| Dob (za 2 mjeseca) | 1,07 (1,03-1,12) | 0,002 |
| Dječaci (vs. djevojčice) | 0,71 (0,48-1,04) | 0,078 |
| Bolnička infekcija (vs. izvanbolnička) | 0,05 (0,02-0,11) | <0,001 |
| Gastrointestinalna koinfekcija (vs. nema) | 0,83 (0,19-2,51) | 0,834 |
| Dan trajanja bolesti pri početku liječenja (za 1 dan) | 1,42 (1,02-1,95) | 0,036 |
| Skor na Clarkovoj ljestvici težine bolesti (za 2 boda) | 0,81 (0,74-0,89) | <0,001 |

Konačno, kao treća mjera djelotvornosti uzet je ukupan broj stolica tijekom trajanja bolesti. U skupini liječenoj Enterosgelom taj broj je bio u rasponu od 4 do 86 (medijan 23), dok je u skupini liječenoj preparatom BioGaia taj broj bio u rasponu od 6 do 84 (medijan 25). Medijan razlika za Enterosgel – BioGaia iznosi -2 (95 % CI -6 do 3), $p=0,479$ (Mann-Whitney test) te ukazuje da niti prema tom ishodu između tretmana nije bilo relevantne razlike.

5.2.3. Sigurnost i podnošljivost enteroadsorbensa polimetilsiloksana (Enterosgel) u usporedbi s probiotikom *Lactobacillus reuteri* (BioGaia)

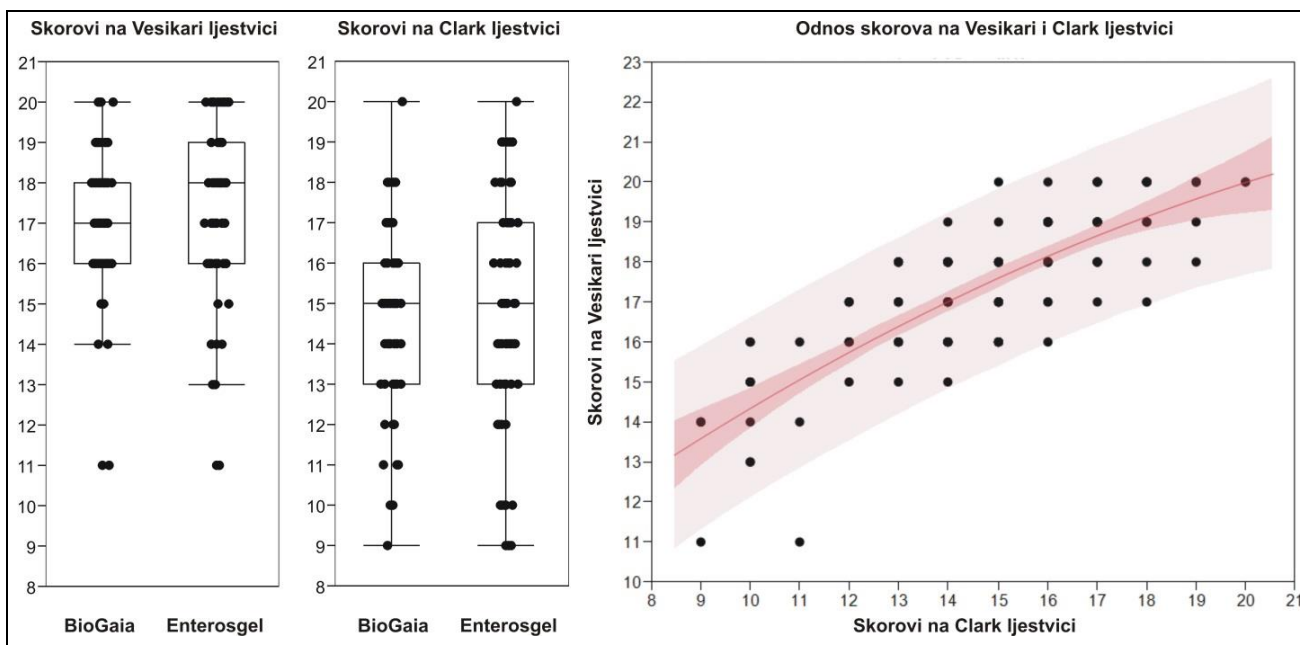
Neželjene pojave za koje je ocijenjeno da bi mogle biti povezane s lijekom za gastroenteritis zabilježene su u 1/65 djece liječene Enterosgelom i za 0/65 djece liječene BioGaia preparatom. U skupini djece koja su primala Enterosgel zabilježeni su u jednog djeteta blaga urtikarija i svrbež koji su spontano prošli bez intervencije. Neizravno, podatak da je vrijeme hospitalizacije bilo praktično identično za obje skupine djece govori da liječenje Enterosgelom nije bilo povezano s rizikom nekih ozbiljnih neželjenih učinaka u smislu općeg stanja ili tijeka osnovne bolesti u djece hospitalizirane zbog drugih stanja u koje je rotavirusni gastroenteritis bio bolnička infekcija.

5.3. USPOREDBA VESIKARIJEVE I CLARKOVE LJESTVICE U KLASIFIKACIJI TEŽINE BOLESTI I PREDIKTIVNOSTI ZA TLJEK ROTAVIRUSNOG GASTROENTERITISA U DJECE U DOBI 6 - 36 MJESECI

Vesikarijeva i Clarkova ocjenska ljestvica težine simptoma rotavirusnog gastroenteritisa uzimaju u obzir uglavnom iste elemente, ali ih drugačije boduju (Tablica 4). Pri tome, veći ukupan broj bodova znači težu bolest. Vesikarijeva ljestvica na temelju ukupnog broja bodova bolest klasificira ili kao „blagu“ ili kao „tešku“, dok Clarkova ljestvica klasificira bolest kao „blagu“, „umjerenu do tešku“ ili „tešku“ (Tablica 4). Kako je prikazano na Slici 9, sva su djeca u obje terapijske skupine po Vesikarijevoj ljestvici imala teški oblik bolesti (svi su skorovi bili ≥ 11). Isto tako, sva su djeca po Clarkovoj ljestvici imala „umjerenu do tešku“ (ukupno 97 od 130 djece) ili „tešku“ (ukupno 33 od 130 djece) bolest (svi su skorovi bili ≥ 9). S obzirom na to da niti jedno dijete uključeno u ovo istraživanje nije imalo blaži oblik bolesti, nije bilo moguće odrediti podudarnost između dvije ljestvice u smislu razvrstavanja djece s „blagim“, „teškim“ ili „umjerenim do teškim“ oblikom bolesti. Na Slici 9 vidi se i da između dvije ljestvice postoji očito „numeričko razilaženje“, iako je izvjesno da su više vrijednosti na jednoj ljestvici združene s višim vrijednostima na drugoj. Međutim, intervali predikcije iz regresije Vesikarijeva skora na Clark skor (Slika 9) vrlo su široki što govori da, u numeričkom smislu, „konverzija“ iz jedne u drugu ljestvicu – nema nikakvog smisla.

Tablica 4. Vesikarijeva i Clarkova ljestvica za procjenu težine rotavirusnog gastroenteritisa u djece

| LJESTVICA I ELEMENTI | BODOVI (teži simptom – više bodova) | | |
|---|-------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| VESIKARI (najviše 20 bodova) | | | |
| Trajanje proljeva (dani) | 1-4 | 5 | ≥6 |
| Najveći broj stolica/24 sata | 1-3 | 4-5 | ≥6 |
| Trajanje povraćanja (dani) | 1 | 2 | ≥3 |
| Najveći broj epizoda povraćanja/24 sata | 1 | 2-4 | ≥5 |
| Tjelesna temperatura (°C) | 37,1-38,4 | 38,5-38,9 | ≥39,0 |
| Dehidracija | nema | blaga | umjerena-teška |
| Liječenje | per os rehidracija | parenteralna rehidracija | --- |
| Ukupni bodovi: | | | |
| <11: blaga bolest | | | |
| ≥11: teška bolest | | | |
| CLARK (najviše 24 boda) | | | |
| Trajanje proljeva (dani) | 1-4 | 5-7 | ≥8 |
| Najveći broj stolica /24 sata | 2-4 | 5-7 | ≥8 |
| Trajanje povraćanja (dani) | 2 | 3-5 | ≥6 |
| Najveći broj povraćanja/24 sata | 1-3 | 4-6 | ≥7 |
| Trajanje temperature (dani) | 1-2 | 3-4 | ≥5 |
| Tjelesna temperatura (rektalno) (°C) | 38,0-38,2 | 38,3-38,7 | ≥38,8 |
| Trajanje promijenjenog ponašanja (dani) | 1-2 | 3-4 | ≥5 |
| Promijenjeno ponašanje | razdražljiv, neraspoložen | letargičan, ravnodušan | konvulzije |
| Ukupni bodovi: | | | |
| <9: blaga bolest | | | |
| 9-16: umjerena do teška bolest | | | |
| >16: teška bolest | | | |

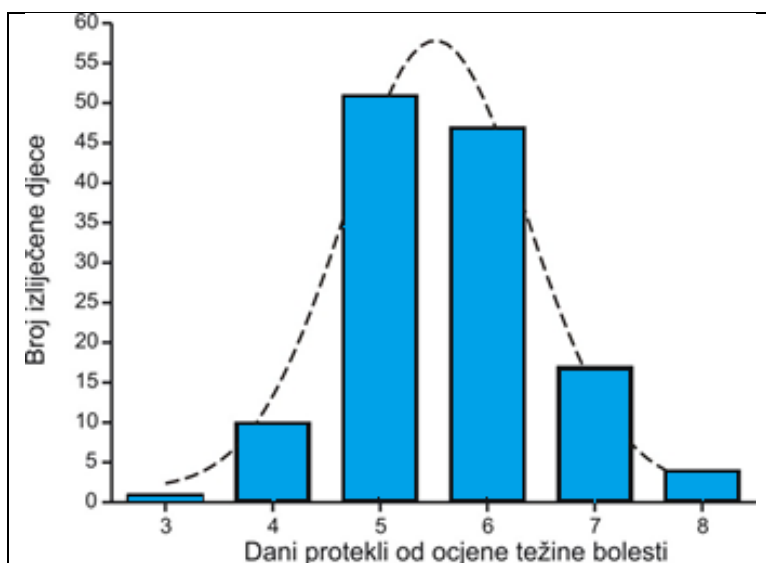


Slika 9. Individualne vrijednosti i odnos skorova na dvije ljestvice za ocjenu težine bolesti

Prikazane su individualne vrijednosti na obje ljestvice za djecu u dvije terapijske skupine (kružići) te su naznačeni medijani (horizontalne linije), kvartile (pravokutnici) i „unutarnje ograde“ (okomite crte). Vrijednosti izvan „unutarnjih ograda“ su odstojeće vrijednosti. Prikazan je i odnos skorova na Vesikari i Clark ljestvici (kvadratični „fit“) s 95 % granicama pouzdanosti (tamnije zasjenjenje) i 95 % intervalom predikcije (svjetlije zasjenjenje).

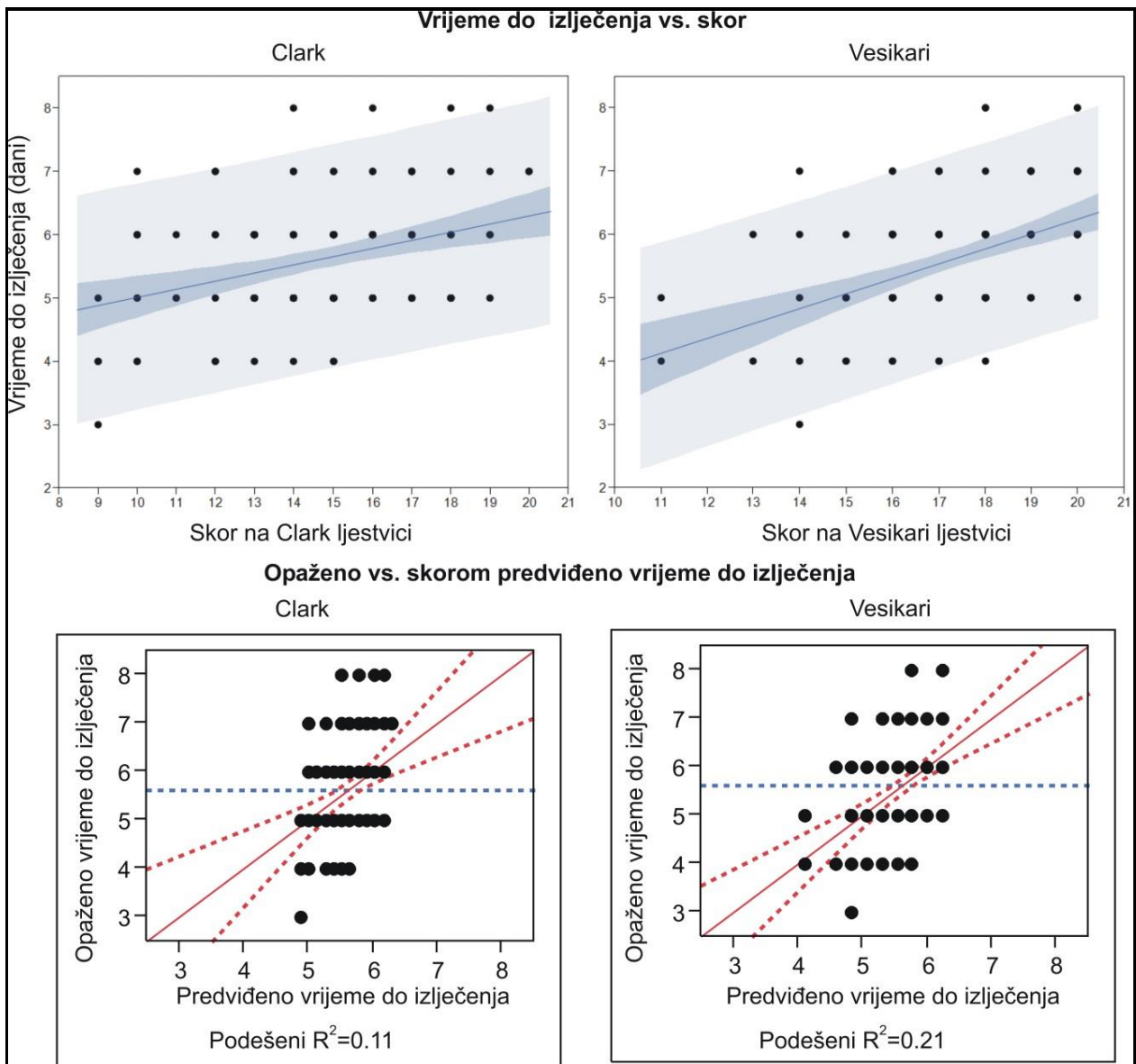
U praktičnom pogledu, zanimljivo je pitanje u kojoj mjeri ocjena težine bolesti jednom ili drugom ljestvicom „predviđaju“ tijek bolesti – primjerice, koliko će bolest (do izlječenja) trajati. Usporedba djelotvornosti dvaju tretmana ispitana u ovom kliničkom istraživanju prikazana u Tablici 2 (multivarijantni modeli) pokazuje jasno da su viši skorovi i na jednoj i na drugoj ljestvici nezavisno združeni s manjim (trenutnim) rizikom (vjerojatnošću) za izlječenje – tj. što je skor viši, treba očekivati da bolest dulje traje (do izlječenja).

Međutim, zanimljivije je pitanje može li se na temelju skora predvidjeti koliko će dana (od trenutka ocjene) biti potrebno da se bolest izliječi i koja od dvije ljestvice je u tom smislu pouzdanija. Kako je prikazano na Slici 10, vremena od trenutka procjene do izlječenja u 130 djece uključene u ovo istraživanje bila su normalno raspodijeljena (između 3 i 8 dana).



Slika 10. Raspodjela frekvencija vremena izlječenja od trenutka procjene težine bolesti. Superponiran je „fit“ normalne distribucije

Iako je u Tablici 2 pokazano da osim skorova na ovim ljestvicama postoji nezavisna združenost (trenutnog) rizika izlječenja i nekih drugih čimbenika (dob, bolnička infekcija), ove dvije ljestvice tendiraju biti „univerzalne“ ocjenske ljestvice koje obuhvaćaju sve ključne elemente bolesti (Tablica 4). Stoga je napravljena jednostavna regresijska analiza „vremena do izlječenja“ (zavisna varijabla) na skorove na svakoj od dvije ljestvice (Slika 11). Vidi se da između skorova na obje ljestvice i vremena do izlječenja postoji linearan odnos, ali intervali pouzdanosti predikcije iznimno su široki (Slika 11, gornji dio). Vidi se, također, da je odnos skorom predviđenih vrijednosti vremena do izlječenja i stvarno opaženih vrijednosti nešto povoljniji za Vesikarijevu ljestvicu (Slika 11, donji dio). Skor na Vesikarijevoj ljestvici bolje objašnjava varijabilnost vremena do izlječenja (objašnjava 21 % varijabilnosti) nego skor na Clarkovoj ljestvici (objašnjava 11 % varijabilnosti). Kao apsolutni iznos skora, niti jedna niti druga ljestvica, u ovom „području“ teže bolesti nisu čimbenici prema kojima bi trebalo s nekom većom pouzdanošću predviđati vrijeme trajanja bolesti - uz ograničenje ove studije da su sva djeca primala terapiju bilo Enterosgelom bilo BioGaia preparatom.



Slika 11. Rezultati linearne regresije vremena do izlječenja na skorove ocjenskih ljestvica

Gornji dio slike prikazuje regresijski pravac s 95 % granicama pouzdanosti (tamnije zasjenjenje) i 95 % granicama predikcije (svjetlije zasjenjenje). Donji dio slike prikazuje odnos predviđenih (na temelju skora) i opaženih vrijednosti vremena do izlječenja. Crtkana plava linija označava srednju vrijednost vremena do izlječenja, puna crvena linija je regresijski pravac, crtkane crvene linije su 95 % granice pouzdanosti regresije, R^2 označava udio (frakciju) varijabilnosti vremena do izlječenja koja se može objasniti vrijednostima skora.

6. RASPRAVA

Mnogi do sada objavljeni radovi pokazali su povoljan učinak probiotika na tijek akutnog infektivnog gastroenteritisa u smislu kraćeg trajanja bolesti, manjeg broja proljevastih stolica i bržeg oporavka, a time i kraćeg bolničkog liječenja.^{169, 198}

Kada se na našem tržištu 2012. pojavio novi proizvod, enteroadsorbens polimetilsiloksan (Enterogel), za kojeg je nekoliko objavljenih radova pokazalo da djeluje povoljno u liječenju akutnog gastroenteritisa,^{190, 191} postavilo se pitanje ima li razlike u djelotvornosti između Enterosgela i probiotika.

Ovim istraživanjem htjeli smo ispitati novo lijekovito sredstvo, enteroadsorbens, u odnosu na standardno lijekovito sredstvo, probiotik, u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa. Za probiotik smo izabrali *Lactobacillus reuteri* (BioGaia) jer je on prvi u Hrvatskoj bio registriran za primjenu u dojenačkoj dobi. U istraživanje smo uključili samo djecu u dobi 6-36 mjeseci života koja najvjerojatnije imaju prvu rotavirusnu infekciju jer očekujemo da će u njih bolest biti najteža. Isključili smo djecu koja su cijepljena, djecu koja su preboljela dokazani rotavirusni gastroenteritis i djecu koja imaju neke teže kronične bolesti koje bi mogle utjecati na kliničku sliku rotavirusnog gastroenteritisa.

Do sada nije objavljen niti jedan rad koji je uspoređivao učinkovitost ova dva pripravka u liječenju rotavirusne infekcije.

6.1. REZULTATI

6.1.1. Primarni ishod

Ovim istraživanjem nije se uspjela dokazati prednost niti jednog tretmana. Primarni ishod oba tretmana bilo je vrijeme do izlječenja. U ovom istraživanju vrijeme do izlječenja mjerilo se u danima. Nije bilo razlike u trajanju bolesti između dvije skupine djece. U oba slučaja medijan izlječenja bio je šest dana od početka bolesti. Ovaj podatak možemo usporediti s literaturnim podacima o trajanju rotavirusne infekcije bez ikakve intervencije. U radu Uhnoo i sur.¹⁹⁶ navodi se prosječno trajanje proljeva u djece s rotavirusnim gastroenteritisom 5,9 dana. U drugoj studiji navodi se trajanje dijareje od četiri do osam dana,¹⁹⁷ a u trećoj ekstremno 2-22 dana⁹⁶ što u biti ne odudara od prethodnih studija.

Ostaje upitno, prema tome, ima li bilo kakvo liječenje učinka u smislu skraćivanja bolesti odnosno trajanja simptoma. Prema Cochrane analizi iz 2010. godine¹⁹⁸ koja se odnosi na učinak probiotika u liječenju akutnog infektivnog proljeva bez obzira na uzročnika, vidi se da se učinak svodi na skraćivanje trajanja simptoma za 25 h i nešto manju učestalost stolica (1 stolica/dan manje). Naravno, učinkovitost se razlikuje od studije do studije, ovisno o ispitanicima (djeca-odrasli, razvijene-nerazvijene zemlje), vrsti probiotika, vrsti uzročnika i dr.

Podaci o djelotvornosti raznih probiotika dosta su različiti. Prema jednoj randomiziranoj, placebo kontroliranoj studiji u Italiji na relativnom velikom broju ispitanika (oko 100 ispitanika po skupini za svaki pojedini probiotik) ispitivano je 5 najprodavanijih probiotika.¹⁹⁹ Samo su u dvije skupine ispitanika nađena statistički značajna povoljna djelovanja u smislu kraćeg trajanja proljeva i manjeg broja stolica. Prva skupina dobivala je LGG, a druga mješavinu četiri različita soja bakterija (*L. delbruecki* var. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* i *B. bifidum*). Zanimljivo, skupina koja je dobivala *S. boulardii*, inače od strane ESPGHAN-a lijek prvog izbora (uz LGG), nije polučila statistički značajan povoljan učinak. U ovoj studiji sudjelovala su djeca s akutnim gastroenteritisom bez obzira na etiologiju.

6.1.2. Sekundarni ishod

Druga mjera učinkovitosti liječenja bila je vrijeme do otpusta iz bolnice/dnevne bolnice s tim da je napravljena univarijatna analiza te multivarijatna analiza prema Vesikarijevoj i Clarkovoj kliničkoj ljestvici težine bolesti. U oba slučaja nije se našla statistički značajna razlika u trajanju bolničkog liječenja između tretmana.

Rosenfeldt i sur.¹⁷⁴ pokazali su da se ranom intervencijom fiksnom kombinacijom *L. reuteri* i *L. rhamnosus* skraćuje trajanje bolesti (za manje od 24 h), ali i bolničkog liječenja - za 48 %. Isti autori u drugoj su studiji pokazali povoljno djelovanje probiotika i u djece s blažim enteritisom koja su liječena ambulantno. No, u obje studije radilo se o relativno malom broju ispitanika (30 probiotik vs. 39 placebo odnosno 23 probiotik vs. 19 placebo). Još jedan nedostatak njihove studije je taj što nisu sva djeca imala dokazanu rotavirusnu infekciju. Rosenfeldt i sur. davali su dozu od 10^{10} - 10^{11} bakterija/dan kroz 5 dana. U Hrvatskoj nema registriranog pripravka koji sadrži tako visoku koncentraciju probiotika.

Multivarijatna analiza pokazala je da neki čimbenici mogu djelomično utjecati na izlječenje. Dob bolesnika pozitivno je povezana s izlječenjem, ali i otpustom iz bolnice. Dakle, što je dijete starije veća je vjerojatnost bržeg izlječenja odnosno otpusta iz bolnice/dnevne bolnice. Ovo bismo mogli objasniti većom vjerojatnošću da su neka od starije djece preboljela supkliničku rotavirusnu infekciju u ranoj dobi tako da pri ponovnom susretu s rotavirusom imaju relativno blažu bolest.

Vjerojatnost za izlječenje i otpust iz bolnice je manji ukoliko se radilo o bolničkoj infekciji. To može biti posljedica težeg tijeka rotavirusne infekcije u prethodno iscrpljenog djeteta, ali i činjenice da se u takvog djeteta nastavlja parenteralno liječenje antibiotikom ili se odgađaju planirane pretrage (radiološke i ine) u sklopu osnovne bolesti.

Vjerojatnost izlječenja i otpusta iz bolnice manji su ukoliko je bolest bila teža bilo po Vesikarijevoj bilo po Clarkovoj ljestvici. To je samo po sebi razumljivo. Zanimljivo je da je vjerojatnost otpusta iz bolnice relativno veća u slučaju kasnije započetog liječenja što je dijelom posljedica prirodnog tijeka bolesti.

6.1.3. Tercijarni ishod

Prema Cochrane analizi djelotvornosti iz 2010. godine¹⁹⁸ jedna od mjera djelotvornosti probiotika u liječenju akutnog infektivnog proljeva je i broj stolica. Isto važi i za ukupan broj stolica u bolesnika liječenih enteroadsorbensom.^{182, 200} Shodno tome učinili smo analizu ukupnog broja stolica u obje skupine bolesnika. Niti prema ukupnom broju stolica nije bilo značajne razlike u djelotvornosti između dva ispitivana tretmana.

6.2. SIGURNOST I PODNOŠLJIVOST

U naših bolesnika nije zabilježena niti jedna značajna nuspojava koja bi zahtijevala prekid liječenja. Samo je u jednog bolesnika koji je liječen Enterosgelom zabilježena blaža nuspojava - blaži svrbež i urtikarija koji su spontano nestali bez intervencije. Ostaje otvoreno pitanje je li ta nuspojava posljedica uzimanja lijeka ili je posljedica same rotavirusne infekcije. No, s obzirom na to da je pojava urtikarije koincidirala s prvom dozom lijeka, upisali smo je u nuspojave. Prilikom sljedeće doze lijeka urtikarija se nije ponovila pa se liječenje nije prekidalo.

Probiotik *L. reuteri* korišten je u cijelom nizu istraživanja koja su uključivala novorođenčad i dojenčad. U tim istraživanjima *L. reuteri* se koristio u svrhu liječenja dojenačkih kolika, prevencije nekrotizirajućeg enterokolitisa i novorođenačke sepse u prematurne dojenčadi te u liječenju akutnog infektivnog proljeva. Niti jedno istraživanje nije registriralo značajnije nuspojave.^{201, 202, 203}

Enterogel je novi lijek i nema toliko objavljenih radova u vezi njegove sigurnosti i podnošljivosti. Enteroadsorbensi se ne apsorbiraju iz crijeva. To su inertne mineralne tvari koje uglavnom imaju neutralan okus i nemaju miris. Dosadašnja istraživanja Enterosgela provedena su na različitim skupinama bolesnika uključivo i novorođenčad.¹⁹² Nisu zabilježene značajnije nuspojave.

U obje skupine bolesnika bilo je djece koja su u početku bolesti odbijala uzimati propisani lijek s time da je troje roditelja odustalo od studije jer djeca nikako nisu htjela popiti Enterogel. S obzirom na to da su mučnina i povraćanje sastavni dio kliničke slike virusnog gastroenteritisa teško je procijeniti koliki utjecaj na odbijanje uzimanja lijeka ima okus lijeka, a koliko osnovna bolest. Treba istaknuti da je

probiotik BioGaia pri samoj primjeni u prednosti pred Enterosgelom jer se mora uzeti tek 20 kapi po pojedinačnoj dozi što je bitno manja količina od bar 20-30 mL otopljenog Enterosgela.

6.3. USPOREDBA VESIKARIJEVE I CLARKOVE LJESTVICE U KLASIFIKACIJI TEŽINE ROTAVIRUSNE INFEKCIJE

U ovom istraživanju primijenjene su dvije ocjenske ljestvice za procjenu težine rotavirusne bolesti Vesikarijeva i Clarkova. Čitajući razne radove u kojima se uspoređuju djelotvornosti cjepiva protiv rotavirusa ili djelotvornosti tretmana rotavirusne infekcije nameće se jedno pitanje: koju ljestvicu koristiti? Koja je ljestvica "bolja"? U dva rada autori su pokušali modifikacijom jednog odnosno drugog skora doći do bolje korelacije između skorova.^{194, 195} Vesikarijevu skalu modificirali su na način da ima tri kategorije (blagu, srednje tešku i tešku bolest) i zatim su je usporedili s Clarkovom skalom i obrnuto, Clarkovu skalu su modificirali tako da ima samo dvije kategorije (blagu i tešku bolest) i zatim su je usporedili s Vesikarijevom skalom. Niti u jednom slučaju nije došlo do dobre podudarnosti ljestvica. Iz toga proizlazi da bi najbolje bilo ili koristiti samo jednu od ove dvije ljestvice ili uvesti jednu posve novu koja bi se sastojala od ključnih parametara iz obje ljestvice. U našem istraživanju usporedbom skorova Vesikarijeve i Clarkove ljestvice kvadratični fit pokazuje izuzetno široke intervale predikcije što isključuje bilo kakvu mogućnost numeričke konverzije iz jedne u drugu skalu.

Drugo pitanje koje smo pokušali razriješiti tiče se korištenja kliničkih ljestvica za predikciju ishoda bolesti. Dakle, možemo li na temelju kliničkog skora na početku bolesti predvidjeti njeno trajanje? Regresijskom analizom skorova prema vremenu do izlječenja vidi se korelacija između visine skora (težine bolesti) i vremena do izlječenja, ali uz jako velike intervale predikcije. Što je bolest teža, vrijeme do izlječenja je duže, što je i logično. No, prema visini skora nije moguće točno predvidjeti trajanje bolesti. Kada se usporedi predviđeno vrijeme do izlječenja prema jednom i drugom skoru, vidimo da u tom smislu Vesikarijeva ljestvica nešto bolje "predviđa" vrijeme do izlječenja, no i njezin skor objašnjava svega 21 % varijabilnosti vremena do izlječenja.

Prema tome, korištenje kliničkih ljestvica za ocjenjivanje težine rotavirusne bolesti jest korisno jer se time mogu uspoređivati ishodi liječenja (ili prevencije) u istoj težinskoj skupini što doprinosi objektivnosti istraživanja. No, postojeće ljestvice se dosta razlikuju u klasifikaciji bolesnika i otežavaju uspoređivanje tretmana ukoliko se koriste različite ljestvice. U svrhu eventualne predikcije trajanja bolesti na temelju skora na početku bolesti, obje ljestvice pokazale su se nekorisnima.

6.4. OBILJEŽJA DJECE UKLJUČENE U ISTRAŽIVANJE

6.4.1. Opći podaci

Djeca uključena u ovo istraživanje bila su podjednake dobi i sličnih socijalno-ekonomskih uvjeta. U skupini ispitanika u ovoj studiji nešto je veći udio dječaka (58 %). U većini istraživanja također je nešto veći udio dječaka u populaciji djece hospitalizirane zbog rotavirusnog gastroenteritisa.^{204, 205, 206}

Većina djece nakon dojenačke dobi pohađala je kolektiv. Prema mjestu stjecanja rotavirusne infekcije iz Slike 4 vidi se da je relativno mali udio djece s bolničkom rotavirusnom infekcijom (16 od 130), no među njima je veći udio dojenčadi. To je i logično s obzirom na činjenicu da u Hrvatskoj djeca kreću u kolektiv tek nakon 12 mjeseci, a boravak u kolektivu je važan rizični faktor za stjecanje rotavirusne infekcije. Dojenčad se može zaraziti od braće i sestara koji idu u kolektiv. Udio djece koja imaju nekog slično oboljelog u obitelji nije velik, svega 16,9 %. Razlog može biti u tome što su hrvatske obitelji, osobito gradske, većinom s jednim ili dva djeteta. S obzirom na to da su starija djeca i odrasli uglavnom imuni prema rotavirusnoj bolesti (zbog preboljenja rotavirusne infekcije u ranoj dobi) mala je vjerojatnost razbolijevanja malog djeteta unutar kućanstva. No, mala djeca zaražena u vrtiću mogu biti izvor infekcije za ukućane. Obitelji s većim brojem male djece podložnije su obiteljskim epidemijama. Oboljela dojenčad često stječe rotavirusnu infekciju prilikom boravka na bolničkim odjelima zbog drugih bolesti ili prilikom pohađanja drugih medicinskih ustanova (rutinski pregledi pedijatra, neuropedijatra, pohađanje neurorazvojne gimnastike i slično). Oboljela djeca starija od 12 mj. obično se zaraze prilikom kontakta s drugom djecom u kolektivima (jaslice, vrtić, igraonice) ili okupljanjima (proslava rođendana i slično).

Za razliku od nerazvijenih zemalja i većine zemalja u razvoju, u Hrvatskoj je široko dostupna zdravstvena skrb pa se većina djece s akutnim infektivnim proljevom zbrinjava u sekundarnoj i tercijarnoj zdravstvenoj zaštiti. Vjerojatno bi se mnoga djeca koja se u nas liječe u dnevnoj bolnici u nerazvijenim zemljama liječila ambulantno. U slučaju rotavirusnog gastroenteritisa, koji najčešće nastupa akutno s izraženim povraćanjem, nerijetko je nemoguće nadoknaditi tekućinu oralnim unosom glukozno-elektrolitne otopine. Tada je najbolje rješenje parenteralno davanje tekućine.

Prije 15-ak godina se u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu, u skladu s tada važećim svjetskim trendovima, pokušavalo izbjeći traumu djeteta zbog venepunkcije uvođenjem nazogastrične sonde. Na taj način se, postupnim instiliranjem tekućine putem nazogastrične sonde, nastojalo nadoknaditi tekućinu i elektrolite. No, pokazalo se da je djeci uvođenje nazogastrične sonde podjednaka trauma kao i venepunkcija, a osim toga, mnoga su djeca povraćala instiliranu tekućinu. Na koncu su ta djeca imala dvostruku traumu - od uvođenja nazogastrične sonde, a potom i od venepunkcije. Time se nepotrebno izgubilo nekoliko sati u pokušavanju peroralne/enteralne rehidracije. Zbog toga se od te prakse odustalo.

Zbrinjavanje djece s akutnim gastroenteritisom obično zahtijeva samo kratkotrajnu parenteralnu rehidraciju (1-2 dana). To je bio jedan od razloga koji je doveo do odluke da se otvori dnevna bolnica u našoj ustanovi koncem 2003. godine. Od 2004. godine u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu postoji dnevna bolnica pri svakom dječjem odjelu. Boravak u dnevnoj bolnici omogućava inicijalnu laboratorijsku obradu i parenteralnu rehidraciju te uvid u tijek bolesti. Djeca koja su inače zbrinjavana klasičnom hospitalizacijom (bez nazočnosti roditelja) počela su se zbrinjavati u dnevnoj bolnici u prisustvu roditelja. Pokazalo se da to bitno smanjuje broj hospitalizacija i učestalost neželjenih događaja vezanih za hospitalizaciju djece predškolske dobi - bolničke infekcije, hospitalizam, fizičke ozljede i dr.

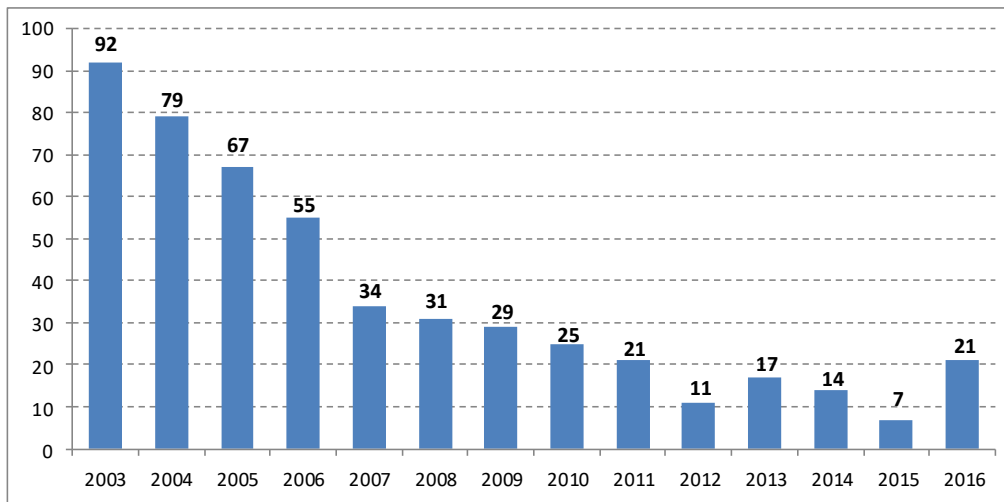
6.4.2. Epidemiološki podaci

Većina djece u ovom istraživanju dolazi iz gradske sredine (78,5 %). To je logično ako se zna da najveći rizik za obolijevanje od rotavirusne infekcije predstavlja boravak u kolektivu. Za pretpostaviti je da djeca u seoskim kućanstvima ne pohađaju odnosno rijetko pohađaju kolektiv i stoga su manje izložena

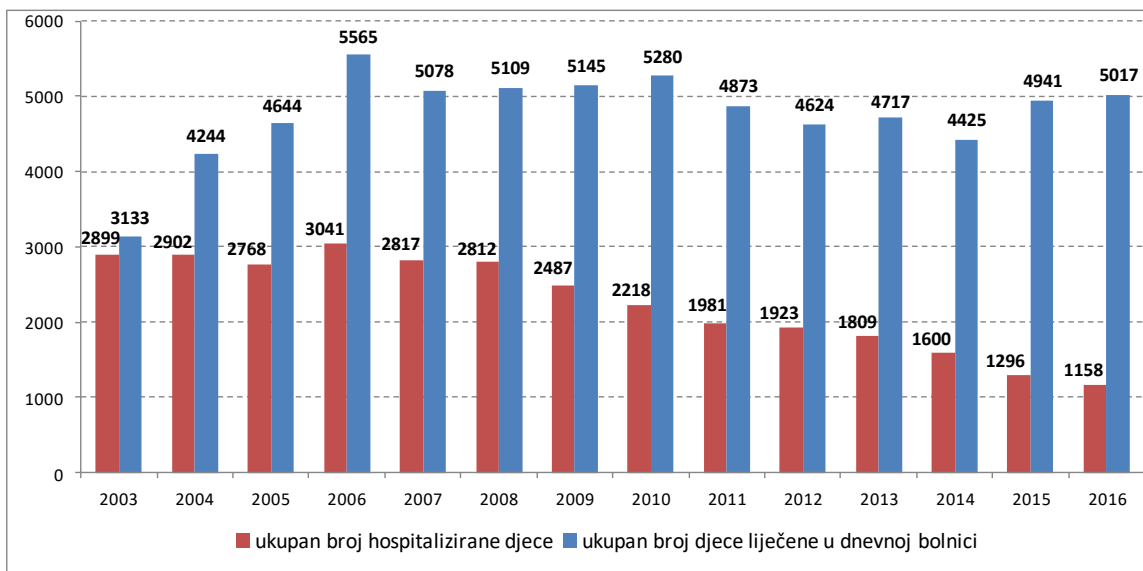
riziku. Druga mogućnost je da se zbog udaljenosti od grada i problema s prijevozom roditelji više odlučuju na pokušaj oralne rehidracije i dolaze samo u težim slučajevima bolesti.

Udio ispitanika koji su stekli svoju rotavirusnu infekciju u bolnici je relativno mali (16 od 130) što može biti odraz općenitog smanjenja broja rotavirusnih bolničkih infekcija. S obzirom na to da je kriterij za uključenje u ovo istraživanje kratko trajanje bolesti i dokazan rotavirus, očekivali smo veći broj takvih bolesnika jer se u djece koja se liječe klasičnom hospitalizacijom rano može detektirati rotavirus, a roditelje se može brzo pridobiti na sudjelovanje u istraživanju. Djeca se zaprimaju u dnevnu bolnicu u vrlo različita vremena tijekom dana i tjedna. Zbog toga velik broj djece s klinički jasnom rotavirusnom infekcijom nije mogao biti uključen u našu studiju jer, ili nije bilo ispitivača u toku večernjih sati i vikendom, ili nije bilo laboranta koji radi pretragu na rotavirus.

Broj bolničkih infekcija u Klinici za infektivne bolesti se u zadnjih desetak godina smanjuje, što može biti posljedica sve manjeg broja djece koja se liječe klasičnom hospitalizacijom (Slika 12). Zadnjih 14 godina prati se praktično konstantan pad broja hospitalizirane djece dok je broj djece koja se liječe putem dnevne bolnice uglavnom konstantan i kreće se na godišnjoj razini oko 4500-5500 djece (Slika 13).



Slika 12. Broj bolničkih rotavirusnih infekcija u Zavodu za infektivne bolesti djece u razdoblju 2003-2016. godine



Slika 13. Broj hospitalizirane djece i broj djece liječene u dnevnoj bolnici Zavoda za infektivne bolesti djece u Klinici za infektivne bolesti u razdoblju 2003-2016. godine

Glede sezonske pojavnosti može se reći da se većina djece u ovom istraživanju razboljela u razdoblju od siječnja do svibnja što donekle odgovara i podacima iz literature.^{87, 207} Ipak, očekivao se nešto veći broj oboljelih u kasnu jesen odnosno u studenome i prosincu. No, treba napomenuti da ovo istraživanje pokriva samo jedan mali vremenski isječak (4 godine), tako da je moguće da sezonska pojavnost u ispitivanom razdoblju odgovara prirodnoj varijabilnosti u sezonskoj pojavnosti rotavirusa.

6.4.3. Laboratorijski i klinički podaci

Laboratorijski i klinički podaci uglavnom odgovaraju onima iz literature. Medijani vrijednosti upalnih parametara, broja leukocita i CRP-a, bili su u granicama referentnih vrijednosti za dob. Vrijednosti biokemijskih parametara također su bile u širim granicama normale za dob. Ipak, s obzirom na to da se većinom radilo o djeci koja su imala "tešku bolest" prema Vesikarijevoj ljestvici odnosno "srednje tešku do tešku" prema Clarkovoj ljestvici očekivao se znatno češći poremećaj elektrolitnog i acidobaznog statusa, no, svega je 10,7 % djece imalo poremećaj vrijednosti natrija i to 3,1 % hipernatrijemiju, a 7,7 % hiponatrijemiju. U radovima koji su se bavili kliničkim obilježjima rotavirusne infekcije u djece većinom se spominje hipernatrijemija i to u rasponu od 9,1-25 %.^{102, 208} U ovom istraživanju češća je bila hiponatrijemija. Hipokalijemija je nađena u četvero djece (3,1 %).

Teže dehidrirani bolesnici uobičajeno razvijaju prerenalnu azotemiju zbog ishemije bubrega u sklopu centralizacije krvotoka. U ovom istraživanju svega 37,2 % ispitanika imalo je povišenu vrijednost ureje. Kreatinin je određen u 34-ero djece, a povišene vrijednosti nađene su u svega dvoje (5,9 %). Razlog tome je vjerojatno dvojak. Povišena vrijednost ureje (a osobito kreatinina) razmjerna je težini, ali i trajanju dehidracije. S obzirom na to da su ispitanici uključeni u ovo istraživanje bili kratko bolesni (<48 h) i promptno su rehidrirani, logično je da nisu stigli razviti značajniju azotemiju. Drugi razlog leži u tome što se ipak nije radilo o teško dehidriranoj djeci jer se ona zbrinjavaju u jedinici intenzivnog liječenja i nisu sudjelovala u ovom istraživanju.

Acido-bazni status određen je u 34-ero djece koja su izgledala značajnije dehidrirana. Njih 9 bilo je u metaboličkoj acidozi što čini 26,5 % od njih 34, ali svega 6,9 % od ukupnog broja ispitanika.

Jetrene transaminaze - aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT) određene su u 109 djece. Sva djeca imala su uredne vrijednosti AST dok je 11 od 109 (10,1 %) imalo povišene vrijednosti ALT. Prema literaturi povišene vrijednosti transaminaza kreću se od 15-25 % s tim da je češće povišen AST.^{106, 209} U naših ispitanika bilo je upola manje bolesnika s povišenim transaminazama što možda može ovisiti i o serotipu virusa. Neobično je što niti jedno dijete nije imalo povišene vrijednosti AST. Mogući razlog tome mogu biti šire postavljene referentne vrijednosti. Maksimalne vrijednosti transaminaza odgovarale su onima u literaturi i kretale su se do 140 U/mL.

Glede koinfekcije možemo reći da je mali broj djece imao crijevnu koinfekciju, samo dvoje djece je imalo kampilobakteriozu. Jedno dijete je kao koinfekciju imalo trodnevnu vrućicu. Ostala djeca s koinfekcijom, njih 28 (21,5 %) imala su neki respiratorni sindrom. 18-ero ih je imao respiratorni katar, četvero je imao upalu srednjeg uha, troje bronhiole, dvoje pneumoniju i jedno gripu. Kad izdvojimo djecu koja su imala dokazane respiratorne viruse, pneumoniju ili otitis (za koji se predmnijeva da je bakterijski) ostaje šesnaestero djece s respiratornim simptomima bez dokazane etiologije. U te djece respiratorni simptomi mogli bi pripadati samoj rotavirusnoj infekciji. Zheng i sur.²¹⁰ dokazali su rotavirus u respiratornim sekretima u 25 od 89 djece koja su hospitalizirana zbog respiratornih simptoma sa ili bez pridružene dijareje. To je u ukupnom broju bilo više nego svih ostalih testiranih virusa (adenovirusa, respiratornog sincicijskog virusa, influenzavirusa i herpes simpleks virusa) zajedno. Međutim, nakon tog istraživanja nije više bilo radova koji bi potvrdili značajniju nazočnost rotavirusa u respiratornom traktu ili eventualno respiratorni put prijenosa rotavirusne infekcije.

S obzirom na to da je vrhunac epidemije rotavirusa u hladnim mjesecima kada je ujedno i najveća učestalost virusnih respiratornih infekcija, očekivao se veći broj djece s respiratornim simptomima odnosno koinfekcijama od nađenih 19,2 %.

Prema podacima iz literature učestalost febrilnih konvulzija je 2-5 % u inače zdrave djece.²¹¹ U ovom istraživanju samo je jedno dijete imalo febrilne konvulzije što čini 0,7 %. Ovo se može objasniti činjenicom da se djeca s febrilnim konvulzijama često inicijalno opserviraju u jedinici intenzivnog liječenja pa zbog toga nisu uključena u ovo istraživanje.

Kožne manifestacije tijekom rotavirusne infekcije su i inače rijetke, a u ovom istraživanju samo je jedno dijete imalo blažu urtikariju koja je koincidirala s davanjem Enterosgela pa smo je iz opreza uvrstili u nuspojave. Iz vlastitog iskustva znamo da je ranijih godina bilo djece s urtikarijom u sklopu rotavirusne infekcije koja se ničim drugim nije mogla objasniti. I inače se smatra da je akutna urtikarija u djece u gotovo 50 % slučajeva povezana s infekcijom.²¹²

Imunološki poremećaji kao što je reaktivni artritis, hematološki poremećaji (neutropenija, trombocitopenija, anemija), nodozni eritem ili vaskulitis u ispitivane djece nisu zabilježeni. Niti jedno dijete nije imalo bakterijemiju iz cijeva niti postinfektivnu enteropatiju.

6.5. PREDNOSTI I NEDOSTACI ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje ima svojih prednosti i nedostataka. Nedostaci ovog istraživanja su višestruki. Prvi nedostatak je sama vrsta studije. Idealno bi bilo učiniti dvostruko slijepu, placebo kontroliranu studiju. Ova studija je otvorena zato što su lijekovita sredstva koja uspoređujemo različitih fizikalnih svojstava, jedno su kapi, a drugo je gel. Teško bi bilo napraviti dvostruko slijepi pokus s tako različitim sredstvima osim u slučaju bolničkog liječenja. Tada bi se eventualno moglo u ljekarni otopiti oba sredstva u određenoj količini prikladnog otapala bez znanja ispitivača. To bi za sobom povlačilo obvezno bolničko liječenje za cijelo vrijeme ispitivanja. Za to se nismo odlučili jer to ne bi bilo etički ni prema djeci ni prema roditeljima. Iz istog razloga nedostaje kontrolna skupina koja bi dobivala placebo.

Drugi nedostatak mogao bi biti izbor probiotika. U liječenju akutnog gastroenteritisa preporučuju se LGG i *Sacharomyces boulardii* kao probiotici prvog izbora, no, mogu se preporučiti i *L. reuteri* DSM 17938 i *L. acidophilus* LB.¹¹⁴ Kao probiotik u ovom istraživanju koristio se *L. reuteri* jer je on prvi u Hrvatskoj registriran za liječenje dijarealnih bolesti u dojenačkoj dobi. S obzirom na to da je u jednom istraživanju pokazano da je veća doza *L. reuteri* povezana s povoljnijim ishodom,¹⁷⁴ u ovom istraživanju povećali smo dozu s preporučenih 10^8 - 4×10^8 /dan na $1,2 \times 10^9$ /dan da bismo maksimalno povećali vjerojatnost povoljnog ishoda. Ostaje za raspraviti je li moguće dati istu količinu *L. reuteri* kao i LGG-a (dakle $\geq 10^{10}$) i kakav bi bio učinak. Ukoliko bi se davala tolika doza u sadašnjem razrjeđenju to bi značilo

da bi dijete trebalo dobiti 30 mL/dan što znači 6 originalnih bočica lijeka koje sadrže 5 mL odnosno približno 100 kapi.

Sljedeće ograničenje ove studije je način bilježenja podataka. Zapisivanje simptoma bolesti, vrućice, povraćanja i proljeva, prepušteno je roditeljima. Nakon što je liječnik objasnio roditeljima način bilježenja podataka, roditelji su to dalje činili sami. Bilježenje tjelesne temperature je relativno lako. Pretpostavlja se da svaki roditelj zna izmjeriti djetetu rektalnu temperaturu i upisati je u tablicu. Greška mjerenja može biti greška termometra i na to se ne može utjecati. Glede povraćanja, bilježenje je relativno lako, svako povraćanje pisali smo kao crticu ili trokutić u tablicu simptoma. Premda i tu može biti dvojbi jer ne rezultira svako napinjanje (nagon na povraćanje) izbacivanjem tekućine odnosno želučanog sadržaja niti se svakim povraćanjem gubi jednaka količina tekućine. Bilježenje stolice predstavlja najveći problem i zapravo može dosta promijeniti cijelu sliku i rezultate istraživanja. Premda u svijetu postoji prihvaćena tzv. Bristolska ljestvica konzistencije stolice²¹³ koja stolicu klasificira po brojevima od 1 do 7 (1=brabonjasta, 7=tekuća), mi smo se odlučili za jednostavnu grafičku formu bilježenja stolice kojom se i inače služimo na dječjim odjelima naše Klinike. Roditelji su tekuću stolicu zapisivali u tablicu kao prazan kružić, kašastu kao dijelom ispunjeni kružić (pola-pola), a za formiranu stolicu zapisivali su ispunjeni kružić. Broj pražnjenja crijeva odgovara broju kružića, a konzistencija vrsti kružića. Iako izgleda dosta jednostavno, u stvarnosti su velike razlike u količini i konzistenciji stolice. Čak i medicinske sestre koje dugo rade na dječjem odjelu ne upisuju posve jednako svaku stolicu. Ono što je za nekog obilna stolica, za drugog nije, što je za jednog tekuća stolica, za drugog je kašasta i slično. Ono što bi zapravo trebalo znati jest količina tekućine izgubljene stolicom. Da bi se to moglo izmjeriti idealno bi bilo vagati pelene i bilježiti točno koliko je dijete tekućine izgubilo. Za takvo precizno istraživanje dijete bi moralo biti u bolnici cijelo vrijeme istraživanja. Mjerenje broja i konzistencije stolica nedvojbeno korelira s izgubljenom tekućinom, ali je daleko od preciznog mjerenja.

Iz svega navedenog jasno je da je velik nedostatak istraživanja to što bilježenje svih kliničkih simptoma nije obavljao istraživač nego je to prepušteno roditeljima od kojih se očekivalo aktivno i korektno bilježenje svih kliničkih podataka koji su poslije korišteni u statističkoj obradi podataka.

Rotavirusni gastroenteritis nema u sve djece jednaku kliničku sliku. Tri su osnovna simptoma koja oblikuju kliničku sliku - vrućica, povraćanje i proljev. Mučninu, bolove u trbuhu ili glavobolju u djece te dobi možemo samo pretpostaviti. Neki puta je teško odrediti kada bolest točno počinje. Počinje li ona odbijanjem hrane, povraćanjem, vrućicom ili proljevom? Najčešće bolest slijedi sljedeći obrazac - dijete počinje odbijati hranu, zatim učestalo povraća, na to se obično nastavlja vrućica, a ubrzo i proljev. Cijeli taj niz simptoma obično se dogodi u prvih 12 - 24 h. Je li dijete prethodno već imalo mučninu ili bolove u trbuhu, to ne znamo. Slično može početi i neka virusna respiratorna infekcija ili koinfekcija. U mnogim istraživanjima liječenja rotavirusnog gastroenteritisa za usporedbu djelotvornosti kao mjera vremena u trajanju simptoma koriste se sati bolesti, no, mi smo se, iz gorenavedenih razloga, ali i radi jednostavnosti, odlučili za dane bolesti.

Konačno, ostaje upitno i kada točno nastupa kraj bolesti. Neka djeca, osobito dojenčad na prsima, i onda kada nisu bolesna imaju učestalije kašaste stolice. Takva djeca praktično stalno imaju "proljev". U dojenčadi normalni obrazac pražnjenja crijeva može biti jedna stolica svaki treći dan isto kao i 3-5 stolica/dan.²¹⁴ U slučaju učestalijih stolica valja očekivati i mekšu odnosno kašastu konzistenciju stolice. Kako u takve djece reći da je bolest završila? Je li izostanak stolice ujedno i prestanak bolesti?

U ovom istraživanju smatralo se da je dijete ozdravilo kada više nema vrućice i povraćanja i a) ima prvu formiranu stolicu, b) nema stolicu više od 24 h ili c) kada se vrati na uobičajen obrazac pražnjenja crijeva.

Osim nedostataka, ovo istraživanje ima i neke prednosti. U ovo istraživanje uključena su samo djeca zainteresiranih roditelja koji su razumjeli svrhu istraživanja i pristali da njihovo dijete sudjeluje u istraživanju. To za sobom povlači pretpostavku da su roditelji vjerojatno savjesno bilježili podatke o djetetovim simptomima. Dvije skupine djece tretirane su na posve isti način u svakoj fazi istraživanja odnosno tretirana su jednako kao i djeca koja nisu uključena u istraživanje. Niti jedno dijete nije imalo produljeni boravak u bolnici, odvajanje od roditelja ili neku dodatnu traumu zbog istraživanja. Djeca su sva iz istog područja i podjednakih uvjeta života. U istraživanje su uključena samo djeca određene dobi i ona u kojih je *dokazan* isti uzročnik - rotavirus. Mnoga slična istraživanja djelotvornosti lijekovitih

sredstava za liječenje akutnog infektivnog proljeva provedena su u nerazvijenim zemljama. U tim studijama sudjelovali su ispitanici različitih dobnih skupina, a dijarealna bolest bila je uzrokovana različitim uzročnicima (bakterijama, virusima, praživotinjama, parazitima) što sve može značajno promijeniti tijek bolesti i ishod liječenja.

7. ZAKLJUČCI

7.1. USPOREDBA DJELOTVORNOSTI TESTIRANOG I STANDARDNOG LJEKOVITOG SREDSTVA

Glavna hipoteza našeg istraživanja bila je da nema razlike u djelotvornosti u liječenju akutnog rotavirusnog gastroenteritisa između standardnog sredstva, probiotika *L. reuteri* (BioGaia) i testiranog lijeka, enteroadsorbensa polimetilsiloksana (Enterogel). Primarna mjera djelotvornosti bila je duljina trajanja bolesti, sekundarna je bila dulja trajanja bolničkog liječenja, a tercijarna ukupan broj proljevastih stolica za vrijeme trajanja bolesti. Prema našim podacima, nismo uspjeli dokazati statistički značajnu razliku u ishodu liječenja niti u jednoj od testiranih mjera djelotvornosti.

7.2. NEPOVOLJNA DJELOVANJA (NUSPOJAVE) ISPITIVANIH LJEKOVITIH SREDSTAVA

Našim istraživanjem nismo našli značajne nuspojave ispitivanih lijekovitih sredstava. Samo se u jednog djeteta koje je dobivalo enteroadsorbens registrirala blaža urtikarija praćena svrbežom koja je spontano nestala i ne možemo je sa sigurnošću pripisati lijeku. Možemo napomenuti da je u nešto većem broju djece bilo problema s uzimanjem lijeka u smislu da su djeca odbijala uzimati lijek. Zbog toga je troje roditelja koja su trebala davati enteroadsorbens odustalo od studije. Razlog može biti u palatabilnosti lijeka, ali i u osjećaju mučnine te nagonu na povraćanje koji su izraženi na početku rotavirusne infekcije.

7.3. USPOREDBA DVIJU KLINIČKIH LJESTVICA ZA OCJENU TEŽINE ROTAVIRUSNOG GASTROENTERITISA

Našim istraživanjem pokazali smo da se dvije težinske ljestvice, Vesikarijeva i Clarkova, premda u načelu vrlo slične, ne mogu međusobno uspoređivati. Dvije ljestvice ne svrstavaju bolesnike u istu težinsku kategoriju što znači da se mogu uspoređivati samo bolesnici koji su testirani prema istoj skali.

Pokušali smo odrediti i u kojoj mjeri visina skora prema jednoj ili drugoj ljestvici korelira s duljinom bolesti. Ocjenjivanjem bolesnika ni prema Vesikarijevoj ni prema Clarkovoj skali ne možemo

predvidjeti ishod odnosno trajanje bolesti. U tom pogledu nešto je preciznija Vesikarijeva ljestvica, ali bez statističke značajnosti.

7.4. UČESTALOST NEKIH RJEDIH KLINIČKIH MANIFESTACIJA ROTAVIRUSNE INFEKCIJE

U ovom istraživanju u kojem je sudjelovao relativno mali broj djece bilježimo uobičajenu učestalost nekih rjeđih manifestacija rotavirusne infekcije. Ipak, ima nekih pojava koje malo odudaraju od očekivanih. Našli smo nešto veći udio djece s hiponatremijskom (N=10) nego s hipernatremijskom dehidracijom (N=4). U naših ispitanika bilo je manje djece s febrilnim konvulzijama (0,7 %) od očekivanih 2-5 %. Očekivali smo i veći broj djece s povišenim transaminazama. Prema literaturnim podacima trebalo ih je biti 15-25 %, a u ovom istraživanju bilo ih je svega 10,1 %. Ostale kliničke manifestacije uglavnom odgovaraju onima iz literature.

7.5. UČESTALOST RIJETKIH KOMPLIKACIJA ROTAVIRUSNE INFEKCIJE

Rijetke komplikacije rotavirusne infekcije kao što su postinfektivna enteropatija, bakterijemija iz crijeva, serumska bolest, reaktivni artritis i dr. nismo zabilježili pa prema tome ne možemo točno utvrditi njihovu učestalost. Da bi se to moglo točno ispitati, bio bi potreban puno veći uzorak ispitanika.

8. SAŽETAK

Rotavirusni gastroenteritis je najčešći uzrok akutnog infektivnog proljeva u populaciji dojenčadi i predškolske djece. Zbog naglog nastupa simptoma, povraćanja, proljeva i vrućice, čest je razlog hospitalizacije u djece. Do danas nema uzročnog lijeka koji djeluje na rotavirus. Postoje mnoga pomoćna lijekovita sredstva koja služe ublažavanju simptoma. Nekada popularni enteroadsorbens medicinski ugljen zamijenila su neka novija sredstva, danas su to prije svih probiotici. Među brojnim preparatima samo neki imaju blagu prednost pred placebom. U zadnjih nekoliko godina na hrvatskom tržištu se pojavio novi enteroadsorbens polimetilsiloksan (Enterogel) koji smo htjeli testirati uspoređujući ga sa standardnim sredstvom, probiotikom *L. reuteri* (BioGaia) koji je prvi probiotik licenciran u nas za upotrebu u dojenačkoj dobi. Osim toga, željeli smo ispitati dvije kliničke ljestvice za ocjenu težine rotavirusne infekcije i opisati neke kliničke osobitosti rotavirusne infekcije u našem podneblju.

Djelotvornost ispitivanih lijekova ispitivali smo na tri razine - duljini trajanja bolesti, duljini bolničkog liječenja i ukupnom broju stolica u toku bolesti. Niti po jednom parametru nije bilo značajnih razlika između dva ispitivana lijeka. Nismo zamijetili niti jednu značajniju nuspojavu među našim ispitanicima. Dojam je nešto bolje palatabilnosti probiotika, ali to može biti i odraz manje količine pojedinačne doze (BioGaia oko 1 mL; Enterogel 20-30 mL).

Standardne kliničke ljestvice za ocjenu težine rotavirusne bolesti, Vesikarijeva i Clarkova, premda vrlo slične, nisu međusobno usporedive. U slučaju ispitivanja terapijskih tretmana ili preventivnih mjera (cijepljenje) potrebno je koristiti istu skalu. Ljestvice također ne možemo koristiti u svrhu predviđanja duljine bolesti. Bilo bi dobro da se na međunarodnoj razini odluči za jednu skalu radi lakše usporedbe kliničkih istraživanja u budućnosti.

Kliničke i epidemiološke značajke rotavirusne infekcije u naših ispitanika ne razlikuju se značajno od onih opisanih u standardnim udžbenicima. Očekivali smo nešto veći broj oboljelih u kasnu jesen, ali izostanak većeg broja oboljelih u tom razdoblju može biti samo odraz sezonske varijabilnosti. Nismo našli značajniji udio rijetkih pojavnosti rotavirusne infekcije kao što su urtikarija, reaktivni artritis, hepatitis,

encefalitis, niti komplikacija kao što su teška dehidracija, encefalopatija i sl. Jedan od razloga za to može biti prijem težih bolesnika u jedinicu intenzivnog liječenja. Teže oboljeloj djeci nismo bili u mogućnosti davati ispitivana ljekovita sredstva niti smo mogli pridobiti roditelje za sudjelovanje u našem istraživanju.

Ipak, izostanak najtežih i najlakših bolesnika iz naše studije ima i nekih prednosti - čini skupinu ispitanika vrlo homogenom jer su sva djeca sličnih kliničkih karakteristika i prema tome usporedbu djelotvornosti čini točnijom.

U zaključku možemo reći da sa statističkom snagom od 80 % možemo tvrditi da nema razlike u djelotvornosti između enteroadsorbensa polimetilsiloksana i probiotika *L. reuteri* u liječenju rotavirusnog gastroenteritisa.

9. SUMMARY

Thesis: Comparison of clinical efficacy of probiotic *Lactobacillus reuteri* versus enteroadsorbent polymethylsiloxane (Enterosgel®) in the treatment of rotaviral gastroenteritis in children 6-36 months old.

Leo Markovinović, 2019

Rotavirus gastroenteritis is the most common cause of acute infectious diarrhea in infants and young children. It is a very frequent cause of childhood hospitalisation due to its sudden onset of symptoms - vomiting, diarrhea and fever. There is still no causative therapy against rotavirus. However, there are many adjunctive therapies available to alleviate the symptoms of infection. Once very popular enterosorbent, medicinal activated charcoal, was replaced by some new agents, namely probiotics. Amongst many probiotic preparations only a few showed some advantages over placebo. In the last few years a new enterosorbent, polymethylsiloxane (Enterosgel) has emerged on the Croatian market and we wanted to compare it to the standard therapy, probiotic *L. reuteri* (BioGaia). We chose *L. reuteri* because it was the first probiotic preparation registered for safe use in infants. We also wanted to compare two gastroenteritis clinical severity assessment scales and describe some clinical characteristics of rotavirus infection in our region.

The efficacy of the investigated therapies was tested on three levels - duration of symptoms, duration of hospital stay and the total number of liquid stools. We have found no significant differences between the therapies according to any of the tested parameters. We have noticed no significant side-effects of the tested therapies. Probiotic preparation seemed to have better palatability, however this might be attributed to a smaller single dose volume (BioGaia cca 1 mL; Enterosgel cca 20-30 mL).

Although very similar, the standard clinical severity scores for the evaluation of acute gastroenteritis, Vesikari's and Clark's, are not comparable. If there is a need for comparing different treatments or preventive measures (vaccinations) the same clinical score must be used. We also cannot use

these scores for predicting the duration of symptoms of rotavirus disease. It would be beneficial if a single scale would be set as the standard on the international level, thus enabling easier comparison of future clinical trials.

The clinical and epidemiological characteristics of the rotavirus infection in our examinees did not significantly differ to the ones described in the standard textbooks. However, the expected slightly higher number of cases in the late autumn was not recorded, due to the limited duration of the trial or it could be just a reflection of the usual seasonal variability. We did not find a significant number of rare manifestations of rotavirus infection such as urticaria, reactive arthritis, hepatitis, encephalitis, nor did we notice any complications such as severe dehydration, encephalopathy, etc. One of the reasons for that can be prompt admission of patients with more severe rotavirus infection to the intensive care unit. Due to the nature of the trial, these patients were not recruitable or suitable for inclusion as we could not obtain the parents' consent.

Subsequently, the patients with the most severe and those with the most benign symptoms were not included in our trial. On the positive note, our study population was very homogeneous as all the patients had similar clinical characteristics thus making the comparison of treatment effectiveness more reliable.

In conclusion, with the statistical power of 80 %, we can claim that there is no difference in the efficacy between the new enterosorbent polymethylsiloxane and probiotic *L. reuteri* in the treatment of rotavirus gastroenteritis in children.

10. LITERATURA

¹Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-72.

²World Health Organisation. Diarrhoeal disease: key facts. [Internet]. Geneva: WHO, 2017. [pristupljeno 03.06.2018.]. Dostupno na:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

³Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 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;12:136-41.

⁴Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, i sur. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012;379:2151-61.

⁵Che-Liang L, Shou-Chien C, Shyun-Yeu L, Kow-Tong C. Disease Caused by Rotavirus. *Infection Open Virol J* 2014;8:14-9.

⁶Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science* 1963;141:359-60.

⁷Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973;2:1281-3.

⁸Woode GN, Bridger JC, Jones JM, Flewett TH, Davies HA, Davis HA, i sur. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect Immun* 1976;14:804-10.

⁹Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 1988;199:269-75.

¹⁰McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2010;397:587-99.

-
- ¹¹Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J* 2011;30:408-16.
- ¹²Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *J Virol* 2009;83:1754-66.
- ¹³Offit PA, Blavat G, Greenberg HB, Clark HF. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J Virol* 1986;57:46-9.
- ¹⁴Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, i sur. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 1983;47:267-75.
- ¹⁵Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1991;13:448-61.
- ¹⁶Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Sattar SA. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces. *J Hyg (Lond)* 1986;97:163-73.
- ¹⁷Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr Opin Virol* 2012;2:380-8.
- ¹⁸Saif LJ, Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;185:339-71.
- ¹⁹Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bremont M, Cohen J, i sur. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:519-23.
- ²⁰Matthijnssens 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;82:3204-19.
- ²¹Gentsch 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;30:1365-73.
- ²²Coulson BS. VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1996;12 (Suppl):113-8.

-
- ²³Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai 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.
- ²⁴Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005;15:29-56.
- ²⁵Park SI, Matthijssens J, Saif LJ, Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, i sur. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet Microbiol* 2011;152(1-2):55-66.
- ²⁶Hung T, Chen GM, Wang CG, Fan RL, Yong RJ, Chang JQ, i sur. Seroepidemiology and molecular epidemiology of the Chinese rotavirus. *Ciba Found Symp* 1987;128:49-62.
- ²⁷Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Yamada M, Shinozaki K, Sasagawa A, i sur. Survey of humangroup C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. *J Clin Microbiol* 1998;36:6-10.
- ²⁸Hung T, Chen GM, Wang CG, Yao HL, Fang ZY, Chao TX, i sur. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet* 1984;1:1139-42.
- ²⁹Phan TG, Nishimura S, Okame M, Nguyen TA, Khamrin P, Okitsu S, i sur. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. *J Med Virol* 2004;74:173-9.
- ³⁰Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 1996;70:5832-9.
- ³¹Méndez E, Arias CF, López S. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* 1993;67:5253-9.
- ³²Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, i sur. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol* 2003;77:9969-78.

-
- ³³Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, i sur. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 2012;485:256-9.
- ³⁴Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, i sur. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol* 2012;86:4833-43.
- ³⁵Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, i sur. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2010;84:9161-9.
- ³⁶Lopez S, Arias CF. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;309:39-66.
- ³⁷Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004;101:67-81.
- ³⁸Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Spencer E. Replication and transcription of the rotavirus genome. *Curr Pharm Des* 2004;10:3769-77.
- ³⁹McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol* 2011;19:136-44.
- ⁴⁰Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol* 2005;79:15165-74.
- ⁴¹Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:165-77.
- ⁴²Davidson GP, Hogg RJ, Kirubakaran CP. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect Immun* 1983;40:447-52.
- ⁴³Grimwood K, Lund JC, Coulson BS, Hudson IL, Bishop RF, Barnes GL. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol* 1988;26:732-8.

-
- ⁴⁴Jaimes MC, Rojas OL, González AM, Cajiao I, Charpilienne A, Pothier P, i sur. Frequencies of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol* 2002;76:4741-9.
- ⁴⁵Mäkelä M, Marttila J, Simell O, Ilonen J. Rotavirus-specific T-cell responses in young prospectively followed-up children. *Clin Exp Immunol* 2004;137:173-8.
- ⁴⁶Offit PA, Hoffenberg EJ, Pia ES, Panackal PA, Hill NL. Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children, and adults. *J Infect Dis* 1992;165:1107-11.
- ⁴⁷Velázquez 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;335:1022-8.
- ⁴⁸Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol* 1988;62:744-8.
- ⁴⁹Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Evidence that active protection following oral immunization of mice with live rotavirus is not dependent on neutralizing antibody. *Virology* 1992;188:57-66.
- ⁵⁰Bishop 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;309:72-6.
- ⁵¹Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL. Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study. *J Infect Dis* 1991;164:277-83.
- ⁵²Clemens JD, Ward RL, Rao MR, Sack DA, Knowlton DR, van Loon FP, i sur. Seroepidemiologic evaluation of antibodies to rotavirus as correlates of the risk of clinically significant rotavirus diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis* 1992;165:161-5.
- ⁵³De Vos B, Han HH, Bouckennooghe A, Debrus S, Gillard P, Ward R, i sur. Live attenuated human rotavirus vaccine, RIX4414, provides clinical protection in infants against rotavirus strains with and without shared G and P genotypes: integrated analysis of randomized controlled trials. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:261-6.

-
- ⁵⁴Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* 1995;69:7800-6.
- ⁵⁵Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol* 2012;5:712-9.
- ⁵⁶Zheng BJ, Lo SK, Tam JS, Lo M, Yeung CY, Ng MH. Prospective study of community-acquired rotavirus infection. *J Clin Microbiol* 1989;27:2083-90.
- ⁵⁷Davidson GP, Whyte PB, Daniels E, Franklin K, Nunan H, McCloud PI, i sur. Passive immunisation of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *Lancet* 1989;2:709-12.
- ⁵⁸Clemens J, Rao M, Ahmed F, Ward R, Huda S, Chakraborty J, i sur. Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement? *Pediatrics* 1993;92:680-5.
- ⁵⁹Naficy AB, Abu-Elyazeed R, Holmes JL, Rao MR, Savarino SJ, Kim Y, i sur. Epidemiology of rotavirus diarrhea in Egyptian children and implications for disease control. *Am J Epidemiol* 1999;150:770-7.
- ⁶⁰Newburg DS, Peterson JA, Ruiz-Palacios GM, Matson DO, Morrow AL, Shults J, i sur. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 1998;351:1160-4.
- ⁶¹Chan J, Nirwati H, Triasih R, Bogdanovic-Sakran N, Soenarto Y, Hakimi M, i sur. Maternal antibodies to rotavirus: could they interfere with live rotavirus vaccines in developing countries? *Vaccine* 2011;29:1242-7.
- ⁶²Coulson 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;30:1678-84.
- ⁶³Torres-Medina A. Effect of rotavirus and/or *Escherichia coli* infection on the aggregated lymphoid follicles in the small intestine of neonatal gnotobiotic calves. *Am J Vet Res* 1984;45:652-60.
- ⁶⁴Bridger JC, Hall GA, Parsons KR. A study of the basis of virulence variation of bovine rotaviruses. *Vet Microbiol* 1992;33(1-4):169-74.
- ⁶⁵Adams WR, Kraft LM. Electron-Microscopic Study of the Intestinal Epithelium of Mice Infected with the Agent of Epizootic Diarrhea of Infant Mice (EDIM Virus). *Am J Pathol* 1967;51:39-60.

-
- ⁶⁶Ward LA, Rosen BI, Yuan L, Saif LJ. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J Gen Virol* 1996;77(Pt 7):1431-41.
- ⁶⁷Pearson GR, McNulty MS, Logan EF. Pathological changes in the small intestine of neonatal calves naturally infected with reo-like virus (rotavirus). *Vet Rec* 1978;102:454-8.
- ⁶⁸Suzuki H, Konno T. Reovirus-like particles in jejunal mucosa of a Japanese infant with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *Tohoku J Exp Med* 1975;115:199-211.
- ⁶⁹Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, i sur. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* 2003;362:1445-9.
- ⁷⁰Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, i sur. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 2007;4:e121.
- ⁷¹Kovacs A, Chan L, Hotrakitya C, Overturf G, Portnoy B. Serum transaminase elevations in infants with rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986;5:873-7.
- ⁷²Dickey M, Jamison L, Michaud L, Care M, Bernstein DI, Staat MA. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:318-21.
- ⁷³Bridger JC, Tauscher GI, Desselberger U. Viral determinants of rotavirus pathogenicity in pigs: evidence that the fourth gene of a porcine rotavirus confers diarrhea in the homologous host. *J Virol* 1998;72:6929-31.
- ⁷⁴Hoshino Y, Saif LJ, Kang SY, Sereno MM, Chen WK, Kapikian AZ. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology* 1995;209:274-80.
- ⁷⁵Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004;78:10213-20.
- ⁷⁶Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* 2000;287:491-5.
- ⁷⁷Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-6.

-
- ⁷⁸Charles MD, Holman RC, Curns AT, Parashar UD, Glass RI, Bresee JS. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:489-93.
- ⁷⁹Valentini D, Ianiro G, Di Bartolo I, Di Camillo C, Boccuzzi E, Vittucci AC, i sur. Hospital-acquired rotavirus and norovirus acute gastroenteritis in a pediatric unit, in 2014-2015. *J Med Virol* 2017;89:1768-74.
- ⁸⁰Gervasi G, Capanna A, Mita V, Zaratti L, Franco E. Nosocomial rotavirus infection: An up to date evaluation of European studies. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:2413-8.
- ⁸¹Estes MK, Graham DY, Smith EM, Gerba CP. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol* 1979;43:403-9.
- ⁸²Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol* 1984;19:748-53.
- ⁸³Keswick BH, Pickering LK, DuPont HL, Woodward WE. Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:813-6.
- ⁸⁴Kraft LM. Studies on the etiology and transmission of epidemic diarrhea of infant mice. *J Exp Med* 1957;106:743-55.
- ⁸⁵Dennehy 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;25:1123-31.
- ⁸⁶Cecuk D, Kruzic V, Turkovic B, Grce M. Human viruses in the coastal environment of a Croatian harbor. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1993;41:487-93.
- ⁸⁷LeBaron CW, Lew J, Glass RI, Weber JM, Ruiz-Palacios GM. Annual rotavirus epidemic patterns in North America. Results of a 5-year retrospective survey of 88 centers in Canada, Mexico, and the United States. Rotavirus Study Group. *JAMA* 1990;264:983-8.
- ⁸⁸Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, i sur. Asian Rotavirus Surveillance Network. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* 2004;10:988-95.

-
- ⁸⁹Koopmans M, Van Asperen I. Epidemiology of rotavirus infections in The Netherlands. *Acta Paediatr* 1999;88(Suppl):31-7.
- ⁹⁰Payne DC, Szilagyi PG, Staat MA, Edwards KM, Gentsch JR, Weinberg GA, i sur. Secular variation in United States rotavirus disease rates and serotypes: implications for assessing the rotavirus vaccination program. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:948-53.
- ⁹¹Maunula L, Von Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol* 2002;76:11793-800.
- ⁹²Curns AT, Panozzo CA, Tate JE, Payne DC, Patel MM, Cortese MM, i sur. Remarkable postvaccination spatiotemporal changes in United States rotavirus activity. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(1 Suppl):S54-5.
- ⁹³Tate JE, Mutuc JD, Panozzo CA, Payne DC, Cortese MM, Cortes JE, i sur. Sustained decline in rotavirus detections in the United States following the introduction of rotavirus vaccine in 2006. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(1 Suppl):S30-4.
- ⁹⁴Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, i sur. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis* 1983;147:95-106.
- ⁹⁵Kovacs A, Chan L, Hotrakitya C, Overturf G, Portnoy B. Rotavirus gastroenteritis. Clinical and laboratory features and use of the Rotazyme test. *Am J Dis Child* 1987;141:161-6.
- ⁹⁶Wyatt RG, Yolken RH, Urrutia JJ, Mata L, Greenberg HB, Chanock RM, i sur. Diarrhea associated with rotavirus in rural Guatemala: a longitudinal study of 24 infants and young children. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:325-8.
- ⁹⁷Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990;22:259-67.
- ⁹⁸Lynch M, Lee B, Azimi P, Gentsch J, Glaser C, Gilliam S, i sur. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis* 2001;33:932-8.

-
- ⁹⁹Nishimura S, Ushijima H, Nishimura S, Shiraishi H, Kanazawa C, Abe T, i sur. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev* 1993;15:457-9.
- ¹⁰⁰Goldwater PN, Rowland K, Thesinger M, Abbott K, Grieve A, Palombo EA, i sur. Rotavirus encephalopathy: pathogenesis reviewed. *J Paediatr Child Health* 2001;37:206-9.
- ¹⁰¹Hongou K, Konishi T, Yagi S, Araki K, Miyawaki T. Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsions in infants. *Pediatr Neurol* 1998;18:354-7.
- ¹⁰²Rodriguez 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;91:188-93.
- ¹⁰³Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RL, i sur. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:221-7.
- ¹⁰⁴Haffejee IE. Neonatal rotavirus infections. *Rev Infect Dis* 1991;13:957-62.
- ¹⁰⁵Tallett S, MacKenzie C, Middleton P, Kerzner B, Hamilton R. Clinical, laboratory, and epidemiologic features of a viral gastroenteritis in infants and children. *Pediatrics* 1977;60:217-22.
- ¹⁰⁶Akelma AZ, Küttükoğlu I, Köksal T, Cizmeci MN, Kanburoglu MK, Catal F, i sur. Serum transaminase elevation in children with rotavirus gastroenteritis: seven years' experience. *Scand J Infect Dis* 2013;45:362-7.
- ¹⁰⁷Hull JJ, Cunliffe N, Jere KC, Moon SS, Wang Y, Parashar U, i sur. Rotavirus antigen, cytokine, and neutralising antibody profiles in sera of children with and without HIV infection in Blantyre, Malawi. *Malawi Med J* 2017;29:24-28.
- ¹⁰⁸Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken RH. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr* 1980;97:61-5.
- ¹⁰⁹Yolken RH, Bishop CA, Townsend TR, Bolyard EA, Bartlett J, Santos GW, i sur. Infectious gastroenteritis in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982;306:1010-2.

-
- ¹¹⁰Rotbart HA, Nelson WL, Glode MP, Triffon TC, Kogut SJ, Yolken RH, i sur. Neonatal rotavirus-associated necrotizing enterocolitis: case control study and prospective surveillance during an outbreak. *J Pediatr* 1988;112:87-93.
- ¹¹¹Bines JE, Liem NT, Justice FA, Son TN, Kirkwood CD, de Campo M, i sur. Intussusception Study Group. Risk factors for intussusception in infants in Vietnam and Australia: adenovirus implicated, but not rotavirus. *J Pediatr* 2006;149:452-60.
- ¹¹²Hertel PM, Estes MK. Rotavirus and biliary atresia: can causation be proven? *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:10-7.
- ¹¹³Velázquez FR, Luna G, Cedillo R, Torres J, Muñoz O. Natural rotavirus infection is not associated to intussusception in Mexican children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(10 Suppl):S173-8.
- ¹¹⁴Guarino 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. 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;59:132-52.
- ¹¹⁵Mitra AK, Mahalanabis D, Ashraf H, Unicomb L, Eeckels R, Tzipori S. Hyperimmune cow colostrum reduces diarrhoea due to rotavirus: a double-blind, controlled clinical trial. *Acta Paediatr* 1995;84:996-1001.
- ¹¹⁶Guarino A, Canani RB, Russo S, Albano F, Canani MB, Ruggeri FM, i sur. Oral immunoglobulins for treatment of acute rotaviral gastroenteritis. *Pediatrics* 1994;93:12-6.
- ¹¹⁷Hilpert H, Brüssow H, Mietens C, Sidoti J, Lerner L, Werchau H. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. *J Infect Dis* 1987;156:158-66.
- ¹¹⁸Sarker SA, Casswall TH, Mahalanabis D, Alam NH, Albert MJ, Brüssow H, i sur. Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:1149-54.

-
- ¹¹⁹Rahman S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Taniguchi K, Icatlo FC Jr, Tsuji T, i sur. Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. *Vaccine* 2012;30:4661-9.
- ¹²⁰Brown JW. Toxic megacolon associated with loperamide therapy. *JAMA* 1979;241:501-2.
- ¹²¹Li ST, Grossman DC, Cummings P. Loperamide therapy for acute diarrhea in children: systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2007;4:e98.
- ¹²²Curtis JA, Goel KM. Lomotil poisoning in children. *Arch Dis Child* 1979;54:222-5.
- ¹²³Figueroa-Quintanilla D, Salazar-Lindo E, Sack RB, León-Barúa R, Sarabia-Arce S, Campos-Sánchez M, i sur. Eyzaguirre-Maccan E. A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *N Engl J Med* 1993;328:1653-8.
- ¹²⁴Lehert P, Chéron G, Calatayud GA, Cézard JP, Castrellón PG, Garcia JM, i sur. Racecadotril for childhood gastroenteritis: an individual patient data meta-analysis. *Dig Liver Dis* 2011;43:707-13.
- ¹²⁵Gordon M, Akobeng A. Racecadotril for acute diarrhoea in children: systematic review and meta-analyses. *Arch Dis Child* 2016;101:234-40.
- ¹²⁶Salazar-Lindo E, Santisteban-Ponce J, Chea-Woo E, Gutierrez M. Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *N Engl J Med* 2000;343:463-7.
- ¹²⁷Narkeviciute I, Rudzeviciene O, Leviniene G, Mociskiene K, Eidukevicius R. Management of Lithuanian children's acute diarrhoea with Gastrolit solution and dioctahedralsmectite. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:419-24.
- ¹²⁸Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis* 2009;13:518-23.
- ¹²⁹De Mol P, Zissis G, Butzler JP, Mutwewingabo A, André FE. Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* 1986;2:108.

-
- ¹³⁰Flores J, Perez-Schael I, Gonzalez M, Garcia D, Perez M, Daoud N, i sur. Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants. *Lancet* 1987;1:882-4.
- ¹³¹Santosham M, Letson GW, Wolff M, Reid R, Gahagan S, Adams R, i sur. A field study of the safety and efficacy of two candidate rotavirus vaccines in a Native American population. *J Infect Dis* 1991;163:483-7.
- ¹³²Vesikari T. Clinical trials of live oral rotavirus vaccines: the Finnish experience. *Vaccine* 1993;11:255-61.
- ¹³³Midthun K, Greenberg HB, Hoshino Y, Kapikian AZ, Wyatt RG, Chanock RM. Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates. *J Virol* 1985;53:949-54.
- ¹³⁴Midthun K, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chanock RM. Single gene substitution rotavirus reassortants containing the major neutralization protein (VP7) of human rotavirus serotype 4. *J Clin Microbiol* 1986;24:822-6.
- ¹³⁵Clark HF, Borian FE, Plotkin SA. Immune protection of infants against rotavirus gastroenteritis by a serotype 1 reassortant of bovine rotavirus WC3. *J Infect Dis* 1990;161:1099-104.
- ¹³⁶Treanor JJ, Clark HF, Pichichero M, Christy C, Gouvea V, Shrager D, i sur. Evaluation of the protective efficacy of a serotype 1 bovine-human rotavirus reassortant vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:301-7.
- ¹³⁷Kapikian AZ, Simonsen L, Vesikari T, Hoshino Y, Morens DM, Chanock RM, i sur. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *J Infect Dis* 2005;192(Suppl 1):S22-9.
- ¹³⁸American Academy of Pediatrics. Prevention of rotavirus disease: guidelines for use of rotavirus vaccine. *Pediatrics* 1998;102:1483-91.
- ¹³⁹FDA licenses rotavirus vaccine for infants. *Am J Health Syst Pharm* 1998;55:2226-28.

-
- ¹⁴⁰Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, Bernstein DI, Pichichero ME, Zito ET, i sur. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines-report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics* 1996;97:7-13.
- ¹⁴¹Losonsky GA, Rennels MB, Kapikian AZ, Midthun K, Ferra PJ, Fortier DN, i sur. Safety, infectivity, transmissibility and immunogenicity of rhesus rotavirus vaccine (MMU 18006) in infants. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:25-9.
- ¹⁴²Perez-Schael I, Gonzalez M, Daoud N, Perez M, Soto I, Garcia D, i sur. Reactogenicity and antigenicity of the rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan children. *J Infect Dis* 1987;155:334-8.
- ¹⁴³Bernstein 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;273:1191-6.
- ¹⁴⁴Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine-United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:577-81.
- ¹⁴⁵Abramson JS, Baker CJ, Fisher MC, Gerber MA, Meissner HC, Murray DL, i sur. Possible association of intussusception with rotavirus vaccination. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. *Pediatrics* 1999;104(3 Pt 1):575.
- ¹⁴⁶Kramarz P, France EK, Destefano F, Black SB, Shinefield H, Ward JI, i sur. Population-based study of rotavirus vaccination and intussusception. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:410-6.
- ¹⁴⁷Rothman KJ, Young-Xu Y, Arellano F. Age dependence of the relation between reassortant rotavirus vaccine (RotaShield) and intussusception. *J Infect Dis* 2006;193:898.
- ¹⁴⁸Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:1007.
- ¹⁴⁹Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR, Schiff GM, Sander DS, DeFeudis D, i sur. Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine* 1998;16:381-7.

-
- ¹⁵⁰Phua KB, Quak SH, Lee BW, Emmanuel SC, Goh P, Han HH, i sur. Evaluation of RIX4414, a live, attenuated rotavirus vaccine, in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial involving 2464 Singaporean infants. *J Infect Dis* 2005;192(Suppl 1):S6-S16.
- ¹⁵¹Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E, Reisinger K, Smith VE, O'Sullivan D, i sur. Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 1999;354:287-90.
- ¹⁵²Vesikari T, Karvonen A, Puustinen L, Zeng SQ, Szakal ED, Delem A, i sur. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:937-43.
- ¹⁵³Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, i sur. Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354:11-22.
- ¹⁵⁴Bernstein 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;162:1055-62.
- ¹⁵⁵Clark HF, Offit PA, Plotkin SA, Heaton PM. The new pentavalent rotavirus vaccine composed of bovine (strain WC3) - human rotavirus reassortants. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:577-83.
- ¹⁵⁶Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, i sur. Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2006;354:23-33.
- ¹⁵⁷Vesikari T, Karvonen A, Ferrante SA, Kuter BJ, Ciarlet M. Sustained efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RV5, up to 3.1 years following the last dose of vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:957-63.
- ¹⁵⁸Staat MA, Payne DC, Donauer S, Weinberg GA, Edwards KM, Szilagyi PG, i sur. New Vaccine Surveillance Network (NVSN). Effectiveness of pentavalent rotavirus vaccine against severe disease. *Pediatrics* 2011;128:e267-75.

-
- ¹⁵⁹Lopman BA, Curns AT, Yen C, Parashar UD. Infant rotavirus vaccination may provide indirect protection to older children and adults in the United States. *J Infect Dis* 2011;204:980-6.
- ¹⁶⁰Velasquez DE, Parashar U, Jiang B. Decreased performance of live attenuated, oral rotavirus vaccines in low-income settings: causes and contributing factors. *Expert Rev Vaccines* 2018;17:145-161.
- ¹⁶¹Wang Y, Azevedo M, Saif LJ, Gentsch JR, Glass RI, Jiang B. Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets. *Vaccine* 2010;28:5432-6.
- ¹⁶²Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, i sur. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:506-14.
- ¹⁶³Metchnikoff E. The prolongation of life: Optimistic studies, U: Chalmers Mitchell P, ur. *Classics in Longevity and Aging*. New York, NY: Springer;2004., Str. 116.
- ¹⁶⁴Rijkers GT, de Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *Br J Nutr* 2011;106:1291-6.
- ¹⁶⁵Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, i sur. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol* 2016;16:90.
- ¹⁶⁶Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:859-904.
- ¹⁶⁷Gueimonde M, Collado MC. Metagenomics and probiotics. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(Suppl 4):32-4.
- ¹⁶⁸Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160-74.
- ¹⁶⁹Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991;88:90-7.

-
- ¹⁷⁰Isolauri E, Kaila M, Mykkänen H, Ling WH, Salminen S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci* 1994;39:2595-600.
- ¹⁷¹Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 1995;72:51-3.
- ¹⁷²Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkänen H, Vesikari T. Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:399-404.
- ¹⁷³Shornikova AV, Casas IA, Mykkänen H, Salo E, Vesikari T. Bacteriotherapy with Lactobacillus reuteri in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:1103-7.
- ¹⁷⁴Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Møller PL, Pedersen P, i sur. Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:411-6.
- ¹⁷⁵Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Møller PL, Tvede M i sur. Effect of probiotic Lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:417-9.
- ¹⁷⁶Costa-Ribeiro H, Ribeiro TC, Mattos AP, Valois SS, Neri DA, Almeida P i sur. Limitations of probiotic therapy in acute, severe dehydrating diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:112-5.
- ¹⁷⁷Wanke M, Szajewska H. Lack of an Effect of Lactobacillus reuteri DSM 17938 in Preventing Nosocomial Diarrhea in Children: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Pediatr* 2012;161:40-3.e1.
- ¹⁷⁸Fang SB, Lee HC, Hu JJ, Hou SY, Liu HL, Fang HW. Dose-dependent effect of Lactobacillus rhamnosus on quantitative reduction of faecal rotavirus shedding in children. *J Trop Pediatr* 2009;55:297-301.
- ¹⁷⁹Guandalini S. Probiotics for children with diarrhea: an update. *J Clin Gastroenterol* 2008;42(Suppl 2):S53-7.

-
- ¹⁸⁰Hrvatski leksikon. Adsorpcija. [Internet], 2017. [pristupljeno 03.06.2018.]. Dostupno na: <http://www.hrleksikon.info/definicija/adsorpcija.html>
- ¹⁸¹Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – Activated carbon; [ažurirano 02.06.2018; pristupljeno 03.06.2018.]. Dostupno na https://en.wikipedia.org/wiki/Activated_carbon
- ¹⁸²Dupont C, Foo JL, Garnier P, Moore N, Mathiex-Fortunet H, Salazar-Lindo E; Peru and Malaysia Diosmectite Study Groups. Oral diosmectite reduces stool output and diarrhea duration in children with acute watery diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:456-62.
- ¹⁸³Nikolaev VG. Enterosgel: A Novel Organosilicon Enterosorbent with a Wide Range of Medical Applications. U: Mikhalovsky S, Khajibaev A. Biodefence: Advanced Materials and Methods for Health Protection. Nizozemska: Springer; 2011.
- ¹⁸⁴Kaban OP, Hunina LM, Shevchenko IuM, Chornyĭ VO, Korobko VB, Valets'kyĭ VL i sur. Efficacy and perspective of application of preparation based on hydrogel and xerogel of methyl-silicic acid in patients with the intestinal malignancy. *Klin Khir* 2001;(1):34-7.
- ¹⁸⁵Burdeniuk IT. Detoxication properties of enterosgel in the treatment of purulent peritonitis. *Klin Khir* 1999;(10):32-3.
- ¹⁸⁶Beliaeva OA. The treatment of intra-abdominal abscess. *Klin Khir* 1998;(7):32-3.
- ¹⁸⁷Vozianov AF, Kolesnik NA, Samodumova IM. Enterosorption in the treatment of chronic kidney failure in patients with surgical diseases of the kidneys. *Lik Sprava* 1992;(2):90-3.
- ¹⁸⁸Popov VL, Sobko IV, Samodumova IM. The effectiveness of polymethylsiloxane as a hemosorbent in experiments on obstructive jaundice. *Klin Khir* 1997;(7-8):87-9.
- ¹⁸⁹Nikolaeva LG, Grigor'ev AV, Znamenskiĭ VA, Koval'chuk VK, Alekseenko EP. An experimental study of the efficacy of enterosorbents in salmonellosis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1994;(2):7-11.
- ¹⁹⁰Dzyublik IV, Shun'ko EE, Barbova AI. Application of enterosgel for treatment of the rotavirus infection in neonates. Kiev: Shupik Kiev Medical Academy of Post-Graduate Education; 1997.

-
- ¹⁹¹Barbova AI. The sorption of human and animal rotaviruses by Enterogel. *Mikrobiol Z* 1995;57:52-7.
- ¹⁹²Sharonina LY, Aleksandrova VV, Gerashchenko VI, Ul'yanova IV, Bandina O. Experience of treatment of patients suffered from the rotavirus infection. Proceedings of the Research and Practice Conference "Infectious diseases and new technologies in medicine". Lipetsk; 1998.
- ¹⁹³Uchaikin VF. Report on the first step of the research „Study of the clinical efficacy of the oral enterosorbent ENTEROSGEL upon enteroides in children”. [Internet]. Prag: Bioline Products s.r.o., 2001. [pristupljeno 03.06.2018.]. Dostupno na: <http://www.enterogel.eu/an/klinicke-studie/pro-infektology/>
- ¹⁹⁴Givon-Lavi N, Greenberg D, Dagan R. Comparison between two severity scoring scales commonly used in the evaluation of rotavirus gastroenteritis in children. *Vaccine* 2008;26:5798-801.
- ¹⁹⁵Aslan 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 (Lond)* 2015;47:332-7.
- ¹⁹⁶Uhnoo I, Olding-Stenkvis E, Kreuger A. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses, and bacteria. *Arch Dis Child* 1986;61:732-8.
- ¹⁹⁷Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis* 1981;144:218-24.
- ¹⁹⁸Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2010. [pristupljeno 03.06.2018.]. Dostupno na: http://www.cochrane.org/CD003048/INFECTN_probiotics-for-treating-acute-infectious-diarrhoea
- ¹⁹⁹Canani RB, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo MI, De Vincenzo A, i sur. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *BMJ* 2007;335:340.
- ²⁰⁰Madkour AA, Madina EM, el-Azzouni OE, Amer MA, el-Walili TM, Abbass T. Smectite in acute diarrhea in children: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:176-81.

-
- ²⁰¹Xu M, Wang J, Wang N, Sun F, Wang L, Liu XH. The Efficacy and Safety of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for Infantile Colic: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One* 2015;10:e0141445.
- ²⁰²Athalye-Jape G, Rao S, Patole S. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 as a Probiotic for Preterm Neonates: A Strain-Specific Systematic Review. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2016;40:783-94.
- ²⁰³Dinleyici EC, Dalgic N, Guven S, Metin O, Yasa O, Kurugol Z, i sur. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. *J Pediatr (Rio J)* 2015;91:392-6.
- ²⁰⁴Cheriathu J, Jenny John L, Ignatius Dsouza E, i sur. Sociodemographic Pattern And Seasonal Pattern Of Rota Virus Infection In Children Under Five Years Old. *Arch Dis Child* 2014;99:A318.
- ²⁰⁵Karadag A, Acikgoz ZC, Avci Z, Catal F, Gocer S, Gamberzade S, i sur. Childhood diarrhea in Ankara, Turkey: epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. *Scand J Infect Dis* 2005;37:269-75.
- ²⁰⁶Moe K, Hummelman EG, Oo WM, Lwin T, Htwe TT. Hospital-based surveillance for rotavirus diarrhea in children in Yangon, Myanmar. *J Infect Dis* 2005;192:111-3.
- ²⁰⁷Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, i sur. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:e134-47.
- ²⁰⁸Johansen K, Hedlund KO, Zwegberg-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;40:958-64.
- ²⁰⁹Teitelbaum JE, Daghistani R. Rotavirus causes hepatic transaminase elevation. *Dig Dis Sci* 2007;52:3396-8.
- ²¹⁰Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ, Xie JM, Liu Q, Liang XR, i sur. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol* 1991;34:29-37.
- ²¹¹Mikati MA. Febrile seizures. U: Kliegman R, Nelson WE, ur. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19. izd. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2011.

²¹²Sackesen C, Sekerel BE, Orhan F, Kocabas CN, Tuncer A, Adalioglu G. The etiology of different forms of urticaria in childhood. *Pediatr Dermatol* 2004;21:102-8.

²¹³Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – Bristol stool scale; [ažurirano 19.05.2018; pristupljno 03.06.2018.]. Dostupno na:https://en.wikipedia.org/wiki/Bristol_stool_scale

²¹⁴Liacouras CA. Normal digestive tract phenomena. U: Kliegman R, Nelson WE, ur. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19. izd. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2011.

11. ŽIVOTOPIS

Leo Markovinović rođen je 23. srpnja 1967. godine u Zagrebu gdje je završio osnovnu i srednju školu. Studij medicine upisao je 1986. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Studirao je od 1987. do 1992. godine kada je i diplomirao. Obvezni liječnički staž odradio je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Stručni ispit položio je 1993. godine. Sljedeće dvije i pol godine radio je kao vojni liječnik II. gardijske brigade „Gromovi“, potom kao liječnik hitne službe Doma zdravlja Dugo Selo, zatim kao liječnik opće medicine u ambulanti Goričan Doma zdravlja Čakovec i na kraju kao djelatnik Ustanove za hitnu medicinsku pomoć grada Zagreba. Od 2. siječnja 1996. godine zaposlen je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Stručni poslijediplomski studij iz infektologije započeo je 1997. godine. Specijalistički ispit položio je 2002. godine. Od 2003. godine radi kao odjelni liječnik u Zavodu za infektivne bolesti djece u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Školske godine 2002/2003. upisao je razlikovnu godinu za znanstveni poslijediplomski studij. Stručni poslijediplomski studij iz kliničke pedijatrije pohađao je 2004. godine, a 2005. godine upisao je doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“. Ministarstvo zdravstva RH priznalo je dr. Markovinoviću stručni naziv „primarijus“ 2017. godine.

Objavio je nekoliko stručnih radova od kojih je 9 citirano u Current Contents-u.