

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: preventivní medicína



MUDr. Simona Arientová

Diagnostika virových gastroenteritid u dětí do pěti let
metodou elektronové mikroskopie

Electron microscopy in the diagnosis of viral gastroenteritis
in children less than five years old

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.

Konzultant: RNDr. Jana Schramlová, CSc.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 25. 1. 2013

MUDr. Simona Arientová

ARIENTOVÁ, Simona. Diagnostika virových gastroenteritid u dětí do pěti let metodou elektronové mikroskopie. [Electron microscopy in the diagnosis of viral gastroenteritis in children less than five years old]. Praha, 2013. 74s., 6 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, 1. Infekční klinika. Školitel, Marešová.

Poděkování:

Mým školitelkám, doc. Marešové, Dr. Ambrožové a Dr. Schramlové, bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc, důsledné vedení a přátelský přístup v průběhu postgraduálního studia.

Prof. Holubovi děkuji za pomoc při editaci práce a zpracování statistiky.

Dr. Zachovalové děkuji za přátelský přístup a pomoc při korekturách a překladech mých vědeckých prací.

Obsah:

1. Akutní gastroenteritidy	8
1.1. Úvod, definice	8
1.2. Etiologie	8
1.3. Historie	10
1.4. Jednotliví původci virových gastroenteritid.....	12
1.4.1. Rotaviry.....	12
1.4.2. Caliciviry.....	19
1.4.3. Adenoviry.....	22
1.4.4. Astroviry	24
1.4.5. Koronaviry	26
1.5. Diagnostika	28
1.6. Terapie.....	29
1.7. Prevence	30
2. Elektronová mikroskopie	32
2.1. Úvod, definice	32
2.2. Historie.....	34
3. Cíle práce	35
4. Materiál a metody	36
4.1. Studovaná skupina	36
4.2. Bakteriologické vyšetření stolice	36
4.3. Latexová aglutinace	36
4.4. Elektronová mikroskopie	37
4.5. Statistické metody	38
5. Výsledky	39

5.1. Etiologie AGE	43
5.2. Výsledky jednotlivých metod EM a LAG	45
5.3. Srovnání EM a LAG	46
5.4. Sezónnost virů vyvolávající VGE	48
5.5. Srovnání výskytu virů v jednotlivých obdobích	49
6. Diskuse	53
7. Závěr.....	60
8. Souhrn	62
9. Summary	63
10. Seznam zkratk	65
11. Literatura.....	66
12. Přílohy	75
Příloha 1. PŮVODNÍ ČLÁNEK FOLIA MICROBIOLOGICA	75
Příloha 2. PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK FOLIA MICROBIOLOGICA.....	76
Příloha 3. PŮVODNÍ ČLÁNEK PEDIATRIE PRO PRAXI.....	77
Příloha 4. POSTER PREZENTOVANÝ NA KONGRESU ESPID.....	78
Příloha 5. POSTER PREZENTOVANÝ NA SVK 2. LF UK	79
Příloha 6. SEZNAM PUBLIKACÍ, ABSTRAKT PŘEDNÁŠEK.....	80

1. Akutní gastroenteritidy

1.1. Úvod, definice

Akutní průjmová onemocnění jsou Světovou zdravotnickou organizací (WHO) definována jako stavy provázené dvěma nebo více řídkými stolicemi denně, nebo i jedinou řídkou stolicí, která obsahuje hlen, krev nebo hnis. Jiná definice označuje průjmové onemocnění jako změnu frekvence, konzistence, barvy či objemu stolice oproti běžnému stavu u téhož jedince. Tento stav může být doprovázen i zvracením. Každá definice musí splňovat i podmínku náhlého vzniku s délkou trvání maximálně 14 dnů. U dětí do dvou let je akutní gastroenteritida definována jako ztráta tekutin stolicí větší než 10 ml/kg/den, u starších dětí jako ztráta tekutin stolicí větší než 200 g/den nebo řídké až vodnaté stolice produkované častěji než 4x denně (*Goldmund K., 2001; Sýkora J. a Huml M., 2008; Táborská J., 2005*).

Akutní gastroenteritidy (AGE) jsou jedním z nejčastějších onemocnění u dětí na celém světě (*Karsten C. et al., 2009*). Zejména v rozvojových zemích jsou stále významnou příčinou morbidit a mortality. Ročně jsou zodpovědné za smrt 1,5 milionů dětí v prvních pěti letech jejich života (*Dey SK. et al., 2007; Fabiana A. et al., 2007; Guerrant RL. et al., 2001*). Ve vyspělých zemích jsou smrtelné případy podstatně vzácnější a hlavní dopad onemocnění je především ekonomický, spočívající ve vysoké nemocnosti a v počtu hospitalizací, které si tato nemoc vynutí (*Dey SK. et al., 2007*).

1.2. Etiologie

Infekční průjmová onemocnění mohou být způsobena viry, bakteriemi (např. *Campylobacter jejuni, Salmonella enteritidis*, patogenní kmeny *Escherichia coli*), parazity

nebo plísněmi (obrázek 1 a 2). V našich podmínkách jde především o onemocnění virová a bakteriální. U dětí do pěti let jsou celosvětově za nejčastější etiologická agens AGE považovány viry (Ambrožová H., 2004; Ambrožová H., 2006a; Dey SK. et al., 2007; Sýkora J. a Huml M., 2008; Táborská J. a Pazdiora P., 2005).

Prokázanými původci virových gastroenteritid (VGE) jsou rotaviry (čeleď *Reoviridae*), caliciviry - noroviry a sapoviry (čeleď *Caliciviridae*), astroviry (čeleď *Astroviridae*) a střevní adenoviry (čeleď *Adenoviridae*). Pravděpodobnými původci VGE jsou střevní koronaviry (čeleď *Coronaviridae*), enteroviry (čeleď *Picornaviridae*), reoviry (čeleď *Reoviridae*), toroviry (čeleď *Coronaviridae*), parvoviry (čeleď *Parvoviridae*) a další (Ambrožová H., 2004; Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Desselberger U. and Gray J., 2004; Sýkora J. a Huml M., 2008; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Wilhelmi I. et al., 2003).

Obrázek 1: Vyvolavatelé AGE v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) – *Salmonella enteritidis* (bílá šipka) a rotaviry (pruhovaná šipka)

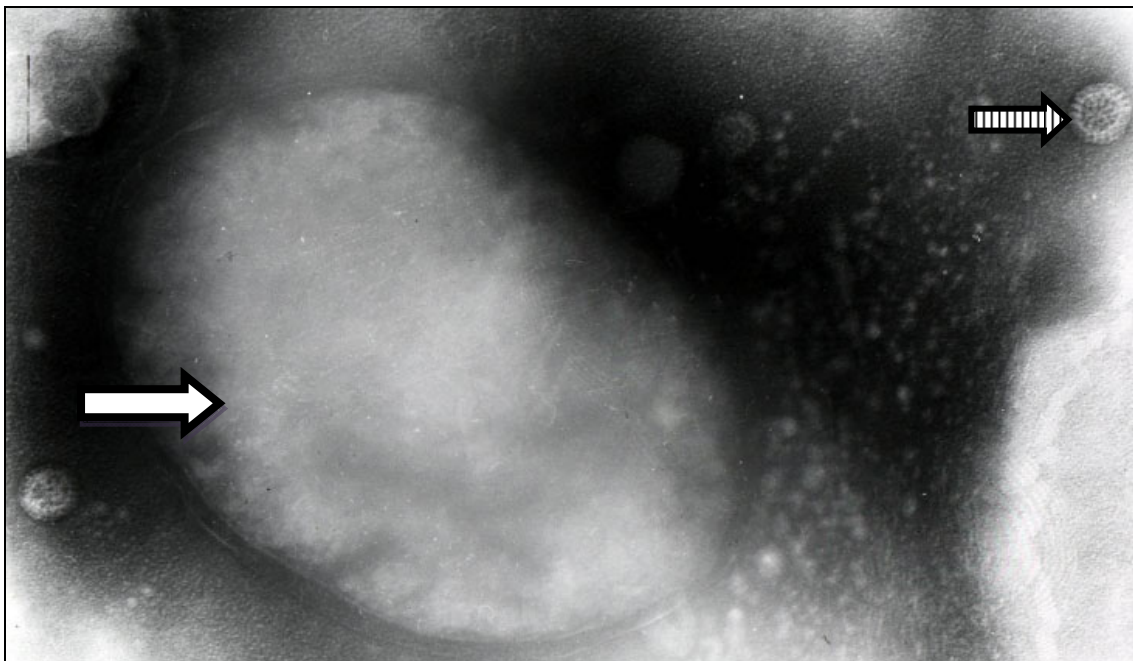


foto: autorka

Obrázek 2: Vyzvolavatelé AGE v transmissním elektronovém mikroskopu (TEM) – *Salmonella enteritidis* (bílá šipka) a rotaviry (pruhovaná šipka)

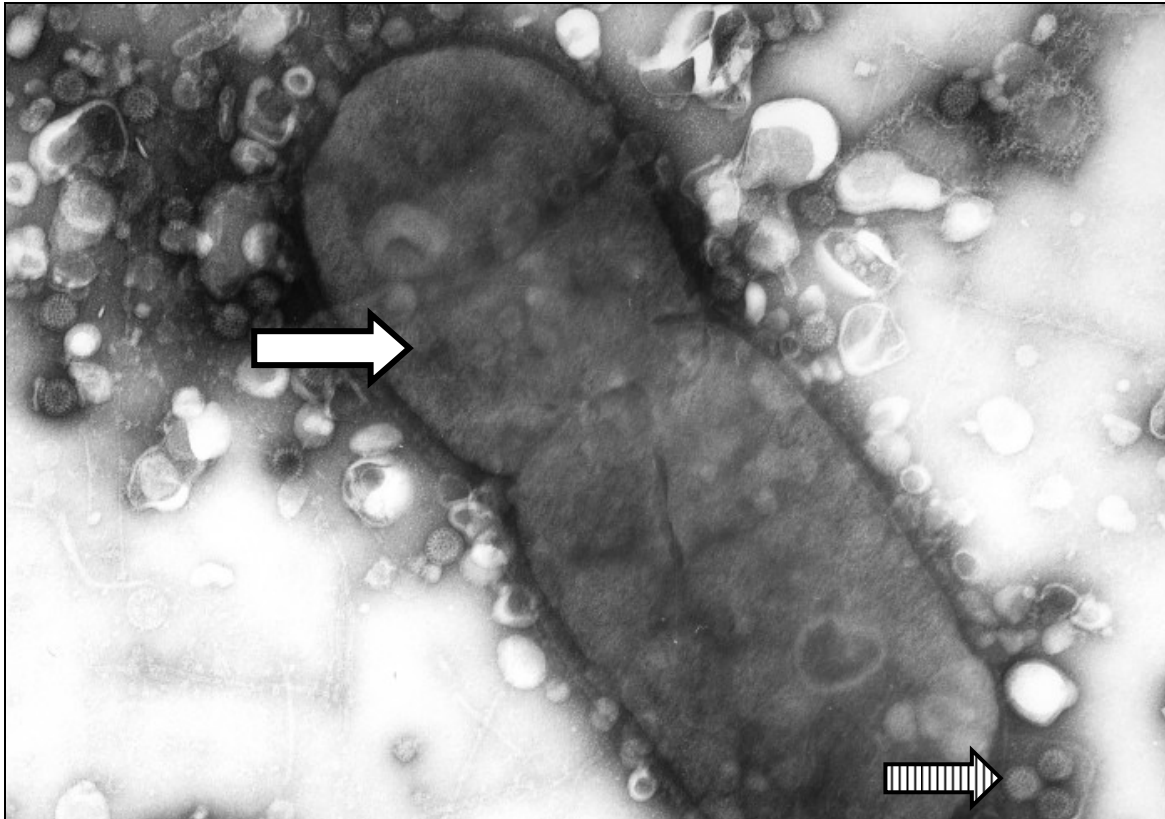


foto: autorka

1.3. Historie

Viry jako původci AGE byly rozpoznány mnohem později než bakterie. Jejich průkaz souvisel s rozvojem detekčních metod založených nejprve na přímém pozorování agens (elektronová mikroskopie) a později na průkazu antigenu ve stolici (Ambrožová H., 2006a). V roce 1972 Kapikian pomocí elektronové mikroskopie (EM) identifikoval Norwalk viry ve stolici jako původce AGE (Arias C. et al., 2010). Tyto viry byly pojmenovány podle místa vzplanutí epidemie AGE (Norwalk v Ohio); (Ambrožová H., 2006a; Wilhelmi I. et al., 2003). Rotaviry byly poprvé popsány o rok později (1973), kdy je Bishop se svými

spolupracovníky objevila pomocí EM v bioptických vzorcích duodena u dětí s průjmem (*Ambrožová H., 2006a; Wilhelmi I. et al., 2003*). V roce 1975 byly identifikovány i astroviry a střevní adenoviry. V roce 1988 pak koronaviry (Pereira); (*Ambrožová H., 2006a; Wilhelmi I. et al., 2003*). Od té doby se počet virů spojovaných s AGE neustále zvyšuje.

Na I. infekční klinice Nemocnice Na Bulovce (NNB) byly sledovány děti s AGE od roku 1977 a již tehdy bylo zjištěno, že rotaviry jsou nejčastějšími původci průjmových onemocnění u kojenců a batolat (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*). Do roku 1981 byla pro diagnostiku VGE k dispozici jen EM, ale pouze v některých ročních obdobích. V roce 1982 byla diagnostika rozšířena o metody enzymové imunoanalýzy (ELISA) a latexové aglutinace (LAG); (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*).

Dalším rozšířením diagnostických možností bylo zavedení průkazu rotavirových infekcí pomocí vyšetřování vzestupu rotavirových protilátek v párových sérech. Od roku 1984 se rotaviry vyšetřovaly rutinně (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*). V roce 1988 bylo v ČR celkem hlášeno kolem 506 tisíc případů AGE, z nichž bylo etiologicky objasněno jen 4,4 % případů. Mezi neobjasněnými případy vysoce převažovaly AGE nad hemoragickými enterokolitidami (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*).

1.4. Jednotliví původci virových gastroenteritid

1.4.1. Rotaviry

Rotaviry (čeleď *Reoviridae*) - jsou složeny z 11 segmentů dvouvláknové RNA, nejsou obalené a měří v průměru 70 nm. Obsahují dvojitou kapsidu, kdy vnější kapsida je uspořádána cirkulárně a vnitřní radiálně, což dává rotaviru jeho typický vzhled kola s loukotěmi (latinsky *rota* = kolo); (Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Esona MD. et al., 2009; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Pazdiora P. a Táborská J., 2004; Táborská J. a Pazdiora P., 2005; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003).

Rotaviry zahrnují 7 skupin (A-G), přičemž lidská onemocnění vyvolávají rotaviry ze skupin A-C. Nejvíce onemocnění je způsobeno rotaviry skupiny A (Esona MD. et al., 2009; Matthijnssens J. et al., 2010).

Je známo 14 sérotypů G a 20 genotypů P, nejčastějšími sérotypy ve světě jsou G1-G4 a G9. Z genotypů je nejobvyklejší P1a (Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Esona MD. et al., 2009; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Pazdiora P. a Táborská J., 2004; Táborská J. a Pazdiora P., 2005; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003). Zevní kapsida rotavirů obsahuje virové proteiny VP4 a VP7, které určují jejich sérotypovou příslušnost (Beneš J., 2009).

Rotaviry jsou rezistentní k tukovým rozpouštědlům. Jsou stabilní při pH 3-10, při pokojové teplotě mohou přežívat i několik týdnů. Dají se inaktivovat oxidačními činidly (Bednář M., 2009).

Rotaviry (obrázky 3-10) jsou považovány za nejčastější původce VGE u dětí s nejzávažnějším klinickým průběhem vyžadujícím většinou parenterální rehydrataci (Parashar UD. et al., 2003; Pazdiora P. a Švecová M., 2006; Steyer A. et al., 2006; Stupka JA. et al., 2007). Celosvětově se u více než 125 milionů malých dětí za rok rozvine průměrné onemocnění vyvolané rotaviry, mající za následek přibližně 440 tisíc úmrtí (Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Parashar UD. et al., 2003; Rahman M. et al., 2007).

Pro rotaviry je typický sezónní výskyt. V našich podmínkách mírného pásma se vyskytují v průběhu celého roku s maximem v zimních a prvních jarních měsících (Ambrožová H., 2004; Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H., 2006b; Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Táborská J. a Pazdiora P., 2005).

Rotaviry jsou vysoce kontagiózní a infekční dávka, která vyvolává onemocnění, je velmi malá. K přenosu dochází nejčastěji fekálně-orální cestou. K vyvolání rotavirové AGE stačí pouze 10 virových částic, přitom v 1 ml stolice dětí s AGE jich bývá $10^9 - 10^{11}$. Rotaviry nejsou typickými vyvolavateli velkých epidemií, častější jsou epidemické výskyty v menších kolektivech (jesle, školky, zařízení pro seniory). Rotaviry jsou i obávanými nozokomiálními patogeny (Ambrožová H., 2004; Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H., 2006b; Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Beneš J., 2009; Táborská J. a Pazdiora P., 2005).

Rotaviry jsou invazivní patogeny, které napadají cylindrické epitelové buňky vrcholků klků v horních dvou třetinách tenkého střeva. Výsledkem je lýza těchto zralých buněk odpovědných za absorpci tekutin a živin. Poškozené buňky se po pomnožení viru odlučují a jsou nahrazovány funkčně nezralými epitelii z krypt, které hypertrofují a vykazují zvýšenou sekreční aktivitu. Postižení epitelii klků vede ke snížení absorpce cukrů, nedostatku disacharidáz a intoleranci laktózy, a tím následně k osmotickému průjmu (Prokeš M. et al., 2012). V patogenezi rotavirové infekce se kromě invazivity viru významně

uplatňuje enterotoxin, který je spojován s rozvojem sekrečního průjmu. Plná regenerace střevní sliznice trvá 2-8 týdnů (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Beneš J., 2009; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Pazdiora P. a Táborská J., 2004; Táborská J. a Pazdiora P., 2005; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003*).

Průběh nákazy rotaviry bývá v polovině případů asymptomatický, v ostatních případech je vyjádřen různě. Typickým klinickým nálezem u rotavirů je obraz AGE vedoucí často k dehydrataci různého stupně. Onemocnění většinou začíná horečkou, zvracením a postupným rozvojem průjmu. Stolice jsou velmi četné, vodnaté, bez patologické příměsi. U dvou třetin pacientů bývá popisována klasická trias příznaků – horečka, zvracení a vodnatý průjem. Při nekomplikovaném průběhu trvá onemocnění 5-8 dnů. V laboratorním nálezu bývá lehká elevace jaterních transamináz (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H., 2006b; Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Beneš J., 2009; Táborská J. a Pazdiora P., 2005*).

Mezi nejčastější komplikace způsobené rotaviry patří dehydratace s poruchou elektrolytové rovnováhy. Dehydratace bývá závažnější než při AGE vyvolaných bakteriálními patogeny. Převažuje většinou normonatremický typ dehydratace, ale výjimkou není ani závažná hypernatremická dehydratace, u které hrozí rozvoj šoku se známkami postižení CNS a dalších orgánů (*Beneš J., 2009; Pazdiora P. a Táborská J., 2010*). Z dalších komplikací je nutné zmínit malabsorbční syndrom s protrahovanými průjmy, byly popsány aseptické meningitidy, nekrotizující enterokolitida, pneumonie, akutní myositida, rozvoj Crohnovy nemoci, hemolyticko-uremický syndrom a další (*Pazdiora P. a Táborská J., 2010*). Mimostřevní komplikace vznikají v souvislosti s přechodnou virémií. Převážná většina rotavirových AGE u nás ovšem proběhne bez komplikací a má dobrou prognózu (*Beneš J., 2009; Pazdiora P. a Táborská J., 2010*).

Po prodělané nákaze rotaviry vzniká typově až skupinově specifická imunita, která je však krátkodobá. Proto se dítě může nakazit a dokonce i znovu onemocnět již v další sezóně (Bednář M., 2009).

Obrázek 3: Rotavirová kolonie v TEM – celé viriony (bílá šipka) a rozpadající se části virů (pruhovaná šipka)

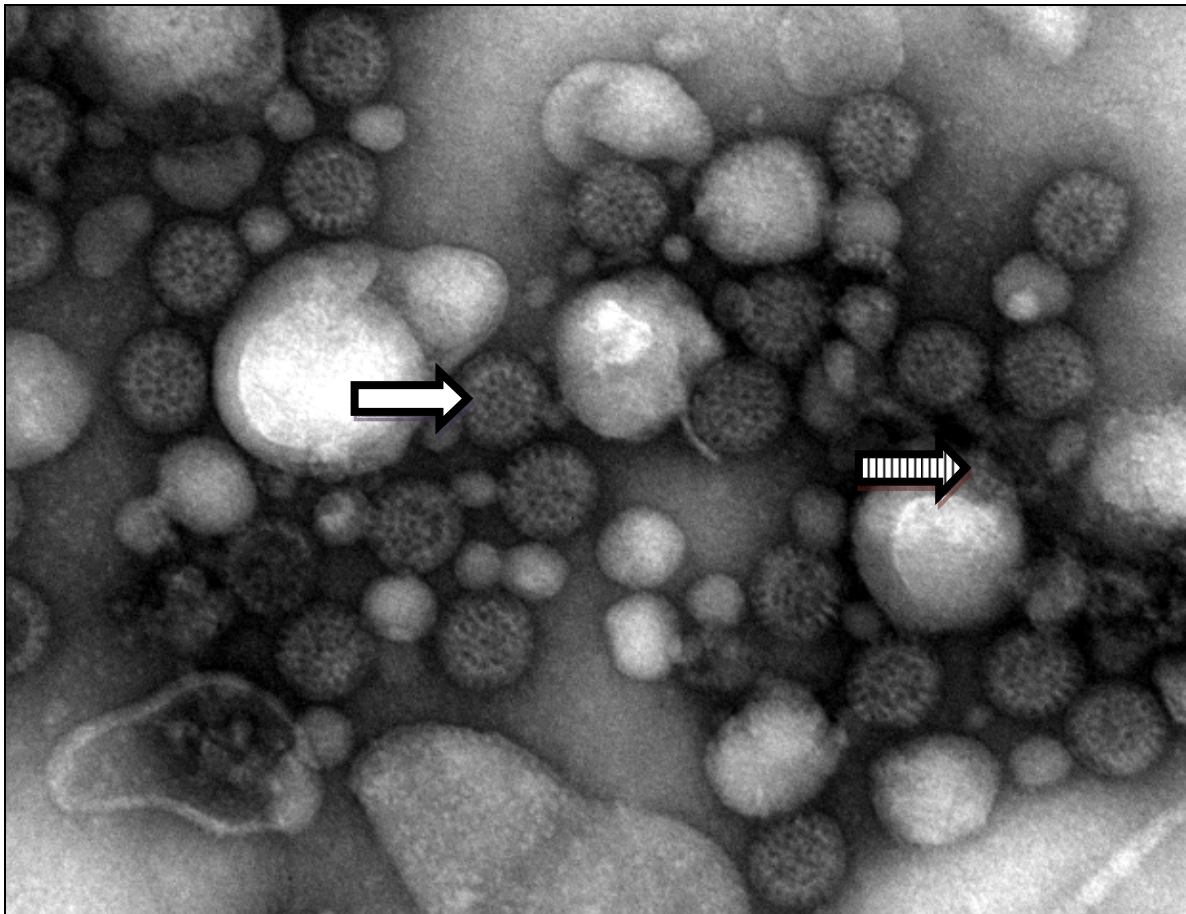


foto: autorka

Obrázek 4: Detail struktury rotavirů v TEM za použití většího zvětšení

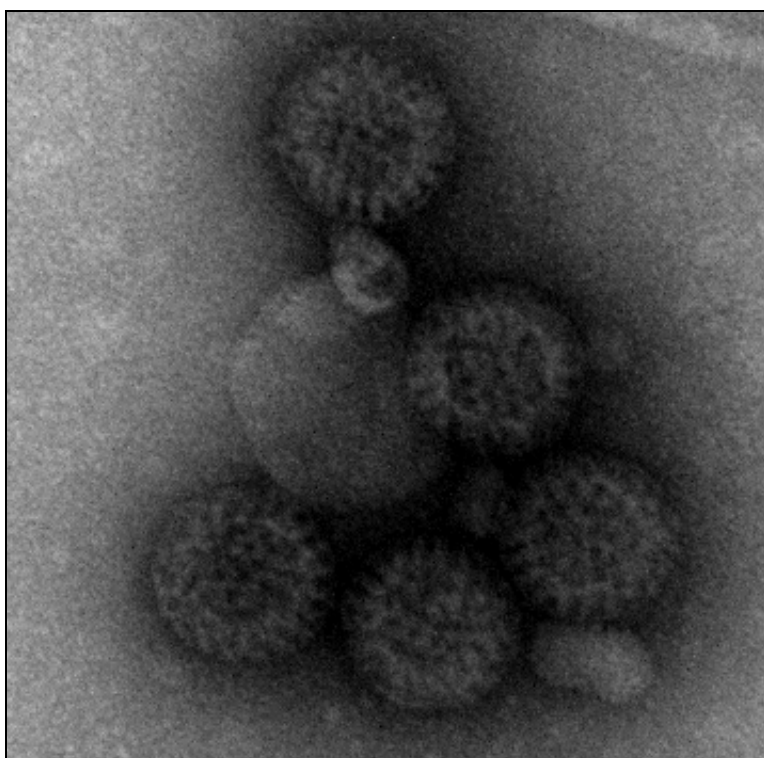


foto: autorka

Obrázek 5, 6: Rozpadající se rotaviry (šipka) a detail fragmentů rotavirů v TEM za použití většího zvětšení

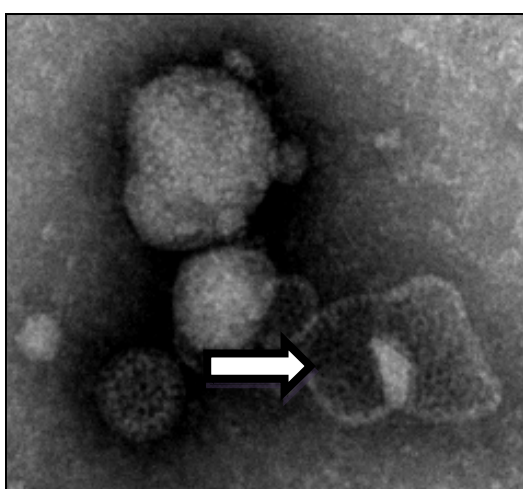


foto: autorka

Obrázek 7: Kolonie rotavirů v TEM a rozpadající se rotaviry (šipka)

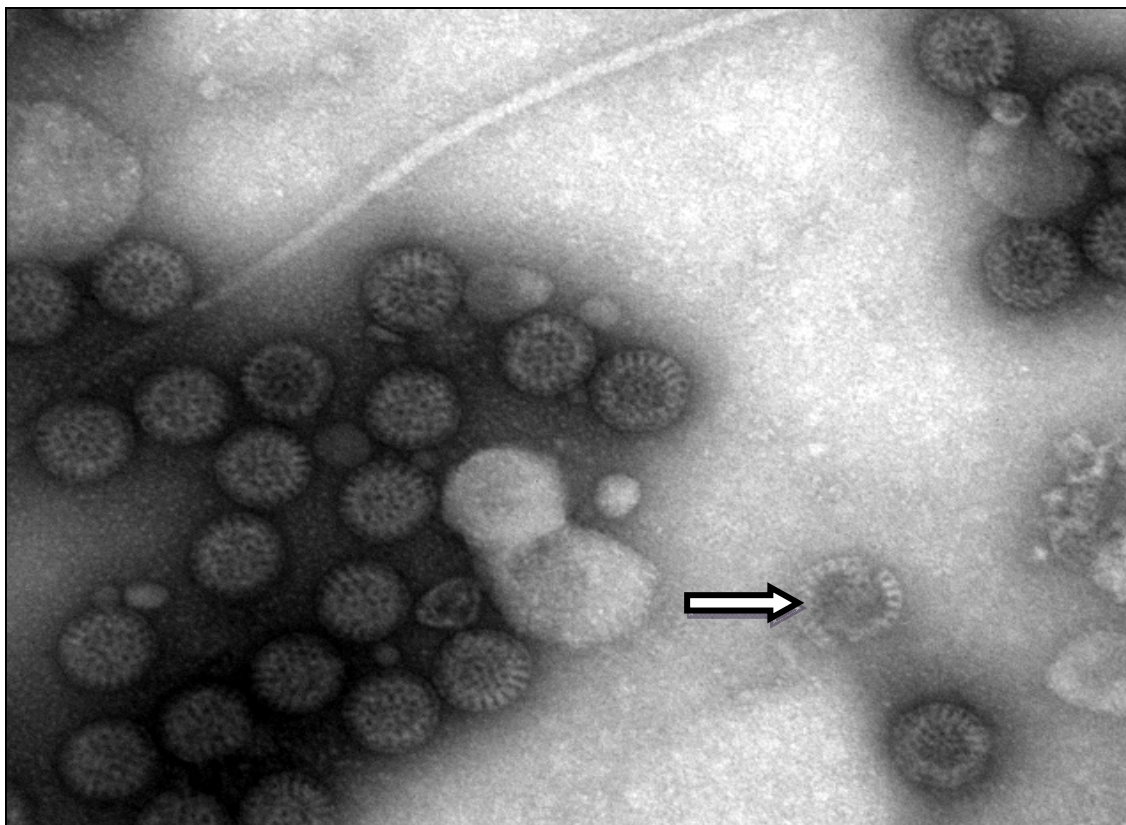


foto: autorka

Obrázek 8: Rotaviry uvnitř buňky v TEM

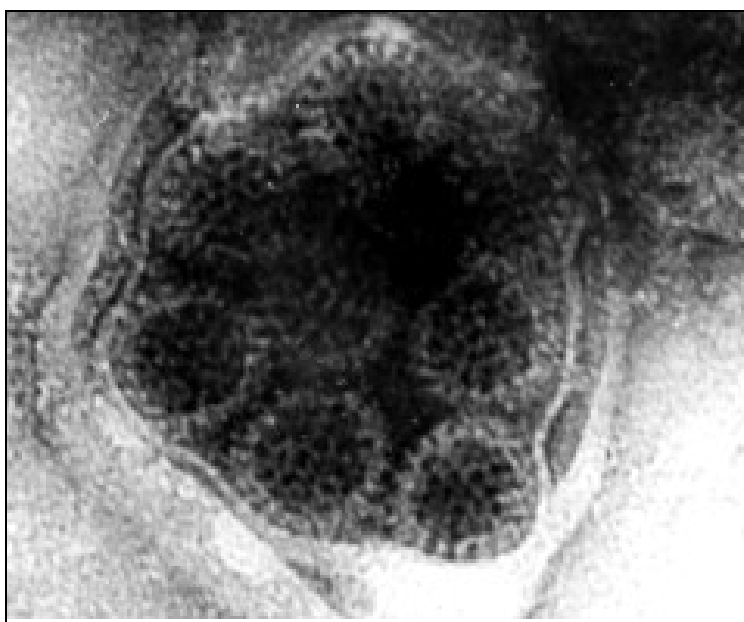


foto: autorka

Obrázek 9: Rotaviry v mozkomíšním moku u dítěte s aseptickou meningitidou

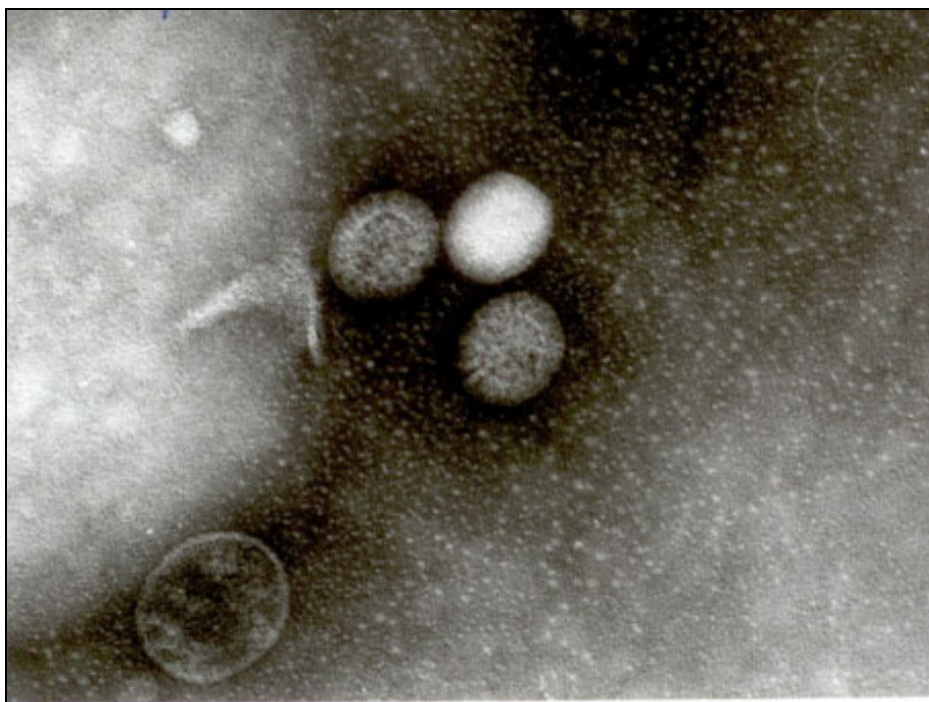


foto RNDr. Schramlová

Obrázek 10: Rotaviry v mozkomíšním moku u dítěte s aseptickou meningitidou

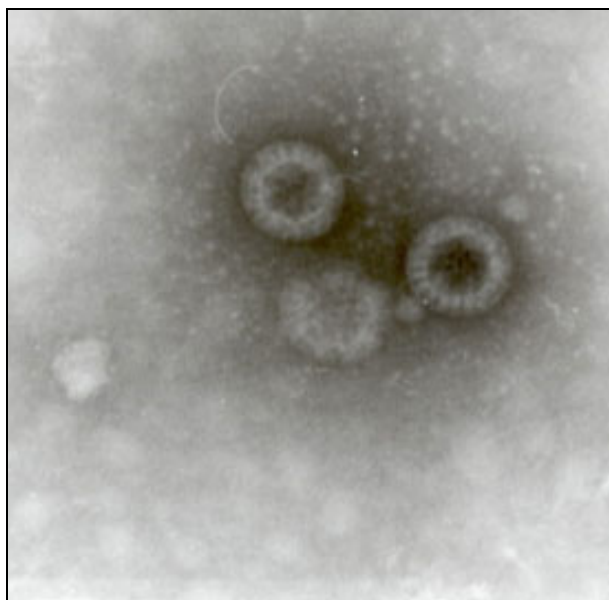


foto RNDr. Schramlová

1.4.2. Caliciviry

Caliciviry (čeleď *Caliciviridae*) - jsou malé (35-40 nm), neobalené viry obsahující jednovláknovou RNA. U lidí se setkáváme se dvěma typy calicivirů - **noroviry** (obrázek 11) a **sapoviry** (obrázek 12). Noroviry - dříve označované jako SRSV (small round structure virus), mají typický strukturovaný povrch, zatímco sapoviry - dříve označované jako lidské caliciviry, jsou typické svým hvězdicovitým vzhledem s pohárky na svém povrchu. Sapoviry byly poprvé pojmenovány po jejich objevení při propuknutí epidemie AGE v dětském domově v Sapporu v Japonsku v říjnu 1977 (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003*).

Norovirové infekce se vyskytují ve všech věkových skupinách, ale častější jsou u starších dětí a dospělých. Jsou spojeny zejména s epidemiemi v uzavřených kolektivech, jako jsou školy, nemocnice, hotely, restaurace, výletní lodě a armádní jednotky (*de Wit MSA. et al., 2003; Verhoef L. et al., 2010*). Naopak sapovirové infekce jsou spojeny zejména se sporadicky se vyskytujícími AGE u kojenců a malých dětí (*Ambrožová H., 2004; Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Gomes KA. et al., 2007*).

Infekční dávka je u norovirů velmi nízká, odhaduje se, že postačuje méně než 100 virových partikulí k vyvolání AGE. K přenosu dochází obvykle fekálně-orální cestou. Možná je i nákaza kontaminovanou vodou, ledem, potravinami (mušle, ústřice aj.) a aerosolem (*Beneš J., 2009; Verhoef L. et al., 2010*). Noroviry taktéž vykazují typickou sezónnost s maximem v zimních měsících, i když se mohou vyskytnout během celého roku (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007*).

Caliciviry (obrázek 13) postihují jen jejunum, kde vyvolávají reverzibilní histopatologické změny. Snižují enzymatickou aktivitu kartáčového lemu, což má za následek lehkou steatoreu a přechodnou malabsorpci sacharidů (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H.*

a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003).

V klinickém obraze dominuje zvracení, nauzea, někdy i křečovitě bolesti břicha, bolesti hlavy a svalů. Poté se objevuje průjem, stolice jsou vodnaté, bez příměsí. Průběh onemocnění je většinou afebrilní či subfebrilní. Onemocnění má krátké trvání, příznaky obvykle ustanou do 48 hodin od začátku calicivirové infekce (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Beneš J., 2009*).

Obrázek 11: Caliciviry v TEM – Sapoviry

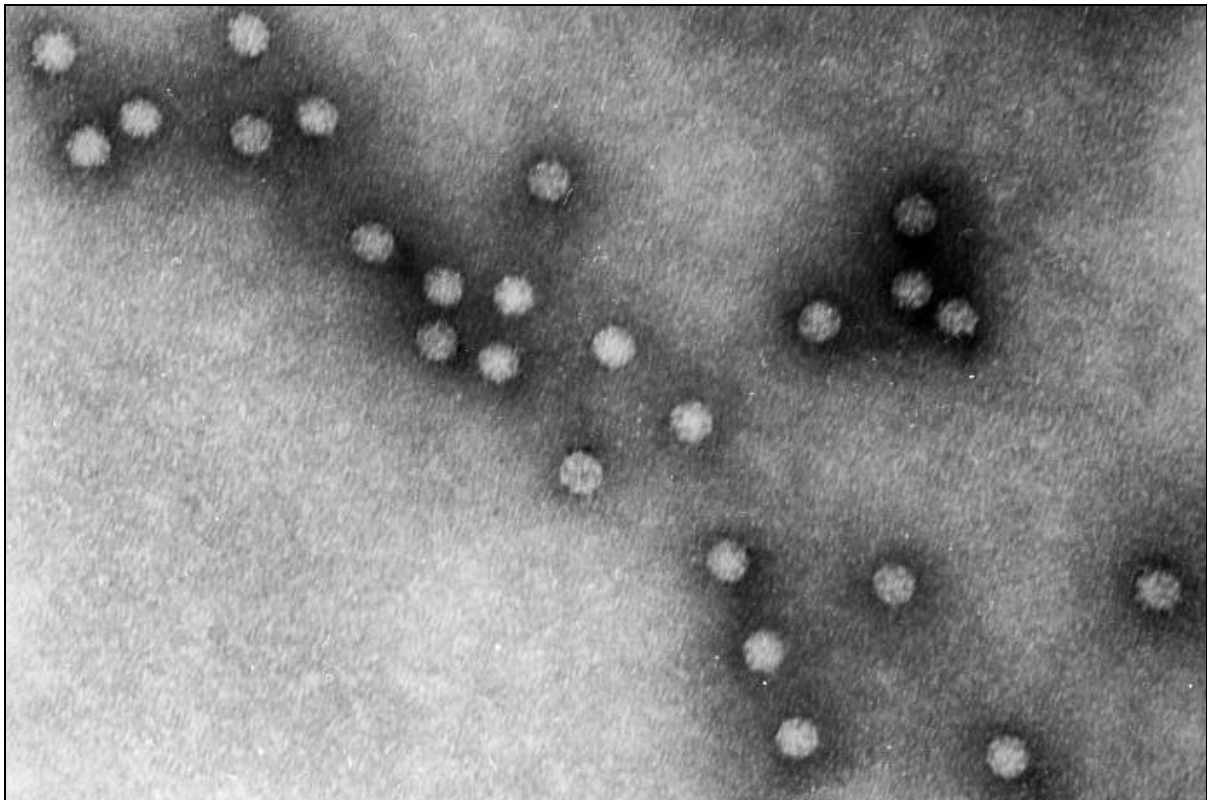


foto: autorka

Obrázek 12: Caliciviry v TEM – Noroviry

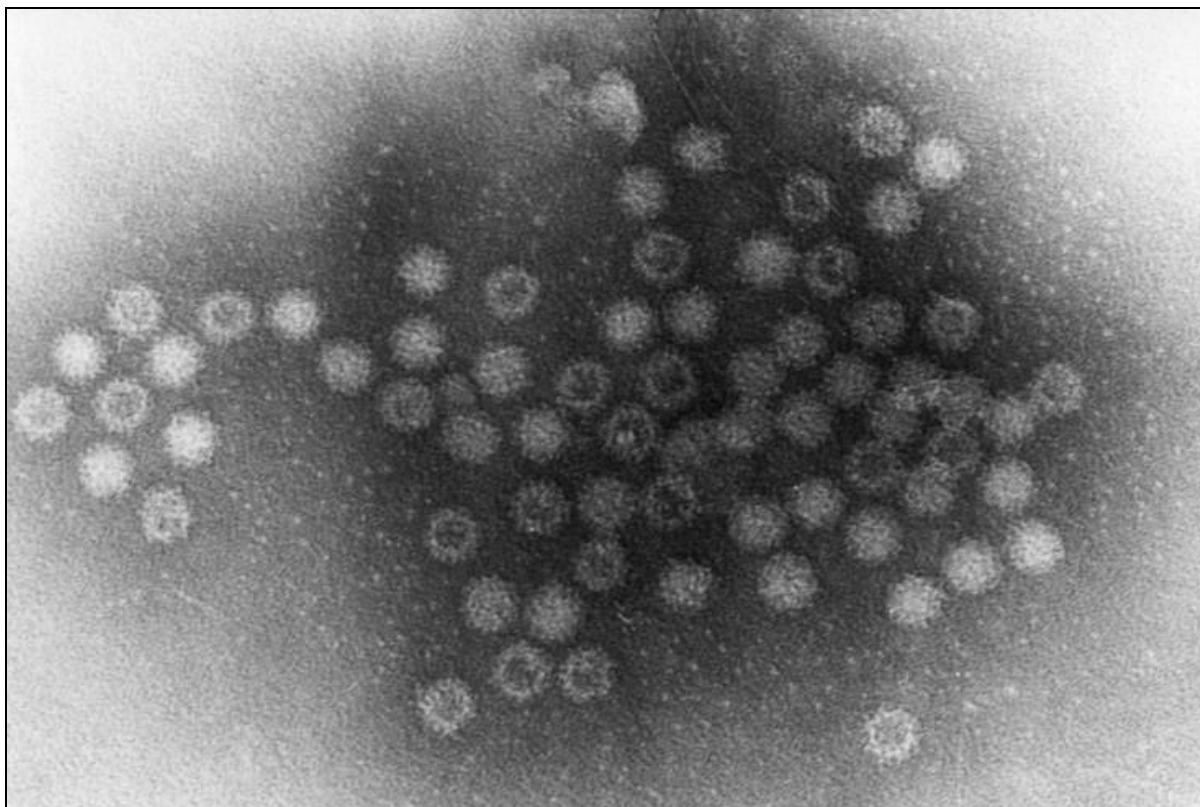


foto: autorka

Obrázek 13: Caliciviry v TEM

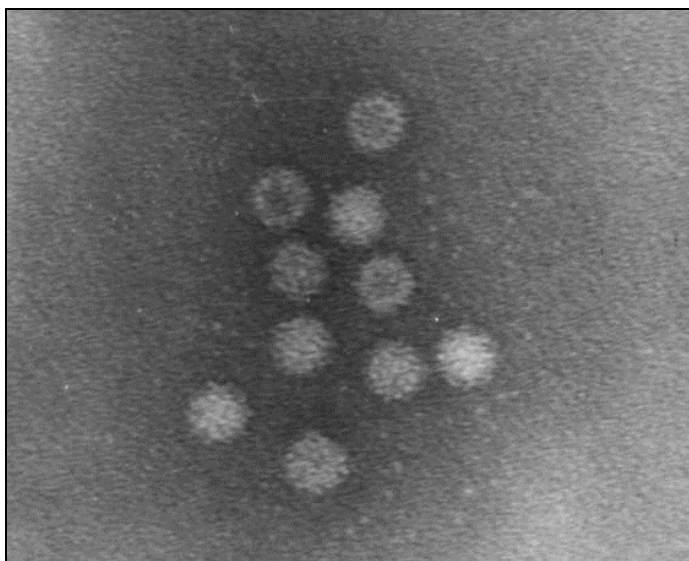


foto: autorka

1.4.3. Adenoviry

Adenoviry (čeleď *Adenoviridae*) - je známo 51 sérotypů rozdělených do 6 podskupin (A-F), kdy s AGE bývají nejvíce spojovány sérotypy 40 a 41. Adenoviry patří mezi DNA viry, jejich genom obsahuje dvojvláknovou DNA, jsou neobalené a měří v průměru 70-90 nm. Adenoviry mají vzhled pravidelného dvacetistěnu s vrcholovými pentony (*Ambrožová H., 2006a; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Mandell GL et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003*).

Adenoviry (obrázek 14-17) se vyskytují zejména u malých dětí, k jejich přenosu dochází fekálně-orální cestou. Onemocnění se objevuje během celého roku, bez typické sezónnosti (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007*). Adenoviry postihují tenké střevo a vedou k tvorbě ložisek slizničních nekrot (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Mandell GL et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003*). Onemocnění připomíná lehčí rotavirovou AGE s horečkou, zvracením a vodnatými stolicemi (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007*).

Obrázek 14: Kolonie adenovirů v TEM – celé viriony a rozpadající se adenoviry (šipka)

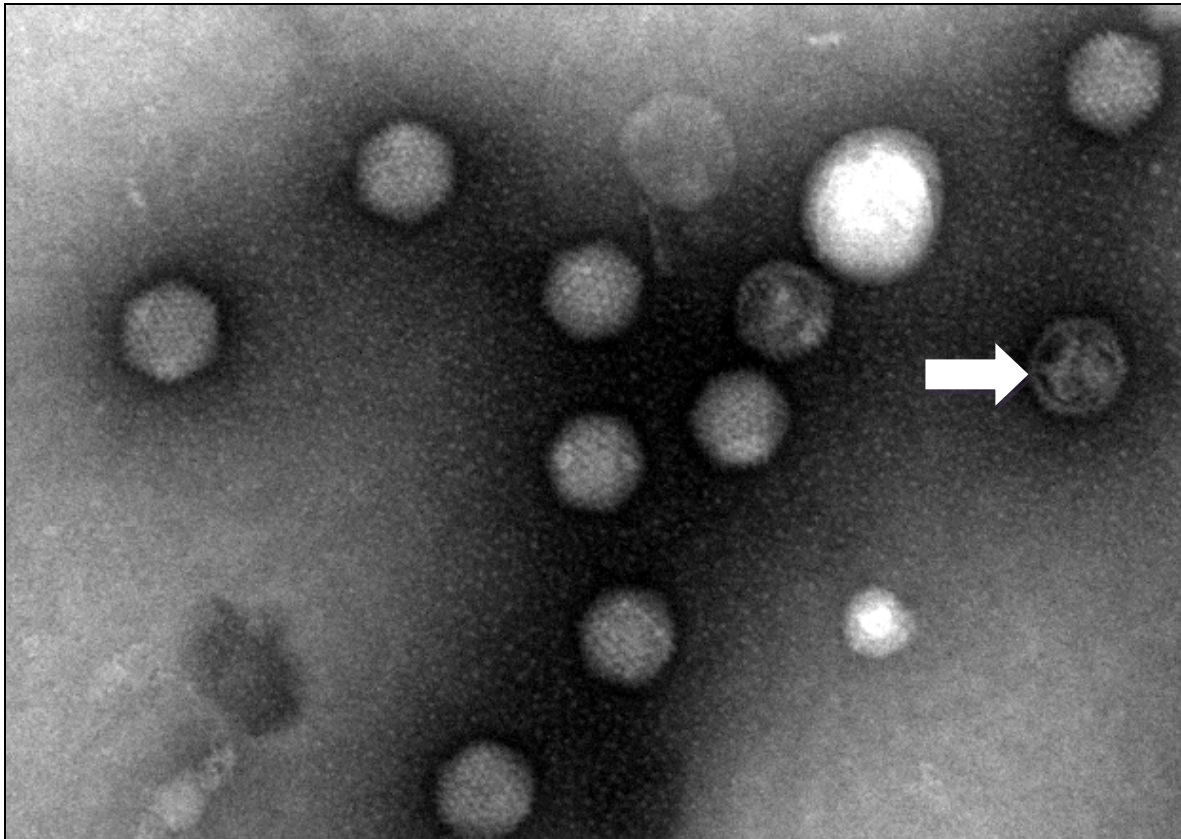


foto: autorka

Obrázek 15, 16: Detail struktury adenovirů v TEM a rozpadající se adenoviry (šipka)

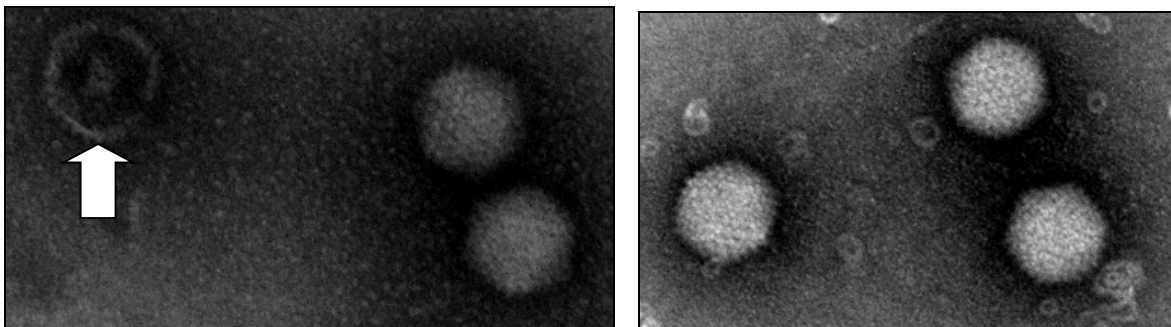


foto: autorka

Obrázek 17: Kolonie adenovirů v TEM – celé viriony a rozpadající se adenoviry (šipka)

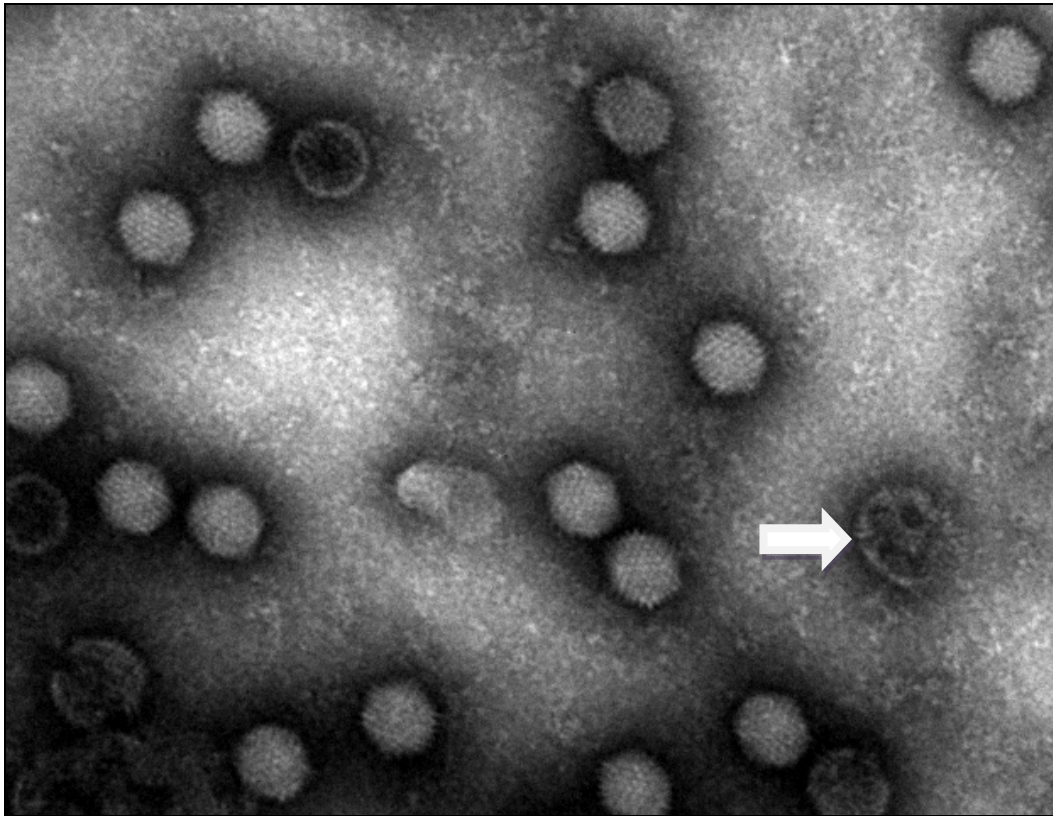


foto: autorka

1.4.4. Astroviry

Astroviry (čeleď *Astroviridae*) - jejich název je odvozen z řeckého *astron* - hvězda dle typického vzhledu pěti - či šesticípé hvězdy viditelné v EM. Virion (28-30 nm) je neobalený a obsahuje jednořetězcovou RNA. Je známo celkem 8 sérotypů (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Jeong HS. et al., 2012; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003*).

Astroviry (obrázek 18 a 19) se nejčastěji vyskytují u dětí do dvou let, k přenosu dochází fekálně-orální cestou (Jeong HS. et al., 2012). U astrovirů je popisován typický sezónní výskyt. V zemích mírného pásma je nejvyšší výskyt v zimních měsících (Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007).

Patogeneze astrovirových infekcí ještě není úplně objasněna (Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003). V klinickém obraze dominuje nauzea, vodnatý průjem a mírně zvýšená teplota. K dehydrataci dochází vzácně (Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007).

Obrázek 18, 19: Komplexy astrovirů v TEM

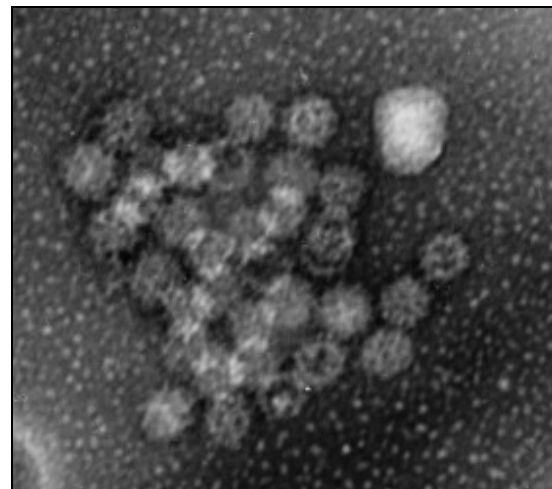
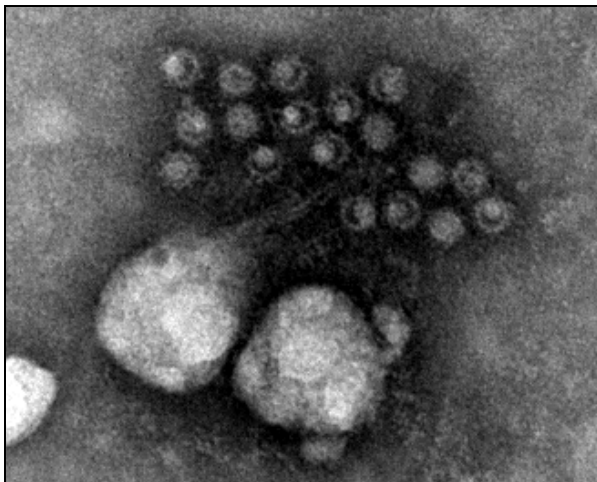


foto: autorka

1.4.5. Koronaviry

Koronaviry (čeleď *Coronaviridae*) - jsou nejčastější a nejvýznamnější ze skupiny pravděpodobných původců VGE. Koronaviry (obrázek 20 a 21) jsou pleomorfní viry (v průměru měří 100-150 nm) s helikoidální symetrií, patřící mezi RNA viry. Jako jediné mají na svém povrchu lipidový obal. Název získaly dle své typické morfologie, kdy na svém povrchu mají výběžky, které se distálně kyjovitě rozšiřují a tvoří korunu (*Ambrožová H., 2006a; Bednář M., 2009; Desselberger U. and Gray J., 2004; Mandell GL. et al., 2005; Murray PR. et al., 2009; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Votava M. et al., 2003; Wilhelmi I. et al., 2003*).

K přenosu koronavirů dochází fekálně-orální cestou. Jimi vyvolané infekce postihují především novorozence a kojence do jednoho roku. Tyto viry nemají typický sezónní výskyt (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007*).

Onemocnění probíhá obvykle pod obrazem hemorrhagické enterokolitidy s horečkou, bolestmi břicha a průjmem s příměsí hlenu a krve. Koronaviry byly opakovaně izolovány i od novorozenců s nekrotizující enterokolitidou (*Ambrožová H., 2006a; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007*).

Obrázek 20: Koronaviry v TEM – typická struktura koronaviřů (šipka)

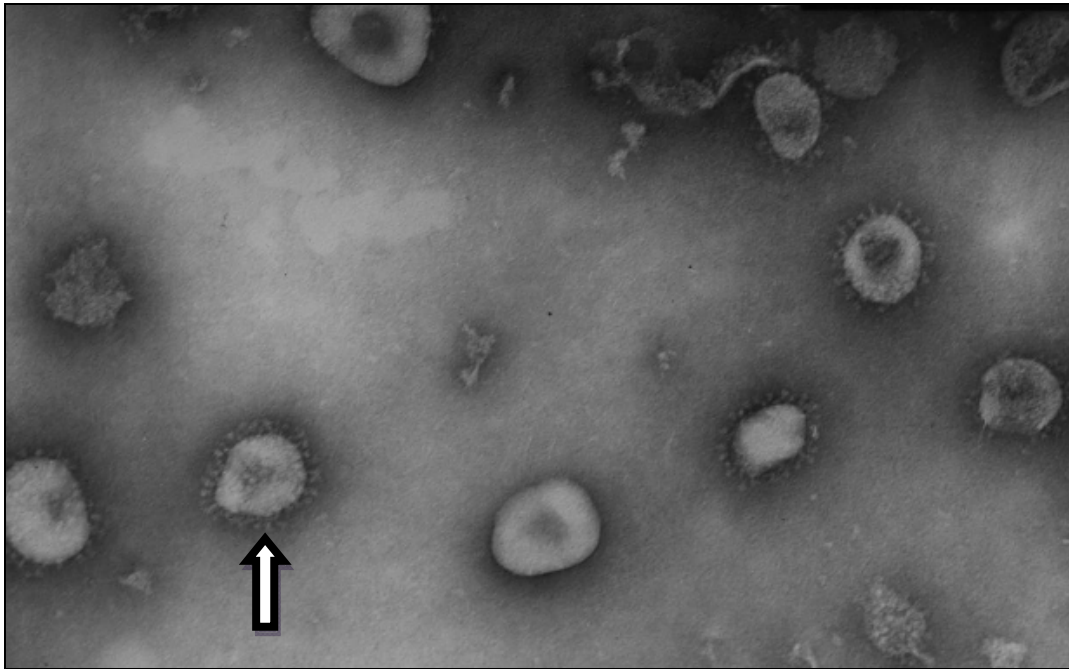


foto: autorka

Obrázek 21: Duální VGE v EM – adenoviry (bílá šipka) a koronaviry (pruhovaná šipka)

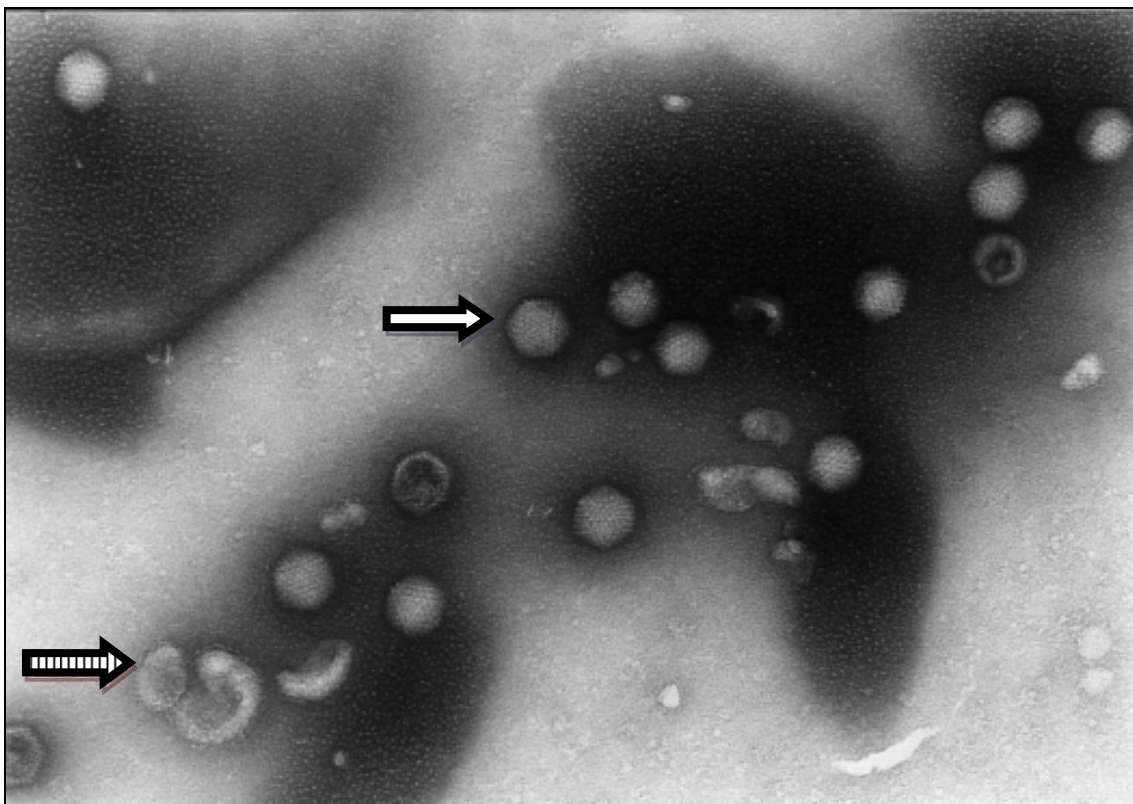


foto: autorka

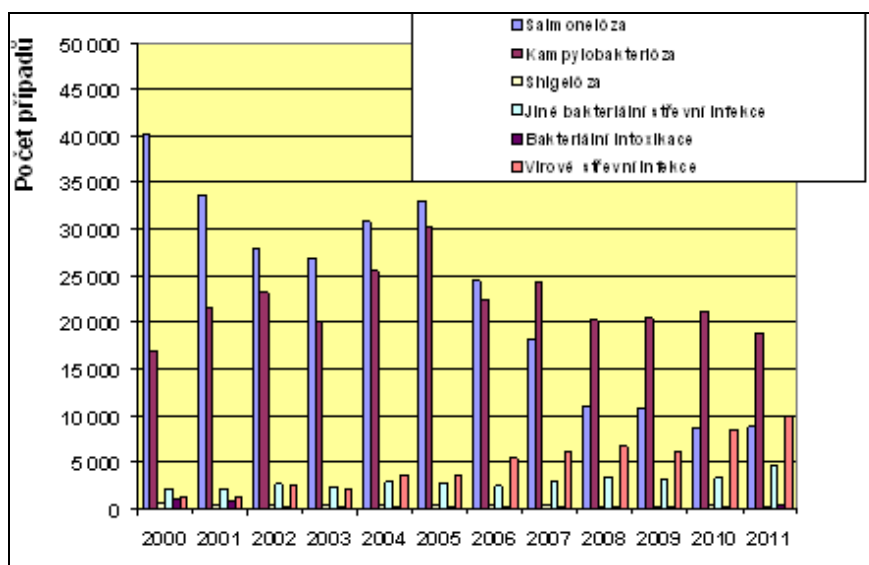
1.5. Diagnostika

V České republice je pro diagnostiku VGE rutinně používána jen metoda LAG. Další metody jako ELISA a imunochromatografické metody (ICH) jsou dostupné pouze v některých laboratořích. Jako zlatý standart pro průkaz rotavirů ve stolici je uváděna metoda přímé EM. EM není dostupná rutinně, ale pro svoji rychlost a neselektivnost zůstává nepostradatelnou zejména v diagnostice etiologických agens při epidemiích AGE, v epidemiologických studiích apod.

Ve světě se běžně používají metody jako PCR (polymerázová řetězová reakce) nebo multiplex – PCR sloužící k simultánní detekci pěti virů vyvolávajících AGE (rotaviry, adenoviry, astroviry, noroviry a sapoviry); (*Li CSY. et al., 2009*). Tyto metody u nás nejsou zatím dostupné. Sérologické metody jsou využívány zejména při zjišťování prevalence infekce v populaci, pro klinickou diagnostiku nemají význam (*Pazdiora P. a Táborská J., 2004*).

Trendy výskytu střevních infekcí v ČR v letech 2000-2011 jsou dobře patrné na obrázku z databáze EPIDAT (Informační systém hygienické služby ČR); (obrázek 22).

Obrázek 22: EPIDAT - trendy výskytu střevních infekcí v ČR v letech 2000-2011



1.6. Terapie

Terapie VGE je symptomatická a neliší se u jednotlivých virových infekcí. Je založena na správné, včasné a dostatečné rehydrataci a následné rychlé realimentaci vhodnými dietními potravinami.

Děti s lehkým a středně těžkým stupněm dehydratace, které nezvrací, lze rehydratovat perorálně. U kojenců a batolat do dvou let se osvědčuje i rehydratace nazogastrickou sondou (NGS). Intravenózní rehydratace krystaloidy je nezbytná u těžkých dehydratací se ztrátou tělesné hmotnosti nad 10 %, u hypertonické dehydratace a při profuzním zvracení (Ambrožová H. 2006b; Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Goldemund K., 2001; Sýkora J. a Huml M., 2008; Táborská J. a Pazdiora P., 2005).

U malých dětí s horečkou je nezbytné podávání antipyretik z důvodu prevence febrilních křečí. Z nescifických protiprůjmových prostředků jsou u VGE vhodná adsorbencia (diosmectitum, aktivní uhlí) a probiotika (*Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii siccatus* aj.); (Ambrožová H. 2006b; Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Goldemund K., 2001; Sýkora J. a Huml M., 2008; Táborská J. a Pazdiora P., 2005).

1.7. Prevence

Prevence VGE byla původně zaměřena jen na snahu o omezení přenosu a šíření infekce. První očkovací látkou proti rotavirovým AGE, která byla uvedena na trh v roce 1998, byla tetravalentní živá vakcína RotaShield™. Po zahájení plošného očkování v USA, bylo však nahlášeno několik případů intususcepce u očkovaných dětí, proto byla vakcína v roce 1999 stažena z trhu (Desai SN. and Vázques M., 2010; Pazdiora P. a Táborská J., 2010).

Nová možnost aktivní imunizace proti rotavirům se objevila v roce 2006, kdy byly schváleny pro použití v EU dvě vakcíny - RotaTeq™ a Rotarix™ (v ČR v roce 2007). Jedná se o živé atenuované vakcíny, které jsou bezpečné, dobře tolerované, účinné a snadno se aplikují.

Rotarix™ je monovalentní vakcína připravená z lidského rotaviru, která působí proti rotavirovým sérotypům G1-G4 a G9. Podává se ve dvou dávkách. V prvním roce po vakcinaci je udávána 95% účinnost proti jakékoliv i závažné rotavirové infekci (Souhrn SPC Rotarix, 2008).

RotaTeq™ je pentavalentní vakcína, připravená z reassortantního kmene (bovinní/lidský) s účinností proti všem pět nejběžnějších sérotypů rotavirů G1-G4 a G9. Podává se ve třech dávkách s účinností 98 % proti těžké a 74 % proti jakékoli rotavirové

infekci (*Souhrn SPC RotaTeq, 2009*). Po podání těchto vakcín nebyly zjištěny žádné závažné vedlejší účinky (*Souhrn SPC Rotarix, 2008; Souhrn SPC RotaTeq, 2009*).

V některých zemích již existuje plošné očkování proti rotavirům (např. Rakousko, Belgie, Lucembursko, Finsko, Polsko) a zdá se, že i při krátkém odstupu od zavedení vakcinace, dochází k výraznému poklesu počtu hospitalizací a k snížení celkové nemocnosti na AGE (*Curns AT. et al., 2010; Madhi SA. et al., 2010*). U nás zatím širší použití není zavedeno, i když je v posledních letech, zvláště po zrušení očkování proti tuberkulóze diskutováno (*National respiratory and enteric virus surveillance system, 2009; Pazdiora P. a Táborská J., 2010; Prokeš M. et al., 2012*). I přesto, že si rodiče musí pro své děti vakcínu proti rotavirům hradit sami, stoupá v ČR proočkovanost. Na konci roku 2009 se proočkovanost nově narozených dětí pohybovala kolem 0,7 %, kdežto na konci roku 2011 to bylo již 18 % (*Pazdiora P. a Táborská J., 2010*). Vakcinace proti ostatním původcům AGE není zatím možná (*Ambrožová H. 2006b; Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Ambrožová H. a Schramlová J., 2007; Pazdiora P., 2007a ; Táborská J. a Pazdiora P., 2005*).

2. Elektronová mikroskopie

2.1. Úvod, definice

TEM je stejně jako světelný mikroskop optický přístroj, ve kterém jsou však fotony nahrazeny elektrony a skleněné čočky elektromagnetickými čočkami. TEM tak vytváří obraz vzorku pomocí proudu elektronů, které mají kratší vlnovou délku než viditelné světlo. Vlnová délka elektronů závisí na urychlovacím napětí mikroskopu. U komerčně vyráběných TEM se používá urychlovací napětí od 100 do 400 kV. Vlnová délka elektronů je pak $3,7 \times 10^3$ nm pro 100 kV a $1,6 \times 10^3$ nm pro 400 kV; vlnová délka viditelného světla je 400-750 nm. Rozlišovací schopnost současných špičkových přístrojů je 0,12-0,17 nm (*Dufková M., 3pol.cz; web.natur.cuni.cz*).

TEM (obrázek 23 a 24) je dnes většinou odborníků považován za jeden z nejužitečnějších vědeckých přístrojů vynalezených ve dvacátém století. Elektronové mikroskopy patří mezi nejvšestrannější přístroje pro pohled do mikrosvěta. Ve virologii je EM jednou z nejdůležitějších metod zkoumání. Tato metoda je schopná detekovat viry v nejrůznějším klinickém materiálu, jako jsou krusty, vezikulární tekutina, bioptické vzorky tkání, stolice, vzorky moči, cerebrospinální mok, plazma a jiné (*Biel S. and Gelderblom HR., 1999; Schramlová J. et al., 2010*). EM umožňuje detekci všech infekčních agens přítomných ve vyšetřovaném materiálu i současné infekci několika mikroorganismy (*Curry A., 2003; Hazelton PR. a Gelderblom HR., 2003; Schramlová J. et al., 2010*). Metoda rovněž umožňuje detekci nejen kompletních virových částic, ale taktéž často nekompletních virů, kdy prázdné kapsidy jsou přítomny ve 30-40 % buněk po replikaci viru (*Schramlová J. et al., 2010*).

Obrázek 23: Elektronový mikroskop v SZÚ využitý při této studii

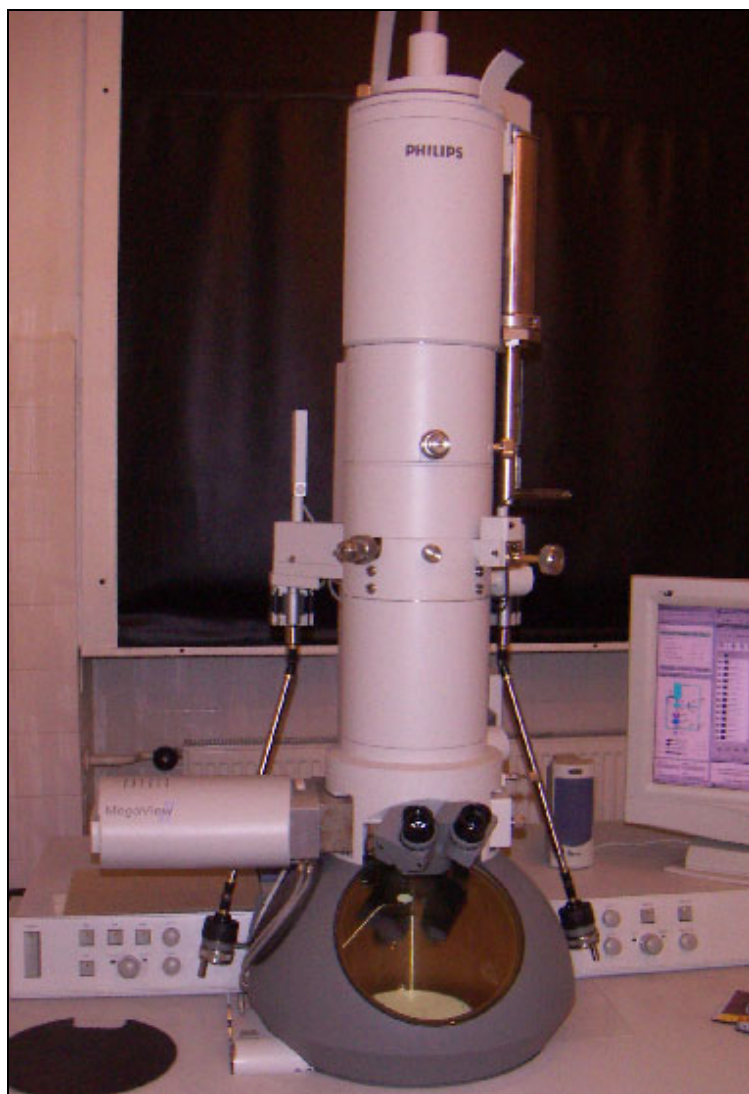


foto: autorka

Obrázek 24: Elektronmikroskopické síťky

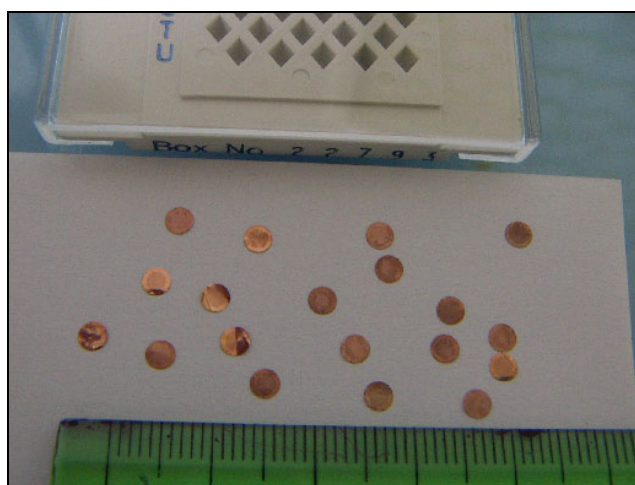


foto: autorka

2.2. Historie

Elektronový mikroskop byl objeven v roce 1931 v Německu fyziky Ernstem Ruskou a Maxem Knollem (*Knoll M. and Ruska E., 1932; Kruger DH. et al., 2000*). V roce 1938 byl pomocí EM jako první z virů objeven "the mouse ectromelia virus" patřící do čeledi *Orthopoxviridae*. Potenciál této metody byl rozpoznán lékařem Helmutem Ruskou, který na začátku čtyřicátých let 20. století publikoval asi 20 prací o submikroskopických strukturách bakterií, parazitů a virů. Stal se zakladatelem taxonomie virů. Jeho bratr Ernst Ruska získal za objev elektronového mikroskopu v roce 1986 Nobelovu cenu (*Kruger DH. et al., 2000*).

Na začátku šedesátých let 20. století se elektronová mikroskopie stala široce využívanou metodou v diagnostice virů zejména díky vývoji techniky negativního barvení (*Brenner S. and Horne RW., 1959; Harris JR., 1997; Hayat MA. and Miler SS., 1990; Knoll M. and Ruska E., 1932; Kruger DH. et al., 2000*). Během sedmdesátých a osmdesátých let 20. století bylo díky EM objeveno mnoho klinicky významných infekčních agens, jako jsou adenoviry, enteroviry, orthomyxoviry, paramyxoviry a reoviry (*Biel S. and Gelderblom HR., 1999*).

3. Cíle práce

Cílem práce bylo prokázat rozhodující podíl VGE v etiologii průjmových onemocnění u dětí do pěti let v České republice a také poukázat na důležitost EM v jejich diagnostice. Dále jsme se snažili zjistit, jaká je závislost virových AGE na věku, sezónnosti a klinickém průběhu. Současně jsme porovnávali možnosti diagnostiky VGE se zaměřením na srovnání LAG a EM u rotavirových a adenovirových AGE.

Hlavními cíli bylo zjistit:

- etiologii AGE u dětí do pěti let věku
- podíl virů na etiologii AGE u dětí do pěti let věku
- jednotlivé zastoupení virů jako původců VGE
- věkové rozložení dětí s VGE
- srovnání metod LAG a EM v diagnostice VGE
- sezónnost jednotlivých virů vyvolávající VGE
- srovnání období výskytu jednotlivých virů v různých obdobích roku
- důležitost EM v diagnostice VGE

4. Materiál a metody

4.1. Studovaná skupina

Do prospektivní studie bylo zařazeno 1059 dětí od jednoho měsíce do pěti let s AGE přijatých na 1. Infekční kliniku 2. LF UK a NNB v Praze od 1. září 2006 do 30. června 2009.

U všech zařazených dětí byla provedena bakteriologická a virologická vyšetření stolice. Metody jsou následně uvedeny. Stolice vyšetřované EM zpracovávala autorka sama ve spolupráci se SZÚ.

4.2. Bakteriologické vyšetření stolice

Stolice od všech dětí byly vyšetřeny pomocí standardní kultivace na Oddělení klinické mikrobiologie NNB. Jako kultivační media byly použity standardní pevné a tekuté kultivační půdy. Stolice byly kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C v termostatu. Pouze selektivní půdy pro detekci kampylobakterů byly kultivovány při teplotě 42 °C po 48 hodin. U všech dětí byla stolice taktéž vyšetřována na přítomnost patogenních kmenů *E. coli*. Vyšetření kombinuje vlastní kultivační vyšetření s LAG. Pouze v indikovaných případech bylo provedeno vyšetření na průkaz *Clostridium difficile* ve stolici a taktéž parazitologické vyšetření stolice.

4.3. Latexová aglutinace

Vyšetření bylo prováděno na Virologickém oddělení Zdravotního ústavu se sídlem v Praze. Byly použity komerční aglutinační testy na detekci rotavirů a adenovirů - Rotalex™

a Adenolex™ (Orion Diagnostica, ČR). Rotalex/Adenolex™ reagentie obsahují zkušební latex pokrytý rotavirovým/adenovirovým antisérem, kontrolní latex pokrytý preimunním sérem, pozitivní kontrolu a pufr. Supernatant 20% roztoku stolice byl dále zředěn 1:2 s Rotalex/Adenolex™ pufrem, aby vznikl finální 10% roztok. Poté se smíchala kapka (asi 50 µl) supernatantu s kapkou zkušební latexu na destičce a reakce (vývoj precipitace) byla odečtena po dvou minutách. Test byl považován za pozitivní, když byla zřetelně pozorována aglutinace s testovaným vzorkem a ne s kontrolním latexem. Pokud byla pozorována aglutinace ve směsi obsahující kontrolní latex, test byl považován za neinterpretovatelný.

4.4. Elektronová mikroskopie

Všechna vyšetření byla prováděna v Národní referenční laboratoři pro elektronovou mikroskopii (NRL/ELM), ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ) v Praze.

Ze stolic byla připravována 10% suspenze v destilované vodě. Po následné centrifugaci (1000 otáček, 5 min.) byly odstraněny fragmenty buněk a bakterií. Viry byly adsorbovány na elektronmikroskopické sítě (400 mesh), potažené pouhlikovanou formvarovou (1% polyvinyl formal) folií. Na každou virovou suspenzi byly použity dvě sítě, které byly obarveny negativním barvením. Na jednu z nich byl použit 2% molybdenan amonný a na druhou 2% vodný uranyl acetát. Materiál byl zpracováván v boxu s laminárním prouděním a byly dodržovány bezpečnostní předpisy. Sítě byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem Morgagni 268D Philips při 100000 x zvětšení.

4.5. Statistické metody

Analýza rozdílů mezi sledovanými parametry (věk, délka hospitalizace, typ dehydratace, způsob rehydratace) byla provedena testem ANOVA (analýza rozptylu) s hladinou významnosti $\alpha < 0,05$. Byla použita jednocestná analýza rozptylu (Kruskal-Wallis test). Při zjištění statistické významnosti byly parametry porovnány Dunnovou metodou. Pro statistickou analýzu byl použit software SigmaStat[®] 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Výsledky jsou uvedeny jako absolutní hodnota i průměr \pm standardní chyba nebo jako medián.

5. Výsledky

Z 1059 hospitalizovaných dětí bylo 526 dívek a 533 chlapců. Průměrný věk hospitalizovaných dětí byl 1,9 roku (medián 1,6 let). Průměrná délka hospitalizace byla 5,2 dne (medián 5 dní). Nejvíce postiženou věkovou skupinou byly děti do dvou let, které tvořily 59 % (n=1059) ze všech dětí přijatých pro AGE.

Věkové rozložení a délka hospitalizace u dětí s VGE jsou shrnuty v tabulce (tabulka 1) a věkové rozložení hospitalizovaných dětí taktéž v grafu (graf 1).

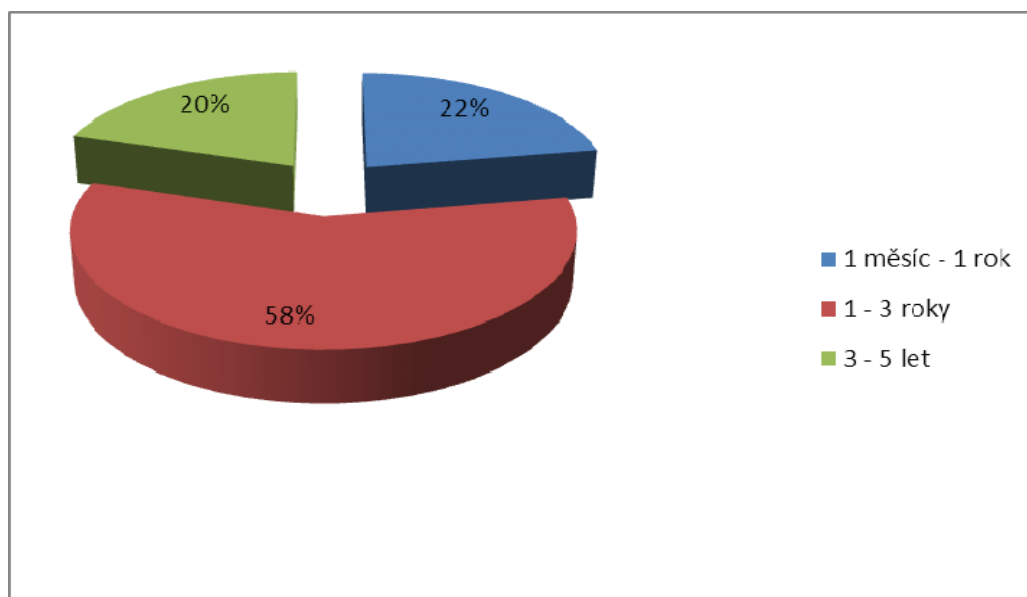
Tabulka 1: Věkové rozložení a průměrná délka hospitalizace dětí do pěti let věku s VGE

věk	celkem dětí	%	DH – medián (dny)	DH - 25. percentil (dny)	DH - 75. percentil (dny)
1 měsíc - 1 rok	181	22,3	5	3	7
1 - 3 roky	466	57,6	5	3	6
3 - 5 let	163	20,1	5	3	6
	810		p = 0,298		

Legenda: DH – délka hospitalizace

Při srovnání věku dětí s délkou hospitalizace se hladiny blíží statistické významnosti.

Graf 1: Věkové rozložení dětí s VGE



Nejčastější diagnózou při příjmu byla AGE u 893 dětí (84,3 %), dále akutní enteritida u 90 dětí (8,5 %) a akutní hemoragická enterokolitida u 42 dětí (4 %). Akutní hemoragická gastroenterokolitida byla méně častá - jen u 24 dětí (2,3 %) a u 10 dětí (0,9 %) se vyskytlo pouze zvracení bez průjmu. Febrilie, respektive subfebrilie, byly přítomny u 642 dětí (60,6 %), 853 dětí (80,5 %) jevílo při příjmu známky dehydratace. Z těchto dětí 46 (5,5 %) mělo hyponatremickou dehydrataci a 31 dětí (3,6 %) závažnější hypernatremickou dehydrataci. U 833 dětí (78,7 %) bylo nezbytné zahájení parenterální rehydratace. V laboratorním nálezu byla zjištěna u 629 dětí (59,4 %) elevace jaterních transamináz.

Přehled dětí hospitalizovaných pro VGE s dehydratací je uveden v tabulkách (tabulka 2a-2c).

Tabulka 2a: Hospitalizované děti s VGE s dehydratací

n = 810 dětí	dehydratace	%	↑Na	%	↓ Na	%	izo Na	%
1 měsíc - 1 rok	124 (n=181)	69	13	1	0	0	111	89
1 - 3 roky	395 (n=466)	85	11	3	19	5	365	92
3 - 5 let	145 (n=163)	89	1	0,7	7	4,8	137	94,5

Legenda: ↑Na – hypernatremická dehydratace; ↓ Na – hyponatremická dehydratace; izo Na – izonatremická dehydratace

Tabulka 2b: Hospitalizované děti s VGE s dehydratací – porovnání typu dehydratace k věku dítěte

typ dehydratace	celkem	%	věk – medián (roky)	věk - 25. percentil (roky)	věk - 75. percentil (roky)
hyponatremická	26	3,9	1,9	1,38	3
hypernatremická	25	3,8	0,9	0,4	1,3
izonatremická	613	92,3	1,7	1,1	2,8
	664		p < 0,001		

Z tabulky 2b vyplývá signifikantní rozdíl mezi typem dehydratace a věkem dítěte ($p < 0,001$). Při porovnání jednotlivých typů dehydratace Dunnovou metodou (hyponatremická x hypernatremická; hyponatremická x izonatremická; izonatremická x hypernatremická) byl taktéž zjištěn signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

Tabulka 2c: Hospitalizované děti s VGE s dehydratací – porovnání typu dehydratace k délce hospitalizace

typ dehydratace	celkem	%	DH – medián (dny)	DH - 25. percentil (dny)	DH - 75. percentil (dny)
hyponatremická	26	3,9	4	3	6
hypernatremická	25	3,8	7	6	8
izonatremická	613	92,3	5	3	6
	664		p < 0,001		

Legenda: DH – délka hospitalizace

Z tabulky 2c vyplývá signifikantní rozdíl mezi typem dehydratace a délkou hospitalizace dítěte ($p < 0,001$). Při porovnání jednotlivých typů dehydratace Dunnovou metodou (hyponatremická x hypernatremická; izonatremická x hypernatremická) byl taktéž zjištěn signifikantní rozdíl ($p < 0,05$). Při srovnávání izotonické dehydratace a hypotonické dehydratace signifikantní rozdíl zjištěn nebyl.

Přehled dětí hospitalizovaných pro VGE a způsob jejich rehydratace je uveden v tabulce (tabulka 3a,b).

Tabulka 3a: Hospitalizované děti s VGE – porovnání způsobu rehydratace a věku dětí

typ rehydratace	celkem	%	věk – medián (roky)	věk - 25. percentil (roky)	věk - 75. percentil (roky)
perorální	160	19,8	1	0,7	1,7
intravenózní	572	70,6	1,9	1,3	3
NGS	78	9,6	0,9	0,7	1,2
	810		p < 0,001		

Legenda: NGS – nazogastrická sonda

Z tabulky 3a vyplývá signifikantní rozdíl mezi způsobem rehydratace a věkem dítěte ($p < 0,001$). Při porovnání jednotlivých typů rehydratace Dunnovou metodou (intravenózní x NGS; intravenózní x perorální; perorální x NGS) byl taktéž zjištěn signifikantní rozdíl ($p < 0,05$).

Tabulka 3b: Hospitalizované děti s VGE – porovnání způsobu rehydratace a délkou hospitalizace

typ rehydratace	celkem	%	DH – medián (dny)	DH - 25. percentil (dny)	DH - 75. percentil (dny)
perorální	160	19,8	4	3	6
intravenózní	572	70,6	5	4	6
NGS	78	9,6	5	4	6
	810		p =0,118		

Legenda: NGS – nazogastrická sonda; DH – délka hospitalizace

Při srovnání typu rehydratace s délkou hospitalizace se hladiny blíží statistické významnosti.

5.1. Etiologie AGE

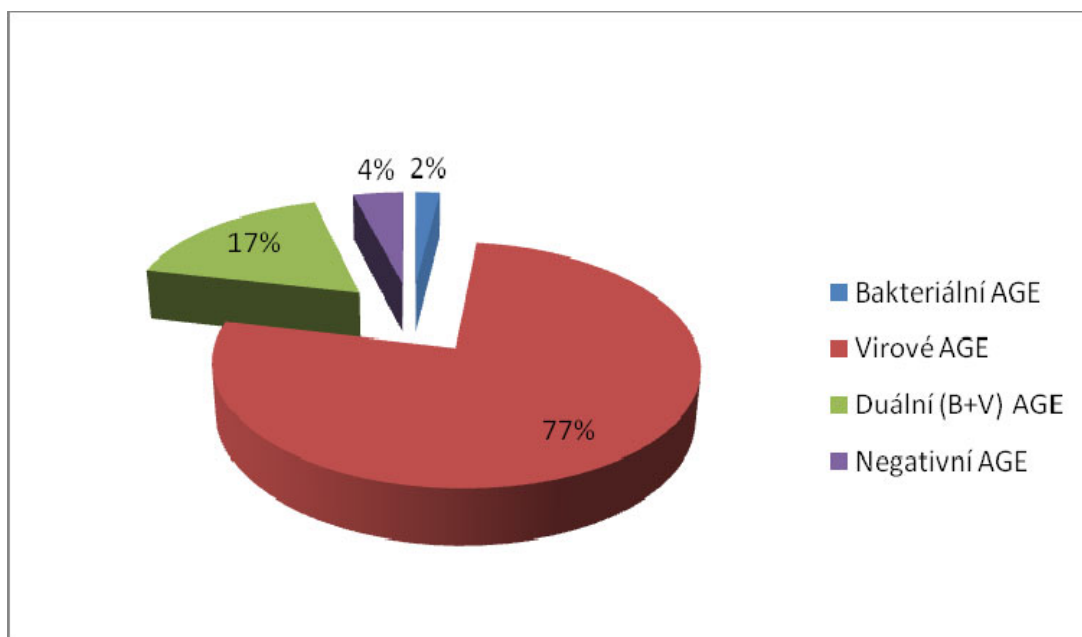
Původce nemoci se podařilo prokázat na základě uvedených metod u 1051 dětí (95,9 %). Bakteriální infekce byla zjištěna u 205 dětí, ale 183 z nich mělo ve stolici kromě bakterií i viry. Čistě bakteriálních AGE bylo pouze 22. U 18 dětí byla ve stolici detekována *S. enteritidis*, u 3 dětí *C. jejuni* a v jednom případě byla vykultivována enteropatogenní *E. coli* (EPEC O127). Duální infekce bakterií a virem byla zjištěna u 183 dětí, kdy nejčastější byla kombinace rotavirů se *S. enteritidis* a dále rotavirů s enterotoxigenní *E. coli* (ETEC O25). Výsledky dětí s pozitivním kultivačním vyšetřením stolice jsou shrnuty v tabulce (tabulka 4). U 993 dětí byly ve stolici přítomny viry, ale u 183 z nich byly ve stolici vykultivovány též bakterie. Čistě virových průjemových onemocnění, které byly dále hodnoceny, bylo 810; (graf 2).

Tabulka 4: Výsledky dětí s pozitivním kultivačním vyšetřením stolice

n = 205 dětí	počet	%
<i>Salmonella sp.</i>	85	41,5
<i>Campylobacter jejuni</i>	44	21,5
ETEC	30	14,6
EPEC	24	11,7
EHEC	6	2,9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	2,4
<i>Clostridium difficile</i>	2	1
více bakterií	9	4,4

Legenda: ETEC – enterotoxigenní *E. coli*; EPEC - enteropatogenní *E. coli*; EHEC - enterohemoragická *E. coli*

Graf 2: Etiologie AGE u dětí do pěti let



Legenda: AGE – akutní gastroenteritida; duální B+V – duální infekce způsobená bakterií a virem

Bylo hodnoceno 810 dětí s VGE. Nejčastěji detekovanými viry byly rotaviry - u 535 dětí, dále caliciviry ve 43 případech, koronaviry vyvolaly taktéž 43 AGE, adenoviry 20 a astroviry 19 AGE. Velkou skupinu tvořily virové infekce (150 případů), kdy byly přítomny dva a více virů (tabulka 5). Nejčastěji se vyskytovaly rotaviry spolu s koronaviry (54 případů), dále rotaviry s caliciviry (34 případů) a rotaviry s astroviry (20 případů). V sedmi případech byly dokonce ve stolici přítomny najednou viry tři, nejčastěji rotaviry s caliciviry a koronaviry.

Tabulka 5: Etiologická agens VGE

původce	n	%
rotaviry	535	66,1
caliciviry	43	5,3
koronaviry	43	5,3
adenoviry	20	2,5
astroviry	19	2,3
více virů	150	18,5
	810	

5.2. Výsledky jednotlivých metod EM a LAG

Pomocí LAG se podařilo prokázat rotaviry ve 445 případech a adenoviry ve 22 případech. Celkem 56 % vzorků vyšetřených touto metodou bylo negativních.

Pomocí EM byly zachyceny rotaviry v 623 případech, adenoviry ve 26 případech, caliciviry byly nalezeny v 61 případech, koronaviry v 57 a astroviry ve 26 případech. VGE kde byly zachyceny dva a více virů tvořily 19 % z celkového počtu případů. Nejčastěji byly detekovány rotaviry spolu s koronaviry, následovaly rotaviry s caliciviry a rotaviry s astroviry. Žádný virus nebyl nalezen jen u 6 % případů (tabulka 6).

Tabulka 6: Výsledky výskytu virů jednotlivými metodami

původce	metody	počet případů	%
	LAG		
rotaviry		445	42
adenoviry		22	2
negativní		592	56
	EM		
rotaviry		623	58,8
caliciviry		61	5,7
koronaviry		57	5,4
adenoviry		26	2,5
astroviry		26	2,5
více virů		200	18,9
negativní		66	6,2

Legenda: LAG – latexová aglutinace; EM – elektronová mikroskopie

5.3. Srovnání EM a LAG

Srovnání metod bylo provedeno ve skupině čistě virových AGE, vyvolaných pouze jedním původcem. Vzhledem k dostupné diagnostice LAG (rotaviry a adenoviry)

byly porovnány jen u rotavirů a adenovirů. Taktéž nebyly hodnoceny případy, kde byl v EM nález více virů (z nich je většina tvořena právě rotaviry spolu s jiným virem), ale není možné určit, který z těchto virů je vyvolávajícím agens AGE. Taktéž nebyly zahrnuty duální infekce bakterií a virem. Tyto podmínky splňovalo 660 dětí.

Celkem 535 dětí mělo **rotavirovou AGE**. U 350 dětí byly rotaviry ve stolici zjištěny oběma metodami, kdežto u 185 dětí byly rotaviry zjištěny jen EM, přičemž metodou LAG byly vzorky negativní. Ve stolicích s negativním nález v EM nebyly rotaviry nalezeny ani LAG. Senzitivita EM tak byla 100 % a LAG pouze 65,4 %.

Počet **adenovirových infekcí** byl podstatně nižší, celkem 20 dětí mělo adenovirovou AGE. U 12 dětí byla shoda obou metod, zatímco u 8 dětí byla stolice pozitivní jen EM. Podobně jako u rotavirových AGE kombinace pozitivního vzorku stolice LAG a negativního vzorku stolice EM nebyla zaznamenána. Senzitivita EM tedy byla opět 100 %, LAG pouze 60 %. Srovnání obou metod je uvedeno v tabulce (tabulka 7).

Tabulka 7: Srovnání metod LAG a EM v diagnostice rotavirových a adenovirových AGE

původce	metoda	počet případů	
		LAG +	LAG -
rotaviry	EM +	350	185
	EM -	0	0
adenoviry	EM +	12	8
	EM -	0	0

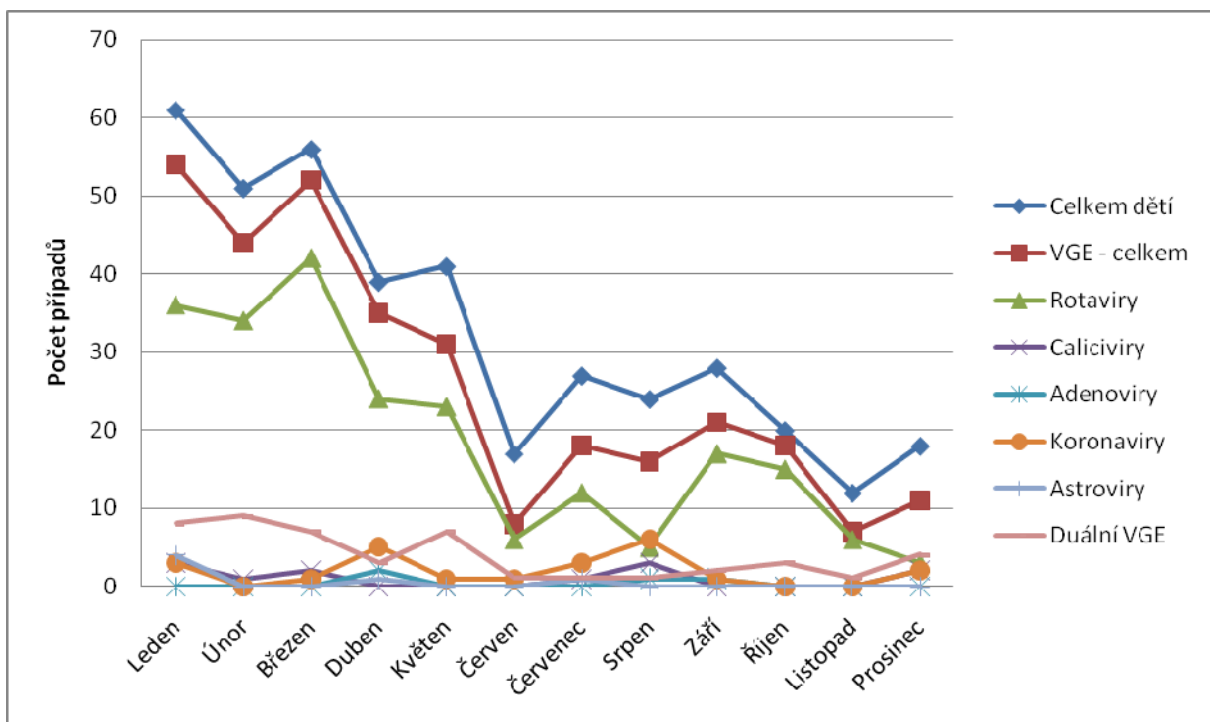
Legenda: LAG+ - latexová aglutinace pozitivní; LAG- – latexová aglutinace negativní; EM+ – elektronová mikroskopie pozitivní; EM- – elektronová mikroskopie negativní

5.4. Sezónnost virů vyvolávající VGE

Sezónnost jednotlivých virů je zachycena na grafu znázorňujícím výskyt virů v jednotlivých měsících roku 2008, který byl jako jediný zmapován kompletně (graf 3).

Sezónnost je nejlépe patrná u nejčastěji se vyskytujících virů – rotavirů, kde je vidět jasná převaha v zimních a jarních měsících. Tuto křivku přesně kopíruje křivka celkově přijatých dětí i těch s prokázanou virovou etiologií AGE. Sezónnost ostatních virů nelze dobře hodnotit, zejména pro nízký záchyt těchto virů v jednotlivých měsících roku 2008.

Graf 3: Sezónnost virů vyvolávajících AGE v roce 2008



Legenda: VGE-celkem – virové gastroenteritidy celemek; duální VGE – virové gastroenteritidy způsobené více viry

Nejvyšší výskyt rotavirových AGE byl zaznamenán v roce 2007 v dubnu, květnu a v prosinci; v roce 2008 v lednu, únoru a v březnu. Podílu rotavirové etiologie na celkovém počtu VGE v jednotlivých měsících byl v roce 2007 mezi 38,2 % až 92,9 % a v roce 2008 mezi 27,3 % až 85,7 %.

Nejvyšší výskyt calicivirových AGE byl v roce 2007 v lednu a únoru; v roce 2008 v lednu a srpnu. Podobný nález byl i u ostatních virů. Nejvíce astrovirových AGE bylo zjištěno v roce 2007 v lednu, únoru a v listopadu; v roce 2008 v lednu, dubnu a v červenci. Koronaviry měly vrchol sezónního výskytu v roce 2007 v lednu, únoru a v září; v roce 2008 v dubnu a srpnu. Nejvyšší výskyt smíšených virových infekcí (dva a více virů) byl v roce 2007 v lednu, únoru, listopadu a v prosinci; v roce 2008 v lednu až březnu a v květnu. Největší podíl tvořily vždy rotaviry spolu s viry z jiné čeledi. Nelze tedy říci, že VGE mají převahu vždy jen v zimních měsících.

5.5. Srovnání výskytu virů v jednotlivých obdobích

Tato období byla sledována pro největší podíl VGE právě v těchto měsících a taktéž pro nedostupnost EM v roce 2007 v červenci a v srpnu (tabulka 8).

Tabulka 8: Srovnání výskytu virů v jednotlivých obdobích

	celkem HD	celkem VGE	rotaviry	caliciviry	koronaviry	adenoviry	astroviry	více virů
období 01 - 06								
2007	201	161	107	18	4	5	3	24
2008	265	224	165	6	11	2	5	35
2009	227	190	125	1	14	1	5	44
období 09 - 12								
2006	103	44	22	7	1	5	4	5
2007	134	100	58	5	3	3	1	30
2008	68	57	41	2	3	1	0	10

Legenda: celkem VGE – celkem virových gastroenteritid; celkem HD – celkem hospitalizovaných dětí

Období leden - červen 2007-2009:

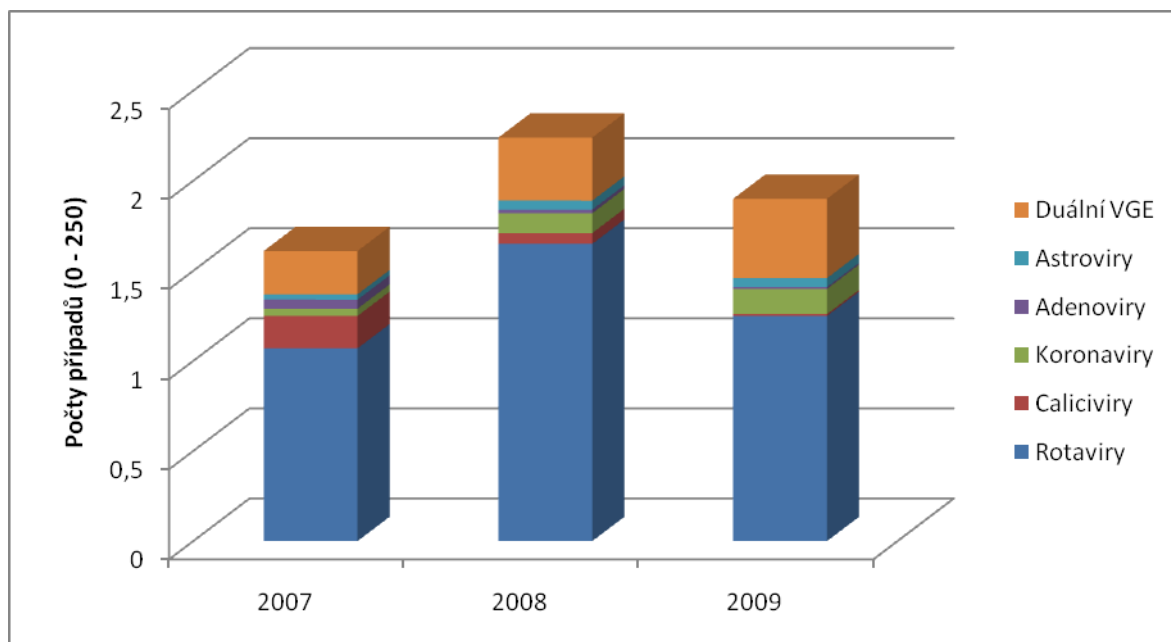
1) **Období leden-červen 2007:** 80,1 % dětí mělo VGE. Rotaviry měly zřetelnou převahu, byly prokázány u 66,5 % VGE. Caliciviry byly prokázány u 11,2 %, adenoviry u 3,1 %, astroviry u 1,8 % a koronaviry u 2,5 % VGE. Infekce způsobené více viry se vyskytly v 14,9 % případů.

2) **Období leden-červen 2008:** 84,5 % dětí mělo VGE, s výraznou převahou rotavirů v 73,7 %. Další viry byly zastoupeny méně často - caliciviry v 2,7 %, adenoviry v 0,9 %, astroviry v 2,2 % a koronaviry v 4,9 % případů. Vícečetné virové infekce se vyskytly v 15,6 % případů.

3) **Období leden-červen 2009:** 83,7 % dětí mělo VGE. Z toho rotaviry byly zodpovědné za 65,8 %, caliciviry za 0,5 %, adenoviry za 0,5 %, astroviry za 2,6 % a koronaviry za 7,4 % VGE. Infekce způsobené více viry se vyskytly v 23,2 % případů.

Zřetelně je podíl jednotlivých virů na etiologii VGE vidět v grafu (graf 4).

Graf 4: Výskyt jednotlivých virů v období leden-červen v letech 2007-2009



Legenda: duální VGE – virové gastroenteritidy způsobené více viry

Období září-prosinec 2006-2008 (graf 5):

V podzimním období byl počet hospitalizovaných dětí významně nižší.

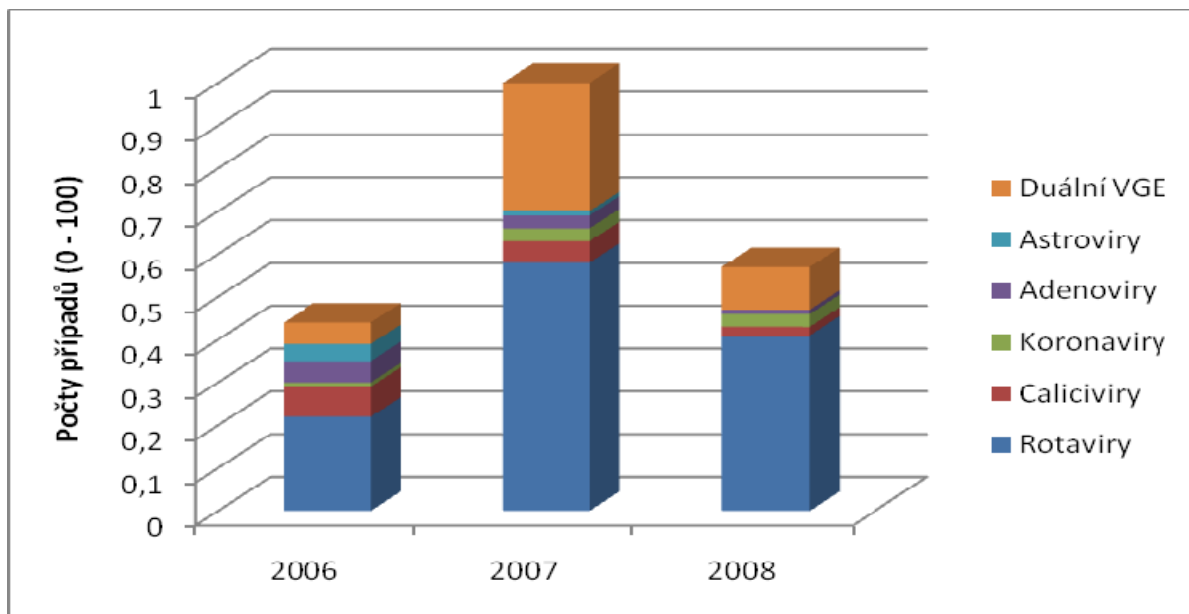
4) **Období září-prosinec 2006:** 42,7 % dětí mělo VGE. Z těchto dětí polovina měla rotavirovou AGE. Významný byl podíl calicivirů, které byly prokázány u 15,8 %, adenoviry u 11,4 %, astroviry u 9,1 % a koronaviry u 2,3 % VGE. Duální virové infekce se vyskytly v 11,4 % případů.

5) **Období září-prosinec 2007:** 74,6 % dětí mělo VGE. Z toho rotaviry byly zodpovědné za 58 %, caliciviry za 5 %, adenoviry za 3 %, astroviry za 1 % a koronaviry za 3 % VGE. Vícečetné virové infekce se vyskytly v 30 % případů.

6) **Období září-prosinec 2008:** v tomto období bylo hospitalizováno celkem 68 dětí a z toho na viry pozitivních bylo 57 - 83,8 % dětí mělo VGE. Z toho rotaviry byly zodpovědné

za 71,9 %, caliciviry za 3,5 %, adenoviry za 1,8 % a koronaviry za 5,3 % případů. Infekce způsobené více viry se vyskytly v 17,5 % případů a astroviry nebyly zachyceny vůbec.

Graf 5: Výskyt jednotlivých virů v období září-prosinec v letech 2006-2008



Legenda: duální VGE – virové gastroenteritidy způsobené více viry

6. Diskuse

Infekční průjmová onemocnění jsou stále významným problémem u dětí do pěti let věku v rozvojových i v rozvinutých zemích. Ve vyspělých zemích světa jsou AGE druhým nejčastějším infekčním onemocněním po infekcích dýchacích cest (*Kračmarová R. a Plíšek S., 2011; Monroe SS., 2011; Patel MM. et al., 2011; Šrámková L. a Rýc M., 1993*).

Nejvyšší výskyt a nejzávažnější průběh AGE u kojenců a batolat je způsoben jednak nezralostí jejich imunitního systému a také horší schopností hospodařit s vodou (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*). Četnost AGE u dětí do pěti let má význam nejen pro vznik epidemií v dětských kolektivních zařízeních, ale i pro přenos na dospělou populaci v rodinách, školách, nemocnicích a dalších kolektivech (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*).

Etiologie průjmových onemocnění se léty mění. Od roku 1950 klesl v rozvinutých zemích podíl onemocnění vyvolaných shigelami a EPEC. Posléze dominující samonely byly vystřídány bakteriemi *Campylobacter jejuni*, které byly v letech 1971-1972 objeveny jako další významný původce bakteriálních AGE (*Šrámková L. a Rýc M., 1993; Šrámová H. et al., 1988; Šrámová H. a Šmejkalová H., 1982*). V současné době je kampylobakteriíza nejčastějším průjmovým onemocněním u dospělých osob (*Tam CC. et al., 2009*); u dětí toto místo zaujímají rotaviry. V posledních letech nabývá na významu patogen *Clostridium difficile* a jeho toxiny, často v důsledku léčby širokospektrými antibiotiky (*Zilberger MD. et al., 2010*). Nebezpečí této infekce je významné také pro vznik nozokomiálních nákaz (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*).

Od osmdesátých let 20. století stoupá zájem o virovou etiologii AGE. S rozšířením možnosti diagnostiky v posledních letech byl prokázán jejich význam především v hraničních věkových skupinách. V současné době jsou rotaviry na prvním místě v etiologii AGE u dětí do pěti let. V rozvojových zemích mají rotavirové AGE závažný průběh s vysokou mortalitou (*Šrámková L. et al., 1978; Šrámková L. et al., 1983; Vesikari T. et al., 2012*). Počet případů

úmrtí dětí na rotavirové AGE se pohybuje kolem 440 tisíc až 611 tisíc případů za rok (*Fabiana A. et al., 2007; Parashar UD. et al., 2006; Rahman M. et al., 2007; Vesikari T. et al., 2007*). Na rozdíl od rozvojových zemí není v Evropě úmrtnost na rotavirová onemocnění vysoká (asi 200-250 úmrtí/rok u dětí do pěti let). Odhaduje se, že 3,6 miliónů evropských dětí do pěti let věku každý rok onemocní rotavirovou AGE, což vede k častým návštěvám lékaře (700 tisíc) a 87 tisícům hospitalizací za rok (*Parashar UD. et al., 2008; Pazdiora P., 2007b; Vesikari T. et al., 2007*).

I když v ČR jsou průjmová onemocnění druhým nejčastějším onemocněním u dětí do pěti let, úmrtí na toto onemocnění jsou vzácná. V posledních deseti letech byly v databázi EPIDAT evidovány celkem tři případy úmrtí dítěte do pěti let na rotavirovou AGE (dva případy v roce 2002, jeden případ v roce 2004). Od roku 2011 do první poloviny roku 2012 se vyskytly dva případy úmrtí dítěte do pěti let věku na rotavirovou AGE (*Pazdiora P., 2007b; Šašek L. et al., 2005*). Ve sledovaném období nebylo na našem pracovišti zaznamenáno žádné úmrtí dítěte do pěti let věku na rotavirovou AGE.

Dle velké evropské studie REVEAL, která mapovala rotavirové infekce v Evropě, bylo zjištěno, že incidence rotavirových infekcí v Evropě je vysoká. Rotaviry způsobují 30-60 % AGE a jsou zodpovědné za 19-54 % hospitalizací pro AGE u dětí do pěti let věku (*Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Guarino A. et al., 2008*). Z naší práce je zřejmé, že také u námi sledovaných dětí jsou viry hlavními původci AGE, podobně jako i v dalších evropských zemích (*De Grazia S. 2004; Frogatt PC. et al., 2004; Lennon G. et al., 2007; Medici MC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2006; Van der Wielen M., 2007; Vesikari T. et al., 2007; Wilhelmi I. et al., 2003*). Incidence rotavirových AGE v dalších evropských studiích se pohybovala od 20 do 80 % (Wales 21,6 %, Irsko 82,3 %, Itálie 21,1-40,7 %, Německo 28 %, Švédsko 52 %, Francie 61 %); (*Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Guarino A. et al., 2008*).

Určováním etiologie AGE se zabývalo naše pracoviště ve spolupráci se SZÚ již od roku 1977 (*Šrámková L. a Rýc M., 1993*). V 80. a 90. letech se používaly metody LAG,

ELISA a EM (Korych B. et al., 1983; Šrámková L. et al., 1978; Šrámková L. et al., 1986a; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Zikmundová L. et al., 1986). Diagnostika byla zaměřena především na detekci rotavirů a adenovirů. Byl prokázán zásadní význam rotavirů a adenovirů v etiopatogenezi AGE u dětí do pěti let věku u nás (Korych B. et al., 1983; Šrámková L. et al., 1978; Šrámková L. et al., 1986a; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Zikmundová L. et al., 1986). Postupně se metodika vyšetření LAG či ELISA zaváděla i na další virologická pracoviště a již od roku 1977 bylo zřejmé, že rotaviry jsou na prvním místě v etiologii AGE a že postupně v průběhu 40 let vystřídal bakteriální agens (salmonely, shigely, EPEC, atd.); (Šrámková L. et al., 1978; Šrámková L. a Rýc M., 1993). Virologické vyšetření se donedávna zaměřovalo pouze na dvě agens (rotaviry a adenoviry). V některých studiích v zahraničí a v posledních pěti letech v ČR stoupl zájem i možnosti vyšetření dalších virových agens (noroviry, sapoviry, astroviry); (Kračmarová R. a Plíšek S., 2011; Pazdiora P. a Táborská J., 2010; Šrámková L. a Rýc M., 1993; Vesikari T. et al., 2012).

Pomocí EM bylo možné významně zvýšit objasněnost etiologie AGE (95,9 %), což převyšovalo výsledky z jiných zemí. Podle velké studie, která sjednotila výsledky studií z různých zemí Evropy, se v závislosti na použité metodě pohybovala znalost etiologie AGE u dětí do pěti let kolem 40-55 % (Guarino A. et al., 2008).

V ČR se kromě naší kliniky velkou měrou zabývají diagnostikou AGE taktéž na pracovištích v Plzni a Ostravě. Plzeňské pracoviště využívá k diagnostice rotavirů, adenovirů, calicivirů a astrovirů, mimo jiné i metodu ELISA, ostravské pracoviště má v posledních letech kromě běžných metod dostupnou také EM. Plzeňským pracovníkům se v roce 2004 podařilo prokázat etiologii AGE ve věkové kategorii dětí do pěti let u 72 % dětí (372 sledovaných dětí); (Táborská J. a Pazdiora P., 2005). V roce 2008 vzrostl počet objasněných AGE téměř na 74 % ze všech hospitalizovaných dětí. Více než polovinu případů tvořily rotavirové AGE s největším záchytem u dětí do pěti let (Pazdiora P. a Táborská J., 2010).

Rotaviry jsou v současné době dle databáze EPIDAT třetím nejčastějším původcem AGE u dětí do pěti let a tvoří 21 % hlášených případů v ČR. Skutečný výskyt je však vzhledem k dlouhodobé podhlášenosti mnohem vyšší (*Pazdiora P., 2010*). Podle výsledků z 59 laboratoří (LAG - 34 laboratoří, ICH - 21 laboratoří, ELISA - 6, EM - jedna laboratoř, tři laboratoře používaly dvě metody) bylo v ČR během roku 2004 diagnostikováno 2589 dětí do pěti let s rotavirovou infekcí. Specifická nemocnost v této věkové skupině byla 604/100000 dětí (*Pazdiora P., 2006*). V roce 2006 vyšetření provedlo již 80 laboratoří zajišťujících diagnostiku rotavirových infekcí. Laboratorně bylo potvrzeno 4815 onemocnění. Při přepočtu na populaci dětí do pěti let dosáhla specifická nemocnost 697/100000 dětí (*Pazdiora P., 2007b*). V roce 2008 vyšetření provedlo 81 laboratoří, bylo potvrzeno 6060 onemocnění a specifická nemocnost již představovala 710,8/100000 dětí do pěti let věku (*Pazdiora P., 2010*).

V evropských zemích je podíl ostatních virů na etiologii AGE podstatně nižší, což je v souladu i s výsledky naší studie. Druhým nejčastějším etiologickým agens v naší studii byly caliciviry (5,3 %) spolu s koronaviry (5,3 %), následovány adenoviry (2,5 %) a astroviry (2,3 %). Druhé místo calicivirů (2-20 %) souhlasí prakticky se všemi literárními údaji zemích (*Frogatt PC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2006*). V evropských studiích zauímají adenoviry (2-10 %) třetí místo za rotaviry a noroviry (*De Grazia S., 2004; Guarino A. et al., 2008; Medici MC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2006*). Je pozoruhodné, že adenoviry, které jsou v ČR běžně vyšetřovány, se umístily až za koronaviry, které jsou pokládány za možné původce VGE a zřejmě by měly být běžně vyšetřovány. Některé studie však popisují nález koronavirů ve stolici ve stejném procentu u zdravých a nemocných lidí, jiné častěji u nemocných (*Ambrožová H., 2006; Šrámková L. et al., 1986b*). Poslední místo astrovirů v naší práci nebylo překvapivé, výsledky jsou v souladu s předešlými studii zabývajícími se poměrem astrovirů u dětských AGE ve vyspělých zemích (2-8 %), jako jsou

Francie, Španělsko, Austrálie, USA (*De Grazia S., 2004; Papaventsis DC. et al., 2007; Savadkoohi RB et al., 2007*).

V literatuře jsou duální infekce také popisovány u sporadických VGE, ale v menším procentu, obvykle okolo 3-6 %, a to nejčastěji rotaviry spolu s noroviry (*Frogatt PC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2006*). U nás tyto duální virové infekce tvořily až 150 případů (18,5%), z nichž v 7 případech (4,7 %) bylo nalezeno více virů. Nejčastěji se vyskytovaly rotaviry spolu s koronaviry, dále rotaviry s caliciviry a rotaviry s astroviry. U duálních infekcí je někdy velice těžké se jednoznačně vyjádřit, který z nalezených patogenů je rozhodujícím původcem onemocnění. Případně zda se na něm podílejí obě dvě či jen jedno agens. Pochybnosti nastávají v případě pozitivního kultivačního nálezu bakterií se současným nálezem některého z virů při EM nebo při nálezů rotavirů s jiným virem při EM (*Ambrožová H. a Schramlová J., 2005*).

Sezónnost výskytu jednotlivých virů vyvolávajících VGE byla nejvýraznější u rotavirových infekcí. V souladu s literaturou byl nejvyšší záchyt v chladném období roku (*Guarino A. et al., 2008; Medici MC. et al., 2004*). V roce 2007 přetrvával výskyt rotavirových infekcí až do května a významný výskyt byl také v prosinci, s prodloužením do roku 2008, také až do května. Maximum přijatých pacientů s rotavirovou AGE bylo v dubnu 2007 (82,9 % případů) a v březnu 2008 (80,8 % případů). Na rozdíl od rotavirů byly caliciviry přítomny v průběhu celého roku s maximem v roce 2007 v lednu a únoru a v roce 2008 v lednu. V literatuře je nejčastěji uváděn vrchol výskytu norovirů od září do prosince (*De Grazia S., 2004; Medici MC. et al., 2004; Medici MC. et al., 2006; Papaventsis DC. et al., 2007*). U adenovirů a koronavirů není popisován typický sezónní výskyt, vyskytují se v průběhu celého roku (*Ambrožová H., 2006a*). U astrovirů byl největší výskyt v roce 2007 od listopadu do února; v roce 2008 v lednu, dubnu a červenci. V literatuře je nejčastěji uváděn vrchol výskytu astrovirů od března do května (*De Grazia S., 2004*). Ve všech sledovaných obdobích převažoval vyšší počet hospitalizovaných dětí v časovém období leden až červen,

než v období září až prosinec. V tomto období byl i vyšší výskyt VGE, respektive rotavirových AGE. V naší tříleté studii je rovněž patrný narůstající trend výskytu VGE u hospitalizovaných dětí.

Pokud se týče klinického obrazu sledovaných pacientů s AGE dominoval v 66,6 % horečnatý stav, se zvracením a řídkými stolicemi, ale bez příměsi krve. Až 853 dětí (80,5 %) jevílo při příjmu známky dehydratace různého stupně a u 833 dětí (78,7 %) bylo nezbytné zahájení parenterální rehydratace. Z těchto dětí 46 (5,5 %) mělo hyponatremickou dehydrataci a 31 dětí (3,6 %) závažnější hypernatremickou dehydrataci. Ve shodě s literárními údaji byla tíže onemocnění nejvyšší u rotavirů (*Šrámková L. et al., 1986a; Šrámková L. a Ambrožová H., 1988; Táborská J. a Pazdiora P., 2005; Wilhelmi I. et al., 2003*). Parenterální rehydratace byla nutná u 81,9 % případů rotavirových infekcí. Byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi věkem dítěte a typem dehydratace a taktéž mezi věkem dítěte a délkou hospitalizace. Dále byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi typem rehydratace a věkem dítěte. Při srovnání typu rehydratace s délkou hospitalizace se hladiny blížili statistické významnosti. Ve sledovaném období jsme u žádného dítěte nezaznamenali případ aseptické rotavirové meningoencefalitidy. V laboratorním nálezu u 59,4 % dětí byla zjištěna elevace jaterních transamináz. Tato parainfekční hepatopatie s transaminázami obvykle mezi 1-2 $\mu\text{kat/l}$ se vyskytuje u rotavirových VGE téměř vždy (*Ambrožová H. a Arientová S., 2008; Táborská J. a Pazdiora P., 2005*).

Průměrná délka hospitalizace byla 5,2 dne (medián 5 dní), což je ve shodě s evropskými daty, kde průměrná délka pobytu v nemocnici byla 2-9,5 dne (medián 4,8 dne); (*Rodrigo C., 2007*). Běžná délka hospitalizace v zemích západní Evropy je 3-5 dní. Ve státech střední Evropy je však podstatně delší, např. 8,3 dne v Maďarsku a 9,5 dne u dětí do pěti let v Polsku (*Rodrigo C., 2007*).

Rotaviry jsou taktéž považovány za nejčastější původce nozokomiálních AGE na pediatrických odděleních. Výskyt nozokomiálních rotavirových AGE během hospitalizace

kolísá od 5-30 % (*Pazdiora P., 2010; Pazdiora P. a Táborská J., 2010*). V naší tříleté studii jsme prokazatelně zaznamenali celkem 13 případů nozokomiálních rotavirových AGE.

Porovnání EM s LAG prokázalo význam metody EM pro její mnohem větší senzitivitu. U rotavirů byla senzitivita EM 100 %, zatímco LAG pouze 65,4 %. Nemáme však srovnání s metodou ELISA, kde je proti LAG snad senzitivita vyšší (*Pazdiora P., 2010*). Podobná situace byla u adenovirů, senzitivita vyšetření EM byla taktéž 100 %, u LAG jen 60 %. Jedním z důvodů horší senzitivity LAG může být fakt, že EM je schopna odhalit i jen ojedinělé viry či jejich fragmenty, zatímco LAG je schopna detekovat jen přítomnost většího množství virů ve stolici (*Ambrožová H. a Schramlová J., 2005*).

Výhodou přímé metody EM je rychlost a neselektivnost. Po jednoduchém a rychlém negativním barvení dovoluje morfologickou identifikaci a diferenciální diagnostiku různých infekčních agens nacházejících se ve vyšetřovaném vzorku. EM také umožňuje detekci i několika agens při mnohonásobné infekci, která se může objevit právě u dětí s AGE (*Schramlová J. et al., 2010*). Význam EM nabývá také u zvýšeného výskytu norovirových AGE v posledních letech v nemocnicích, kde způsobují nozokomiální epidemie. Vysoká rozmanitost této skupiny virů může vést k chybné detekci i konvenčními rutinními diagnostickými sety PCR. Použití EM jako doplňkové metody může být v těchto případech rozhodující (*Curry A., 2003; Gentile M. and Gelderblom HR., 2005; Schramlová J. et al., 2010*). Další možností využití EM by mohlo být v diagnostice nejasné etiologie aseptické meningoencefalitidy u dítěte v raném věku, na což poukazují výsledky Dr. Schramlové, která prokázala výskyt rotavirů v mozkomíšním moku u dítěte s aseptickou meningitidou (viz obrázek 9, 10).

7. Závěr

Hlavním cílem práce bylo prokázat rozhodující podíl VGE v etiologii průjmových onemocnění u dětí do pěti let v České republice, a také poukázat na důležitost EM v jejich diagnostice.

Naše studie přinesla tyto výsledky:

- nejvíce postiženou věkovou skupinou byly děti do dvou let, které tvořily 59%
- nejčastější diagnóza u příjmu byla akutní gastroenteritida u 84,3 % dětí
- 80,5 % dětí jevílo při příjmu známky dehydratace
- u 78,7 % dětí bylo nezbytné zahájení parenterální rehydratace
- byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi věkem dítěte a typem dehydratace a taktéž mezi délkou hospitalizace a typem dehydratace
- byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi typem rehydratace a věkem dítěte.
- zejména díky EM se nám podařilo prokázat původce AGE u 95,9 % dětí
- největší skupinu hospitalizovaných dětí tvořily děti s čistě VGE – 77 %
- nejčastěji detekovanými původci byly rotaviry – 66,1 %
- u 18,5 % dětí s VGE bylo ve stolici přítomno více virů (zjištěno EM)
- při srovnání EM a LAG u rotavirů i adenovirů byla EM mnohem senzitivnější než LAG
- nejvyšší záhyt rotavirových AGE byl zaznamenán v zimních a jarních měsících (leden-květen)
- ve všech sledovaných obdobích převažoval vyšší počet hospitalizovaných dětí v časovém období leden-červen než v období září-prosinec

Výsledky naší práce mohou být podkladem pro diskuzi o významu vakcinace proti rotavirovým infekcím v podmínkách ČR a taktéž o zlepšení diagnostiky virových gastroenteritid, které jsou u nás významně poddiagnostikovány.

Setrvávající trend zvyšování výskytu rotavirových infekcí je důležitým důvodem zvažování nepovinné vakcinace kojenců. Bude však zajímavé sledovat, po dosažení vyššího podílu vakcinovaných dětí, které z dalších virových agens případně rotaviry nahradí.

8. Souhrn

Průjmová onemocnění patří u dětí na celém světě mezi nejčastější infekční onemocnění, a zejména v rozvojových zemích jsou stále signifikantní příčinou morbidit a mortality. Ročně jsou průjmová onemocnění na celém světě zodpovědná za smrt 1,5 milionů dětí v prvních pěti letech jejich života.

Cílem práce bylo prokázat rozhodující podíl virových gastroenteritid na etiologii průjmových onemocnění u dětí do pěti let, a také poukázat na důležitost EM v jejich diagnostice.

V prospektivní studii byla sledována etiologie průjmových onemocnění u dětí do pěti let hospitalizovaných na Infekční klinice NNB od září 2006 do června 2009. U všech dětí byla bakteriální etiologie vyšetřována kultivací stolice, virová etiologie pomocí LAG a EM.

Do studie bylo zařazeno 1059 dětí. Průměrný věk dětí byl 1,9 roku s průměrnou délkou hospitalizace 5,2 dne. Etiologické agens se podařilo objasnit u 1051 dětí (95,9 %). Bakteriální etiologie byla zjištěna u 22 dětí (2,1 %), duální infekci (bakterie a viry) jsme ověřili u 183 pacientů (17,3%) a u 810 dětí (76,5 %) byla prokázána virová etiologie. Nejčastější původci AGE v naší studii byly rotaviry u 535 dětí, následovány caliciviry 43, koronaviry 43, adenoviry 20 a astroviry u 19 dětí. Velkou skupinu tvořily duální virové infekce v 150 případech, zejména rotaviry s koronaviry. U 833 dětí (78,7 %) bylo nezbytné zahájení parenterální rehydratace. V diagnostice rotavirů a adenovirů byla EM citlivější než LAG.

Studie potvrdila rozhodující význam virů v etiologii průjmových onemocnění u dětí do pěti let v ČR. Potvrdila též důležitost EM v jejich diagnostice, zejména při malých epidemiích.

9. Summary

Acute gastroenteritis is one of the most frequent diseases in children worldwide and remains the main cause of childhood morbidity and mortality, particularly in developing countries. Each year as many as 1.5 million children less than first five years die in the world from acute gastroenteritis.

Our study has been aimed at demonstrating of the main role of viruses in the aetiology of acute gastroenteritis in children less than five years old and at pointing out the diagnostic potential of electron microscopy in viral gastroenteritis.

A prospective study was conducted to analyse the aetiology of diarrhoeal diseases in children less than five years of age admitted to the Department of Infectious Diseases of the Na Bulovce Hospital, Prague, between September, 2006 and June, 2009. All children were tested by faecal culture for bacterial aetiology and by latex agglutination and electron microscopy for viral aetiology.

A total of 1059 children were included in the study. The mean age of children was 1.9 years and the mean length of hospitalisation was 5.2 days. An aetiological agent was detected in 1051 children (95.9%). A bacterial aetiology was found in 22 (2.1%) children, bacterial-viral co-infection was found in 183 (17.3%) patients and viruses were detected in 810 (76.5%) patients. The main causes of viral gastroenteritis were rotaviruses (detected in 535 children), followed by caliciviruses (43), coronaviruses (43), adenoviruses (20) and astroviruses (19). Dual viral infections were detected in 150 children, with rotavirus-coronavirus co-infection being the most common. Eight hundred and fifty three (80.5%) children needed parenteral rehydration. Electron microscopy proved to be a more sensitive method in comparison with the latex agglutination test for the diagnosis of rotaviruses and adenoviruses.

The major role of viruses in diarrhoeal diseases among children under five years of age in the Czech Republic has been confirmed. The diagnostic potential of electron microscopy, particularly in small outbreaks of gastroenteritis, was clearly demonstrated.

10. Seznam zkratek

AGE - akutní gastroenteritida

ANOVA – analýza rozptylu (analysis of variance)

EHEC - enterohemoragické *Escherichia coli*

ELISA – enzymová imunoanalýza (Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay)

EM - elektronová mikroskopie

EPEC - enteropatogenní *Escherichia. coli*

EPEC O127 – enteropatogenní *Escherichia coli* O127

EPIDAT - informačním systém hygienické služby ČR

ETEC O25 – enterotoxigenní *Escherichia coli* O25

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ICH - imunochromatografická metoda

LAG - latexová aglutinace

NGS – nazogastrická sonda

NNB – Nemocnice Na Bulovce

NRL/ELM – Národní referenční laboratoř pro elektronovou mikroskopii

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

REVEAL - Rotavirus Gastroenteritis Epidemiology and Viral Types in Europe Accounting
for Losses in Public Health and Society

RNA - ribonukleová kyselina

SRSV – virus malé kulaté struktury (small round structure virus)

SZÚ – Státní zdravotní ústav

TEM – transmisní elektronový mikroskop

VGE - virová gastroenteritida

WHO – světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

11. Literatura

1. Ambrožová H. Infekční průjmová onemocnění u dětí. *Pediatr praxi* 2004;5:238-240.
2. Ambrožová H. Infekční průjmy u dětí a jejich léčba. *Pediatr praxi* 2006b;3:154-156.
3. Ambrožová H. Virové gastroenteritidy. *Postgraduální medicína* 2006a;3:291-297.
4. Ambrožová H, Arientová S. Rotavirové infekce a nové možnosti jejich prevence. *Pediatr praxi* 2008;9:104-108.
5. Ambrožová H, Schramlová J. Virové gastroenteritidy. *Pediatr praxi* 2007;1:43-47.
6. Ambrožová H, Schramlová J. Virové gastroenteritidy u dětí. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 2005;11:83-91.
7. Arias C, Sala MR, Domínguez A, Torner N, Ruíz L, Martínez A, Bartolomé R, de Simón M, Buesa J. Epidemiological and clinical features of norovirus gastroenteritis in outbreaks: a population-based study. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:39-44.
8. Bednář M. *Lékařská mikrobiologie*, 1. vydání. Praha: Triton 2009.
9. Beneš J a kol. *Infekční lékařství*, 1. vydání. Praha: Galén 2009.
10. Biel S, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol* 1999;3:105-119.
11. Brenner S, Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta* 1959;34:103-110.
12. Curns AT, Steiner CA, Barrett M, Hunter K, Wilson E, Parashar UD. Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: Analysis of hospital discharge data from 18 US states. *J Infect Dis* 2010;201:1617-1624.
13. Curry A. Electron microscopy and the investigation of new infectious diseases. *Internat J Infect Dis* 2003;7:251-258.

14. De Grazia S, Giammanco GM, Colomba C, Cascio A, Arista S. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Italian children with gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:1025–1029.
15. Desai SN, Vázquez M. Update on rotavirus trends and the importance of surveillance. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:1130-1132.
16. Desselberger U, Gray J. Viruses associated with acute diarrhoeal disease. *Principles and Practise of Clinical Virology*, Fith Edition. UK: Wiley John & Sons 2004.
17. Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka city, Bangladesh during 2004–2005. *J Med Virol* 2007;79:633–638.
18. de Wit MSA, Koopmans MPG, van Duynhoven YTHP. Risk factors for norovirus, sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1563-1570.
19. Dufková M. Elektronový mikroskop. 3POL magazín. <http://3pol.cz/327-elektronovy-mikroskop>.
20. Esona MD, Geyer A, Banyai K, Page N, Aminu M, Armah GE, Hull J, Steele DA, Glass RI, Gentsch JR. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 2009;15:83-86.
21. Fabiana A, Donia D, Gabrieli R, Petrinca AR, Cenko F, Bebeci D, Altan AMD, Buonomo E, Divizia M. Influence of enteric viruses on gastroenteritis in Albania: epidemiological and molecular analysis. *J Med Virol* 2007;79:1844–1849.
22. Froggatt PC, Vipond IB, Ashley CR, Lambden PR, Clarke IN, Caul EO. Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in south west England and south Wales, during one winter season (1999-2000). *J Med Virol* 2004;72:307-311.

23. Fyzikální podstatata EM. <http://web.natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/elektronova.htm>.
24. Gentile M, Gelderblom HR. Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy. *New Microbiol* 2005;28:1-12.
25. Goldmund K. Terapie akutních kojeneckých gastroenteritid. *Pediatr praxi* 2001;6:264-268.
26. Gomes KA , Stupka JA, Gomez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol* 2007;79:1703–1709.
27. Guarino A, Albano F, Ashkenazi S, Gendrel D, Hoekstra JH, Shamir R, Szajewska H. European society for paediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition/European society for paediatric infectious diseases: Evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *JPGN* 2008;46:S81-S122.
28. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy T, Griffin PM, DuPont H, Sack RB, Tarr P, Neill M, Nachamkin I, Reller LB, Osterholm MT, Bennis ML, Pickering LK. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *IDSA GUIDELINES. Clin Infect Dis* 2001;32:331-50.
29. Harris JR. Negative staining and cryo-electron microscopy. Oxford: Bios Scientific Publications 1997.
30. Hayat MA, Miller SS. Negative staining McGraw-Hill Publishing Company 1990.
31. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* 2003;9:294-303.
32. Jeong HS, Jeong A, Cheong D. Epidemiology of astroviruses infection in children. *Korean J Pediatr* 2012;55:77-82.

33. Karsten C, Baumgarte S, Friedrich AW, von Eiff C, Becker K, Wosniok W, Ammon A, Bockemühl J, Karch H, Huppertz HI. Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:935-943.
34. Knoll M and Ruska E. Das elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik* 1932;78:318-329.
35. Korych B, Rýc M, Sobotková E. Porovnání a zhodnocení různých metod laboratorní diagnostiky rotavirových infekcí (elektronová mikroskopie, protisměrná imunoelktroforéza, enzymatická imunoesej, koaglutinace, imunofluorescence). *Čs Epidem* 1983;32:185.
36. Kračmarová R, Plíšek S. Virové gastroenteritidy v denní pediatrické praxi. *Pediatr praxi* 2011;12:238-240.
37. Kruger DH, Schneck P, Gelderblom HR. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *Lancet* 2000;355:1713-17.
38. Lennon G, Cashman O, Lane K, Cryan B, O'Shea H. Prevalence and characterization of enteric adenoviruses in the south of Ireland. *J Med Virol* 2007;79:1518–1526.
39. Li CSY, Chan PKS, Tang JW. Prevalence of diarrhea viruses in hospitalized children in Hong Kong in 2008. *J Med Virol* 2009;81:1903-1911.
40. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, Ngwira B, Victor JC, Gillard PH, Chevart BB, Han HH, Neuzil KM. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med* 2010;362:289-98.
41. Mandell GL, Benett JE, Dolin R. Principles and practice od infectious diseases, 7th edition. Philadelphia: Elsevier 2005.
42. Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, van Ranst M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis* 2010;16:625-630.

43. Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Izzi G, Bernasconi S, Chezzi C, Dettori G. Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in northern Italy. *J Med Virol* 2006;78:1486–1492.
44. Medici MC, Martinelli M, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Icilio D, Viridis R, Abelli A, Aloisi A, Zerbini L, Valcavi P, Calderaro A, Bernasconi S, Izzi GC, Dettori G, Chezzi C. Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. *Acta Biomed* 2004;75:100-106.
45. Monroe SS. Control and prevention of viral gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1347-1348.
46. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*, 5th edition. Philadelphia: Mosby Elsevier 2009.
47. National respiratory and enteric virus surveillance system. Reduction in rotavirus after vaccine introduction – United States, 2000-2009. *Morb Mortal Wkly Rec* 2009;41:1146-1149.
48. Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, Anthony Hart CA. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004–2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13:908-911.
49. Parashar UD and Glass RI. Rotavirus vaccination in Europe: the time has finally arrived. *JPGN* 2008;46:S21-S23.
50. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-306.
51. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-572.

52. Patel MM, Steele D, Gentsch JR, Wecker J, Glass RI, Parashar UD. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:S1-S5.
53. Pazdiora P. Diagnostika rotavirových infekcí v r. 2004, jejich základní charakteristiky v letech 1998-2004 v ČR. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2006;1:32-36
54. Pazdiora P. Rotavirové infekce, současné možnosti očkování. *Pediatr praxi* 2007a;2:88-91.
55. Pazdiora P. Význam rotavirových infekcí, současné možnosti očkování. *Pediatr praxi* 2010;11:68-71.
56. Pazdiora P. Základní charakteristiky rotavirových infekcí. *Medical Tribune* 2007b;35: příloha.
57. Pazdiora P, Švecová M. G-serotypes of group A rotaviruses in pilsen region (Czechia). *Folia Mikrobiol* 2006;2:133-135.
58. Pazdiora P, Táborská J. Průjmová onemocnění vyvolaná rotaviry 1. vydání. Praha: Grada Publishing 2004.
59. Pazdiora P, Táborská J. Rotavirové gastroenteritidy, vakcinace. *Klin Farmakol Farm* 2010;24:29-33.
60. Prokeš M, Pazdiora P, Suchopár J. Nákladová efektivita očkování vakcínou Rotarix v České republice. *Vakcinologie* 2012;6:103-108.
61. Rahman M, Sultana R, Ahmed G, Nahar S, Hassan ZM, Saiada F, Podder G, Faruque ASG, Siddique AK, Sack DA, Matthijnssens J, Ranst MV, Azim T. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2007;13:18-24.
62. Rodrigo C. How large is the burden of rotavirus gastroenteritis at hospital level in Europe? *Europ Rotavirus J* 2007;3:12-13.
63. Savadkoobi RB, Ahmadpour-Kacho M, Yahyapour Y. Prevalence of viral gastroenteritis in children in Babol, Iran. *J Pediatr Infect Dis* 2007;2:211-214.

64. Schramlová J, Arientová S, Hulínská D. The role of electron microscopy in rapid diagnosis of viral infections. *Folia Microbiol* 2010;55:88-101.
65. Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Bufon T, Sedmak M, Vidmar L, Mijovski JZ, Marin J. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J Med Virol* 2006;78:1250-1255.
66. Stupka JA, Parra GI, Gomez J, Arbiza J. Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes. *J Med Virol* 2007;79:838-842.
67. Sýkora J, Huml M. Problematika akutního průjmu u dětí a s tím spojená dehydratace. *Pediatr praxi* 2008;9:123-124.
68. Souhrn SPC. EU/1/05/330/001/004. Souhrn údajů o přípravku ROTARIX. Datum revize 19. 6. 2008.
69. Souhrn SPC. EU/1/06/338/001-002. Souhrn údajů o přípravku ROTATEQ. Datum revize 29. 6. 2009.
70. Šašek L, Pazdiora P, Kobr J, Pizingerová K. Fatální průběh rotavirové gastroenteritidy - kazuistika. *Klin mikrobiol inf lék* 2005;11:67-69.
71. Šrámková L, Ambrožová H. Zkušenosti s rehydratací kojenců a batolat s průjmovými onemocněními kapénkovou infuzí nazogastrickou sondou. *Čs Pediatr* 1988;43:134.
72. Šrámková L, Havlík J, Šlárová J, Tichý M, Rýc M, aj. Rotavirová gastroenteritis-nejčastější průjmové onemocnění kojenců a batolat. *Čs Pediat* 1983;38:385.
73. Šrámková L, Rýc M, Pešek J, Daneš L. Význam koronavirů, parvovirům podobných částic a adenovirus ve stolici u dětských průjmových onemocnění. *Prakt Lék* 1986b;66:205.
74. Šrámková L, Rýc M, Pešek J. Rotavirové gastroenteritidy kojenců a batolat. *Čs Pediat* 1978;33:670.

75. Šrámková L, Rýc M. Virové gastroenteritidy v klinické praxi, 1. vydání. Praha: Grada-Avicenum 1993.
76. Šrámková L, Rýc M, Zikmundová L, aj. Klinická problematika rotavirových gastroenteritid v letech 1977-1984. Prakt Lék 1986a;66:208.
77. Šrámová H, Brabcová A, Kováčová D. Výskyt salmonelóz v humánní populaci ČSR. Čs Epidem 1988;37:272.
78. Šrámová H, Šmejkalová H. K současné situaci alimentárních nákaz bakteriálního původu. Čs Epidem 1982;31:214.
79. Táborská J. Infekční průjmová onemocnění. Inter med pro Praxi 2005;9:414-416.
80. Táborská J, Pazdiora P. Rotavirus jako nejčastější původce průjmů u dětí. Pediatr praxi 2005;3:135-140.
81. Tam CC, Higgins CD, Neal KR, Rodrigues LC, Millership SE, O'Brien SJ. Chicken consumption and use of acid-suppressing medications as risk factors for campylobacter enteritis, England. Emerg Infect Dis 2009;15:1402-1408.
82. Van der Wielen M, Giaquinto C, Van Damme P. REVEALing the size of the problem: an update on RV gastroenteritis epidemiology in Europe. Europ Rotavirus J 2007;3:4-8.
83. Verhoef L, Vennema H, van Pelt W, Lees D, Boshuizen H, Henshilwood K, Koopmans M. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. Emerg Infect Dis 2010;16:617-624.
84. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckenooghe A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: Randomised, double-blind controlled study. Lancet 2007;370:1757-63.

85. Vesikari T, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Bouckenoogle A, Damaso S, Han HH. Efficacy and immunogenicity of live-attenuated human rotavirus vaccine in breast-fed and formula-fed European infants. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:509-513.
86. Votava M. a kol. Lékařská mikrobiologie speciální, 1. vydání. Brno: Neptun 2003.
87. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247-262.
88. Zikmundová L, Hejná M, Šrámková L, aj. Možnosti průkazu rotavirových onemocnění v praxi (porovnání metod ELISA, CIEP a latexové aglutinace pro záchyt viru a korelace záchytu viru s průkazem vzestupu protilátek). *Čs Epidem* 1986;35:217.
89. Zilberberg MD, Tillotson GS, McDonald LC. *Clostridium difficile* infections among hospitalized children, United States, 1997–2006. *Emerg Infect Dis* 2010;16:604-609.

12. Přílohy

Příloha 1. PŮVODNÍ ČLÁNEK FOLIA MICROBIOLOGICA

Arientová S, Schramlová J, Ambrožová H, Marešová V, Holub M. Electron microscopy in the diagnosis of viral gastroenteritis in hospitalised children in the Czech Republic. *Folia Microbiol* 2012;57:177-182.

Příloha 2. PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK FOLIA MICROBIOLOGICA

Schramlová J, **Arientová S**, Hulínská D. The role of electron microscopy in the rapid diagnosis of viral infections. Folia Microbiol 2010;55:88-101.

Příloha 3. PŮVODNÍ ČLÁNEK PEDIATRIE PRO PRAXI

Ambrožová H., **Arientová S.** Rotavirové infekce a nové možnosti jejich prevence. *Pediatr praxi* 2008;9:104-108.

Příloha 4. *POSTER PREZENTOVANÝ NA KONGRESU ESPID*

Arientová S., Schramlová J., Ambrožová H., Šedivý K., Marešová V., The Role of Electron Microscopy in Diagnostics of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children., European Society for Paediatric Infectious Diseases, Graz, 2008

Příloha 5. *POSTER PREZENTOVANÝ NA SVK 2. LF UK*

Arientová S., Ambrožová H., Schramlová J., Marešová V., Virové gastroenteritid u dětí do pěti let a role EM v jejich diagnostice, SVK 2. LF UK, FN Motol, Praha, 2010

Příloha 6. SEZNAM PUBLIKACÍ, ABSTRAKT PŘEDNÁŠEK

Původní články k tématu disertační práce:

- **Arientová S**, Schramlová J, Ambrožová H, Marešová V, Holub M. Electron microscopy in the diagnosis of viral gastroenteritis in hospitalised children in the Czech Republic. *Folia Microbiol* 2012;57:177-182.
- Schramlová J, **Arientová S**, Hulínská D. The role of electron microscopy in the rapid diagnosis of viral infections. *Folia Microbiol* 2010;55:88–101.
- Ambrožová H., **Arientová S**. Rotavirové infekce a nové možnosti jejich prevence. *Pediatr praxi* 2008;9:104-108.

Zahraníční přednášky:

- **Arientová S.**, Schramlová J., Ambrožová H., Marešová V., Viral gastroenteritis in children in the Czech Republic and the role of electron microscopy in their diagnostics, ESCMID Summer School, Porto, 2009
- **Arientová S.**, Schramlová J., Ambrožová H., Šedivý K., Marešová V., The Role of Electron Microscopy in Diagnostics of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children., European Society for Paediatric Infectious Diseases, Graz, 2008
- **Arientová S.**, Ambrožová H., Schramlová J., Marešová V., Rotavirové gastroenteritidy na infekční klinice FNB v Praze v České republice, 6. Slovenský pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Košice, 2007
- **Arientová S.**, Ambrožová H., Schramlová J., Marešová V., Etiologie a diagnostika virových gastroenteritid u dětí do pěti let v ČR, 6. Slovenský pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Košice, 2007

Abstrakta z mezinárodních kongresů:

- Šedivý K, **Arientová S.**, Picha D., Holeckova D., Marešová V., Neuroboreliosis in children hospitalized at the clinic for infectious diseases, European Society for Paediatric Infectious Diseases, Graz, 2008
- Ambrožová H., **Arientová S.**, Schramlová J., Marešová V., Etiology, clinical course and diagnostic of gastroenteritis in children in the Czech Republic; International Congress of Pediatrics, Atheny, 2007
- Blechová Z., Šoltysová K., **Arientová S.**, Marešová V., Paretic involvement in children in the 1.st Department of infectious diseases in University Hospital Bulovka, European Society for Paediatric Infectious Diseases, Porto, 2007
- Ambrožová H., Schramlová J., **Arientová S.**, Marešová V., Diarrheal diseases in children in the Czech Republic, European Society for Paediatric Infectious Diseases, Porto, 2007