

ARTICOL DE CERCETARE

Analiza comparativă a caracteristicilor infecției rotavirale la sugarii vaccinați și nevaccinați: studiu prospectiv, descriptiv

Tatiana Alsaliem^{1,2*}, Ala Donos¹, Constantin Spînu⁴, Ninel Revenco¹, Valentin Țurea¹, Ion Mihu¹, Radu Cojocaru³, Stela Gheorghita³, Albina-Mihaela Iliev³

¹Departamentul de pediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Spitalul Clinic Municipal de Copii nr. 1, Chișinău, Republica Moldova;

³Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

⁴Agencia Națională de Sănătate Publică, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 04.02.2019

Data acceptării spre publicare: 11.06.2019

Autor corespondent:

Tatiana Alsaliem, medic pediatru

Secția de boli diareice acute

Spitalul Clinic Municipal de Copii nr. 1

str. Serghei Lazo, 7, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: banaritania@yahoo.com

RESEARCH ARTICLE

Comparative analysis of the characteristics of rotaviral infection in vaccinated and non-vaccinated infants: prospective, descriptive study

Tatiana Alsaliem^{1,2*}, Ala Donos¹, Constantin Spînu⁴, Ninel Revenco¹, Valentin Țurea¹, Ion Mihu¹, Radu Cojocaru³, Stela Gheorghita³, Albina-Mihaela Iliev³

¹Department of pediatrics, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

²Municipal Children's Clinical Hospital no. 1, Chisinau, Republic of Moldova;

³Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

⁴National Agency for Public Health, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 04.02.2019

Accepted for publication on: 11.06.2019

Corresponding author:

Tatiana Alsaliem, paediatrician

Acute diarrheal diseases unit

Municipal Children's Clinical Hospital no. 1

7, Serghei Lazo str., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: banaritania@yahoo.com

Ce nu este cunoscut, deocamdată la subiectul abordat?

Nu este cunoscută variabilitatea genetică a infecției rotavirale la sugari până și după vaccinare, precum și evoluția acestui virus în funcție de genotip, fenotip, statutul imun al pacientului, prezența comorbidităților la sugari, până și după vaccinare.

Ipoteza de cercetare

Vaccinarea populației cu vaccin rotaviral modifică caracteristicile clinico-paraclinice ale infecției rotavirale și genotipul agentului patogen.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Articolul prezintă date despre influența vaccinării asupra genotipului și fenotipului rotaviral în Republica Moldova, precum și aspecte ale evoluției clinico-paraclinice a infecției rotavirale la sugari pre- și postvaccinal.

Rezumat

Introducere. Boala diareică acută este una dintre cele mai actuale probleme de sănătate ale sugarului. Infecția rotavirală este cauza cea mai frecventă de deshidratare la sugar și la copilul mic. Implementarea supravegherii santinelă a infecției

What is not known yet, about the topic

The genetic variability of rotaviral infection in infants up to and after vaccination is unknown, as well as the evolution of this virus depending on genotype, phenotype, and patient's immune status, presence of comorbidities in infants, up to and after vaccination.

Research hypothesis

Vaccination of population by rotaviral vaccine modify clinical and paraclinical rotaviral infection characteristics, as well as the pathogen genotype.

Article's added novelty on this scientific topic

The article presents data on the influence of vaccination on rotaviral genotype and phenotype in the Republic of Moldova, as well as aspects of the clinical-paraclinical evolution of rotaviral infection in pre- and post-vaccinated infants.

Abstract

Introduction. Acute diarrheal disease is one of the most current health problems of the baby. Rotaviral infection is the most common cause of dehydration in infants and young children. The implementation of the sentinel surveillance of rota-

ei rotavirale la sugari din anul 2008 în Republica Moldova a demonstrat rata înaltă a acestei infecții (40,0%), fiind un argument în recomandarea imunizării antirotavirale la copii în cadrul Programului Național de Imunizări.

Material și metode. În studiu au fost incluși copiii sugari cu boală diareică acută, înrolați în supravegherea santinelă în perioada 2012-2016 și care au fost tratați în Secția de boli diareice acute a Spitalului Clinic Municipal de Copii nr. 1. Au fost examinați 193 de pacienți cu boală diareică acută, conform unui caz-cadru standard. Materialul biologic s-a examinat prin metoda reacției serologice ELISA, iar evidențierea genotipurilor a fost efectuată prin reacția de amplificare genică PCR.

Rezultate. Din cei 193 de sugari cu infecție rotavirală, 121 nu au fost vaccinați contra infecției respective, iar 72 – au fost imunizați. În funcție de genotipurile întâlnite până și după vaccinare, s-a constatat că până la vaccinare au predominat genotipurile G9P[8], G3P[8], G4P[8]. În schimb, postvaccinal au prevalat genotipurile G2P[4], G4P[8], incidența infecției rotavirale fiind în scădere, iar evoluția bolii – mult mai ușoară.

Concluzii. Acest articol reflectă evoluția proprietăților genotipice a rotavirusurilor și a particularităților clinico-paraclinice ale infecției rotavirale la sugari, cu o importanță majoră în contextul implementării imunizării antirotavirale la copii în cadrul Programului Național de Imunizări din Republica Moldova.

Cuvinte cheie: infecție rotavirală, sugari, genotip, vaccin antiretroviral.

Introducere

Sănătatea societății și a viitoarelor generații depinde, într-o mare măsură, de starea de sănătate a nou-născuților și a copiilor; ceea ce, la rândul său, se află într-o strânsă corelație cu o multitudine de factori [1]. Evaluarea îmbolnăvirilor printre copiii primului an de viață marchează o incidență crescută a patologiei bronhopulmonare, fiind urmată de infecțiile tractului gastrointestinal [2]. Implicarea în procesul epidemiologic a copiilor de vârstă fragedă atestă o importanță economică și epidemiologică majoră a infecției rotavirale. Conform datelor OMS, în Europa anual se înregistrează circa 10.027 de cazuri de decese la copiii de până la 5 ani, cauzate de infecția nominalizată. În țările Uniunii Europene (UE), la copiii de până la 5 ani, anual, se înregistrează 2,8 mln de îmbolnăviri prin infecție rotavirală, soldate cu mai mult de 200 de decese, 87.000 de spitalizări.

Problema infecției rotavirale rămâne actuală pe parcursul ultimilor 45 de ani, din momentul descoperirii acestui virus, fiind asociată cu o incidență crescută, în special, printre copiii cu vârsta de până la 5 ani [3]. Fiecare copil poate suporta de la unul până la câteva episoade de boală, caracterizându-se printr-o incidență mare de cazuri grave, cu complicații severe în lipsa terapiei antirotavirale specifice. În infecția rotavirală au loc și afectări extraintestinale, cu implicarea nu doar a mucoasei tractului gastrointestinal, dar și al sistemului respirator, cardiac, reno-urinar, nervos, al ficatului, pancreasului, splinei [4].

Vaccinurile sunt singura strategie de prevenire a infecției

viral infection in infants from 2008 in the Republic of Moldova demonstrated the high rate of this infection (40.0%), being an argument in recommending the antirotaviral immunization in children within the National Immunization Program.

Material and methods. The study enrolled children with acute diarrheal disease, included in the sentinel supervision (2012-2016) and treated in the Unit of acute diarrheal diseases of Clinical Children's Hospital no. 1. Were assessed 193 patients with acute diarrheal disease, according with a standard clinical approach. The biological material was examined by serological enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and genotyping revealed by polymerase chain reaction (PCR).

Results. The rotaviral infection was confirmed in 193 infants, of which 121 children were not vaccinated against rotaviral infection, and 72 were immunized. Depending on the genotypes encountered before and after vaccination, it was found that G9P[8], G3P[8], G4P[8] was detected before vaccination, but post-vaccine prevailed G2P[4], G4P[8], also the incidence of rotaviral infection is decreasing, and the evolution of the disease is much easier.

Conclusions. This article reflects the evolution of the genotypic properties of rotaviruses and the clinical-paraclinical particularities of rotaviral infection in infants, with a major importance in the context of the implementation of antirotaviral immunization in children within the National Immunization Program in the Republic of Moldova.

Key words: diarrhea, rotavirus, children, infants, antirotaviral vaccine.

Introduction

The health of society and future generations is largely dependent on the health of new-borns and children, which is closely correlated with a multitude of factors [1]. The evaluation of the illnesses among the children of the first year of life marks an increased incidence of the bronchopulmonary pathology, being followed by the infections of the gastrointestinal tract [2]. The involvement in the epidemiological process of the young children, attests a major economic and epidemiological importance of the rotaviral infection. According to WHO data, around 10,027 cases of deaths in children up to 5 years old are caused by the rotaviral infection in Europe. In the countries of the European Union (EU), in children up to 5 years old, there are 2.8 million rotaviral infections, resulting in more than 200 deaths, 87,000 hospitalizations.

The problem of rotaviral infection remains current during the last 45 years, since the discovery of this virus has been associated with an increased incidence, especially among children up to 5 years old [3]. Each child can withstand from one to several episodes of the disease, characterized by a high incidence of serious cases, with complications and lack of specific antirotaviral therapy. In the rotaviral infection extra intestinal disorders occur, involving not only the mucosa of the gastrointestinal tract, but also the respiratory, cardiac, reno-urinary system, nervous system, liver, pancreas, spleen [4].

Vaccines are the only public health prevention strategy that can control rotaviral disease. They have been developed

rotavirale. Acestea au fost dezvoltate pentru a imita imunitatea dobândită ca urmare a infecției naturale cu rotavirus, care conferă protecție împotriva gastroenteritei grave și, prin urmare, reduce din riscul spitalizării și decesului [5].

Material și metode

Studiul este de tip prospectiv, descriptiv. Au fost înrolați 193 de copii sugari cu boală diareică acută, incluși în supravegherea santinelă între anii 2012-2016 în Secția de boli diareice acute, Spitalul Clinic Municipal de Copii nr. 1.

Protocolul de cercetare a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (procesul verbal nr. 54 din 13.02.2017, președinte CEC – Viorel Nacu, dr. hab. șt. med., conf. univ.).

Toți pacienții au fost examinați și selectați conform unui caz-cadru standard. Părinții copiilor au dat acord informat în scris pentru înrolarea lor în cercetare.

Criterii de includere în studiu au fost:

- copil sugar (vârsta de 1-12 luni, conform OMS) [6];
- diaree cu minim 3 scaune în ultimele 24 de ore, dar nu mai mult de 7 zile consecutiv;
- pacienți examinați prin reacția serologică ELISA, cu evidențierea prin PCR a genotipurilor rotavirusurilor în primele 24 de ore de la internare.

Criteriile de excludere a pacienților din cercetare au fost:

- pacienți cu comorbidități severe (malformații cardiace, anomalii de dezvoltare a sistemului digestiv, anomalii de dezvoltare a sistemului nervos ș.a.);
- pacienți cu mai puțin de 3 scaune lichide în ultimele 24 de ore.

La copiii incluși în studiu, în momentul examinării clinice, au fost apreciate prezența semnelor de deshidratare. Evaluarea gradului de deshidratare în boala diareică acută, conform OMS, este următoarea: severă – copil letargic, cu ochii înfundați, care nu poate bea sau bea cu dificultate, plica cutanată revine la normal foarte lent (>2 sec); moderată – copil agitat sau irascibil, cu ochii înfundați, care bea cu lăcomie, plica cutanată revine la normal lent (<2 sec) [7].

Materialul biologic al tuturor copiilor incluși în studiu a fost examinat virusologic la infecția rotavirală, cu utilizarea reacției serologice ELISA și cu evidențierea genotipurilor în reacția de polimerizare în lanț (setul *ProSpect ROTAVIRUS Kit*, producător – *Zhejiang Orient Gene Biotech Co. LTD*, China). Acesta este un test imunoenzimatic calitativ pentru detectarea rotavirusului (grupa A) în probele de fecale umane. Testul utilizează un anticorp policlonal pentru detectarea proteinelor specifice grupului, incluzând capsida internă (VP6), prezentă în rotavirusurile din grupa A [8].

De la fiecare pacient, în prima zi de internare în staționar, într-un recipient steril, au fost colectate aproximativ 1,5-2 ml de materii fecale lichide sau 1 g de materii fecale semioformate proaspete, emise spontan, prin folosirea linguriței fixate a containerului. Containerul a fost închis ermetic, etichetat cu date despre pacient și păstrat la temperatura de 2-8°C până la transportare. De asemenea, fiecărui pacient cu rezultat pozitiv la infecția rotavirală, i-a fost stabilit statutul vaccinal fie prin

to imitate immunity as a result of natural rotavirus infection, which provides protection against severe gastroenteritis and therefore reduces the risk of primary care, hospitalization and death [5].

Material and methods

Prospective, descriptive study, included 193 children with acute diarrheal disease, involved in the sentinel surveillance (2012-2016) from the Acute diarrheal diseases unit, Clinical Municipal Children's Hospital no. 1.

The research protocol was approved by the Research Ethics Committee of the *Nicolae Testemitanu* SUMPh from the Republic of Moldova (report no. 54 of 13.02.2017, president of REC – Viorel Nacu, PhD, assoc. prof.).

All patients were selected according to the standard case scenario. The hospitalization rules and the completion of a standardized questionnaire for this study were respected. The parents of the children gave written informed consent for their enrollment in the research.

The criteria for inclusion in the study were:

- age from 1 month to 12 months (according to WHO recommendations) [6];
- diarrhea with at least 3 defecations in the last 24 hours, but not more than 7 days;
- patients examined by serological reaction ELISA with genotypes detected in PCR for rotaviral infection within the first 24 hours after admission;

The criteria for exclusion of patients from research:

- patients with rotaviral infection or severe comorbidities (heart defects, digestive tract development abnormalities, nervous system development abnormalities etc.);
- patients with diarrhea of less than 3 fluid defecations in the last 24 hours.

The presence of signs of dehydration was appreciated in the children included in the study, at the time of the clinical examination. The evaluation of the degree of dehydration in acute diarrheal disease according to the WHO is as follows: severe – lethargic, has closed eyes, cannot drink or drink with difficulty, the skin fold returns to normal very slowly (>2 sec); moderate – agitated or irritable, has eyes closed, drinks with greed, thirst, skin fold returns to normal slowly (<2 sec) [7].

The biological material of all the children included in the study was virologically examined for rotaviral infection, using the ELISA serological reaction and genotyping in the chain polymerization reaction (*ProSpect ROTAVIRUS Kit*, manufacturer – *Zhejiang Orient Gene Biotech Co. LTD*, China). This is a qualitative immunoenzymatic test for the detection of rotavirus (group A) in human faecal samples as an aid in the diagnosis of acute gastroenteritis. The assay uses a polyclonal antibody to detect group-specific proteins, including the main internal capsid protein (VP6), present in group A rotaviruses [8].

About 1.5-2 ml of liquid faeces or 1 g of fresh semi-formed faeces, spontaneously emitted were collected in a sterile recipient from each patient, on the first day of hospitalization. The container was hermetically sealed, labelled with patient data and stored at 2-8°C until transport. Also, for each patient with positive results for rotaviral infection, the status of the vaccine

interogarea reprezentantului legal al copilului, fie prin verificarea carnetului de dezvoltare a copilului și a registrului de vaccinări de la locul de trai.

În funcție de statutul vaccinal, eșantionul de studiu (n=193) a fost divizat în lotul „Copii cu infecție rotavirală nevaccinați” (n=121) și lotul „Copii cu infecție rotavirală vaccinați” (n=72).

Numărul necesar de pacienți s-a calculat în baza următoarelor formule:

$$n = [1 / (1 - f) \times 2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times P(1 - P) / (P_0 - P_1)^2]$$

$$n = [1 / (1 - 0,1) \times 2 (1,96 + 0,84)^2 \times 0,625 \times 0,375 / (0,50 - 0,75)^2] = 65$$

unde:

P_0 – reușita tratamentului la pacienții cu infecție rotavirală nevaccinați (în mediu, 50,0% conform [9]), ($P_0 = 0,50$);

P_1 – reușita așteptată a tratamentului în lotul cu copiii vaccinați ar fi de 75,0% ($P_1 = 0,75$); $P = (P_0 + P_1) / 2 = 0,625$;

Z_{α} – valoare tabelară. Când semnificația statistică este de 95,0%, atunci coeficientul $Z_{\alpha} = 1,96$;

Z_{β} – valoare tabelară. Când puterea statistică a comparației este de 80,0%, atunci coeficientul $Z_{\beta} = 0,84$;

f – proporția subiecților care se așteaptă să abandoneze studiul din motive diferite de efectul investigat: $q = 1 / (1 - f)$, $f = 10,0\%$ (0,1).

Așadar, lotul de cercetare L_1 , care va include nu mai puțin de 65 de pacienți cu infecție rotavirală vaccinați (în continuare, *Lotul vaccinați*) și lotul de control L_0 , care va include nu mai puțin de 65 de pacienți cu infecție rotavirală nevaccinați (în continuare, *Lotul nevaccinați*).

Datele colectate au fost numerizate prin intermediul programului Microsoft Office Excell 2007. Rezultatele obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului SPSS versiunea 22. Pentru compararea diferențelor dintre loturi, a fost calculat intervalul de încredere de 95% (95CI), criteriul (csi-pătrat) χ^2 . Pragul de semnificație a fost considerat obținerea unui $p < 0,05$.

Rezultate

În ambele loturi a prevalat sexul masculin. În lotul copiilor nevaccinați, au predominat cei cu vârsta cuprinsă între 6-12 luni (66,9%), comparativ cu lotul celor vaccinați, unde acest grup de vârstă a constituit 47,2%.

Pacienții incluși în studiu au fost internați în staționar în primele 3 zile de boală. La toți pacienții boala a început acut, cu sindrom de intoxicație (100% din cazuri la copiii nevaccinați, 82% din cazuri – la copiii vaccinați), caracterizat prin alterarea stării generale, scăderea poftei de mâncare și slăbiciune generală.

În Tabelul 1 este vizibilă evoluția mult mai gravă a copiilor nevaccinați, care au suportat infecția rotavirală, comparativ cu cei vaccinați. Astfel, deshidratarea moderată și severă a constituit 53,7% vs. 30,6%, în lotul celor vaccinați. Forma clinică prin care a decurs infecția rotavirală s-a manifestat prin gastroenterocolită în 81% din cazuri la nevaccinați și în 75% – la cei vaccinați.

La copiii nevaccinați, voma a fost prezentă la 80%, febra – la 76,9%, scaune cu incluziuni patologice – la 97,5%, în timp

was established by questioning the caregiver with whom the child was admitted to the hospital, checking the child's development booklet and checking the vaccination register at the residence place.

Depending on the vaccine status, the study sample (n=193) was divided into group “Unvaccinated children with rotaviral infection” (n=121) and group “Vaccinated children with rotaviral infection” (n=72).

Sample size was estimated, using the formula:

$$n = [1 / (1 - f) \times 2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times P(1 - P) / (P_0 - P_1)^2]$$

$$n = [1 / (1 - 0,1) \times 2 (1,96 + 0,84)^2 \times 0,625 \times 0,375 / (0,50 - 0,75)^2] = 65$$

where:

P_0 – according to the bibliographic data [9], the success of the treatment in the unvaccinated patients constitutes on average 50.0% ($P_0 = 0.50$);

P_1 – expected success of treatment in the vaccinated children group will be 75.0% ($P_1 = 0.75$); $P = (P_0 + P_1) / 2 = 0.625$;

Z_{α} – table value. When the statistical significance is 95.0%, then the coefficient $Z_{\alpha} = 1.96$;

Z_{β} – table value. When the statistical power of the comparison is 80.0%, then the coefficient $Z_{\beta} = 0.84$;

f – Proportion of subjects expected to abandon the study for reasons other than the investigated effect $q = 1 / (1 - f)$, $f = 10.0\%$ (0.1).

Therefore, the L_1 research group will include no less than 65 patients vaccinated against rotaviral infection and the L_0 control group will include no less than 65 unvaccinated patients.

The data collected in the study were entered into the electronic table through the Microsoft Office Excel 2007 program. The results were processed using the SPSS version 22 software. For comparing the differences between groups, the 95% confidence interval (95CI), the criterion (csi-square) χ^2 was calculated. Significance threshold was considered $p < 0.05$.

Results

In both groups, male sex prevailed. Depending on age, in the unvaccinated group, children aged 6-12 months predominated in 66.9% cases, compared to the vaccinated group, where this age group constituted only 47.2%.

The patients included in the study were admitted to the hospital during the first 3 days of illness. In all patients, the disease started with acute intoxication syndrome in 100% of the cases in unvaccinated children compared with 82% in the vaccinated children, characterized by alteration of the general condition, decreased appetite and general weakness.

Table 1 shows the much more severe evolution of the unvaccinated children who supported the rotaviral infection, compared with the vaccinated ones, thus the moderate and severe dehydration constituting 53.7% vs. 30.6% in the vaccinated group. The clinical form in which rotaviral infection occurred was manifested by gastro-enterocolitis in 81% of unvaccinated and 75% of those vaccinated.

In unvaccinated children vomiting was present in 80%, fever – in 76.9%, faeces with pathological inclusions – in 97.5%,

Tablelul 1. Manifestările bolii diareice acute.**Table 1.** Manifestations of acute diarrheal disease.

Diagnostic clinic <i>Clinical diagnosis</i>	Nevaccinați <i>Unvaccinated</i> (n=121)	Vaccinați <i>Vaccinated</i> (n=72)	χ^2	p
Gastroenterocolită acută, fără deshidratare <i>Acute gastroenterocolitis, without dehydration</i>	37 (30,6%)	36 (50,0%)	7,186	0,0073
Gastroenterocolită acută, deshidratare moderată <i>Acute gastroenterocolitis, moderate dehydration</i>	56 (46,4%)	17 (23,6%)	9,919	0,0016
Gastroenterocolită acută, deshidratare severă <i>Acute gastroenterocolitis, severe dehydration</i>	5 (4,1%)	1 (1,4%)	1,092	0,2960
Enterocolită acută, fără deshidratare <i>Acute enterocolitis, without dehydration</i>	19 (15,7%)	14 (19,4%)	0,434	0,5100
Enterocolită acută, deshidratare moderată <i>Acute enterocolitis, moderate dehydration</i>	4 (3,3%)	4 (5,6%)	0,596	0,4401

Notă: test statistic aplicat: χ^2 .

Note: statistical test applied: χ^2 .

Tablelul 2. Simptomele clinice ale infecției rotavirale.**Table 2.** Clinical symptoms of rotaviral infection.

Simptom <i>Symptom</i>	Nevaccinați <i>Unvaccinated</i> (n=121)	Vaccinați <i>Vaccinated</i> (n=72)	χ^2	p
Vomă <i>Vomiting</i>	98 (80,0%)	50 (69,4%)	1,821	0,0686
Febră <i>Fever</i>	93 (76,9%)	54 (75%)	0,293	0,7694
Scaune lichide <i>Liquid feces</i>	121 (100%)	72 (100%)	1,245	0,2133
Scaune cu mucus <i>Feces with mucus</i>	115 (95,0%)	60 (83,3%)	2,561	0,0104
Scaune cu spumă <i>Feces with foam</i>	3 (2,5%)	0	0,957	0,3383

Notă: test statistic aplicat: χ^2 .

Note: statistical test applied: χ^2 .

Tablelul 3. Structura comorbidităților în loturile de studiu la copiii cu boala diareică acută de etiologie rotavirală.**Table 3.** Structure of comorbidities in study groups in children with acute diarrheal disease of rotaviral etiology.

Entitate nosologică <i>Nozological entity</i>	Nevaccinați <i>Unvaccinated</i> (n=121)	Vaccinați <i>Vaccinated</i> (n=72)	χ^2	p
Sistemul respirator (bronșite, pneumonii) <i>Respiratory system (bronchitis, pneumonia)</i>	74 (61,1%)	38 (52,7%)	1,300	0,2541
Sistemul gastrointestinal <i>The gastrointestinal system</i>	70 (57,8%)	27 (37,5%)	7,402	0,0065
Sistemul nervos (EPHI, ETI) <i>The nervous system (HIPE, TIE)</i>	48 (40,0%)	6 (8,3%)	22,299	0,0001
Sistemul reno-urinar (ITU) <i>The reno-urinary system (UTI)</i>	27 (22,3%)	10 (13,8%)	2,097	0,1476
Sistemul hematopoietic (anemie) <i>Hematopoietic system (anemia)</i>	27 (22,3%)	12 (16,6%)	0,906	0,3412
Dermatită alergică <i>Allergic dermatitis</i>	9 (7,4%)	6 (8,3%)	0,051	0,8214
Malnutriție <i>Malnutrition</i>	7 (5,7%)	2 (2,8%)	0,857	0,3545
Patologii ORL <i>ENT diseases</i>	11 (9%)	1 (1,4%)	4,484	0,0342

Notă: test statistic aplicat: χ^2 . EPHI – encefalopatie perinatală hipoxico-ischemică; ETI – encefalopatie toxico-infecțioasă; ITU – infecții ale tractului urinar.

Note: statistical test applied: χ^2 . HIPE – hypoxic-ischemic perinatal encephalopathy; TIE – toxic-infectious encephalopathy; UTI – urinary tract infections.

ce la copiii vaccinați aceste simptome au fost întâlnite mai rar (Tabelul 2).

În Tabelul 3 este redată frecvența comorbidităților infecției rotavirale. Se observă o predominare a patologiilor sistemul respirator (bronșite, pneumonii), cu o incidență de 61,1%, fiind urmat de patologii ale sistemului gastrointestinal (57,8%). Locul trei revenind patologiilor sistemul nervos (encefalopatie perinatală hipoxico-ischemică, encefalopatie toxico-infecțioasă).

Durata medie de spitalizare în grupul copiilor nevaccinați a constituit 6,7 zile, în timp ce la copiii vaccinați aceasta a fost de 6 zile.

Etiologia rotavirală a bolii diareice acute a fost confirmată la toți pacienții incluși în studiu. În 73,6% dintre cazurile bolii diareice acute de etiologie virală s-a asociat și flora bacteriană, mai semnificativ la copiii nevaccinați. Astfel, în lotul nevaccinat, au predominat *Klebsiella pneumoniae* și *Proteus mirabilis* cu 5%, dublu față de lotul vaccinat, fiind urmate de *Staphylococcus aureus* și *Citrobacter freundii*, cu o rată de 4%, În 2,5% s-au depistat *Escherichia coli atipică h+* și *Klebsiella oxytoca* (Tabelul 4).

whereas in vaccinated children these symptoms were less frequent (Table 2).

Table 3 shows the frequency of comorbidities that occurred concurrently with rotaviral infection. There is a predominance of pathologies of the respiratory system (bronchitis, pneumonia) with an incidence of 61.1%, followed by pathologies of the gastrointestinal system with 57.8%, the third place being the pathologies of the nervous system (perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy, toxic-infectious encephalopathy).

Thus, the average length of hospitalization in the group of unvaccinated children was 6.7 days, while in the vaccinated children the average duration was 6 days.

The rotaviral etiology of acute diarrheal disease was confirmed in all patients included in the study. In 73.6% of cases of acute diarrheal disease of viral etiology, bacterial flora was associated, more significantly in unvaccinated children. Thus, in the unvaccinated group, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* predominated with 5%, double compared with the vaccinated group, followed by *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter freundii* at a rate of 4%. In 2.5% atypical *h+* *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* were detected. The etiological structure of rotaviral infection is shown in Table 4.

Tabelul 4. Suprainfecția bacteriană a copiilor afectați de infecție rotavirală.

Table 4. Bacterial overinfection of children affected by rotaviral infection.

Infecție Infection	Nevaccinați Unvaccinated (n=121)	Vaccinați Vaccinated (n=72)	χ^2	p
Mono-infecție rotavirală Rotaviral mono-infection	84 (69,4%)	53 (73,6%)	0,620	0,5354
Asociere bacteriană (total) Bacterial association (total)	37 (30,6%)	19 (26,4%)	0,620	0,5354
▪ <i>Staphylococcus aureus</i>	13,5%	21%	0,515	0,4730
▪ <i>Staphylococcus aureus</i> asociat cu alte bacterii gram (+) / associated with other gram (+) bacteria	13,5%	21%	0,515	0,4730
▪ <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	24,3%	16%	0,504	0,4780
▪ <i>Klebsiella</i> asociată cu alte bacterii gram (+) / associated with other gram (+) bacteria	2,7%	0%	0,467	0,4944
▪ <i>Escherichia coli</i>	8,1%	21%	1,879	0,1705
▪ <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	19%	10,5%	0,659	0,4169
▪ Alți agenți patogeni / other pathogens (<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	19%	10,5%	0,659	0,4169

Notă: test statistic aplicat: χ^2 .

Note: statistical test applied: χ^2 .

În studiul efectuat, acetonuria s-a constatat la 47 de copii nevaccinați vs. 20 de copii vaccinați. Astfel, corpi cetonici în urină în cantitate marcată (≥ 150 mg/dl) s-au depistat la 21,3% din cazuri în grupul celor nevaccinați, comparativ cu 5% la copiii din lotul vaccinat.

La pacienții cu infecție rotavirală, în perioada prevaccinală, cele mai frecvent întâlnite genotipuri au fost G4P[8], G3P[8] și G9P[8]. În perioada postvaccinală, pe primul loc s-au situat genotipurile G2P[4] și G4P[8]. Frecvența genotipurilor identificate la pacienții cu infecție rotavirală până și după vaccinare este prezentată în Tabelul 5.

In the performed study, acetonuria was found in 47 unvaccinated children vs. 20 vaccinated children. Thus, ketone bodies in the urine in marked quantity (≥ 150 mg/dl) were found in 21.3% of the cases in the unvaccinated group, compared with 5% in the children from the vaccinated group.

Of the total number of genotypes samples, the incidence of genotypes identified in patients with rotaviral infection during the prevaccinal period, the most commonly encountered genotypes were G4P[8], G3P[8] and G9P[8]. In the post-vaccine period, their frequency decreased in the first place, being the genotypes G2P[4] and G4P[8]. The incidence of genotypes identified in patients with rotaviral infection up to and after vaccination is shown in Table 5.

Tablelul 5. Genotipurile identificate la pacienții cu infecție rotavirală până și după vaccinare.
Table 5. Identified rotaviral infection genotypes in patients before and after vaccination.

Genotip <i>Genotype</i>	Nevaccinați <i>Unvaccinated</i> (n=121)	Vaccinați <i>Vaccinated</i> (n=72)	χ^2	p
G1P[8]	1 (1,7%)	4 (7,7%)	2,228	0,1356
G2P[4]	1 (1,7%)	14 (27%)	14,525	0,0001
G2P[6]	0	1 (1,9%)	0,919	0,3377
G3P[8]	9 (15,7%)	3 (5,7%)	2,768	0,0962
G3+G4P[8]	1 (1,7%)	0	0,743	0,3886
G4P[8]	34 (59,5%)	25 (48%)	1,435	0,2310
G9P[8]	11 (19,7%)	5 (9,7%)	2,121	0,1453

Notă: test statistic aplicat: χ^2 .

Note: statistical test applied: χ^2 .

Discuții

Rotavirusul este unul dintre cei mai importanți agenți cauzali ai bolii diareice acute deshidratante și este implicat în 12,0-71,0% din cazurile de gastroenterită acută spitalizate. În țările dezvoltate, rotavirusurile cauzează de la 1/3 până la 1/2 din toate diareile grave. Astfel, în SUA anual se înregistrează circa 3 mln cazuri de infecție rotavirală (IRV), ceea ce determină 67 mii de spitalizări (250 mii zile-pat) și mai mult de 100 cazuri de deces [10].

În 2006, au fost elaborate și autorizate două vaccinuri vii atenuate: *Rotarix*[®] și *RotaTeq*[®]. *Rotarix*[®] este un vaccin monovalent, derivat dintr-un izolat uman G1P[8]. *RotaTeq*[®] este pentavalent, constând dintr-un amestec de mono-reasortanți, rotaviruși umani-bovinici, care transportă genele care codifică proteinele G1, G2, G3, G4 și P[8] umane într-un fond genetic al rotavirusului bovin Wi79 (G6P[5]). Ambele vaccinuri s-au dovedit a fi foarte eficiente în studiile clinice și au fost incluse în schema națională obligatorie a vaccinării copiilor în peste 100 de țări, începând cu anul 2006. Studiile post-marketing au arătat că ambele vaccinuri sunt foarte eficiente la nivel de populație.

Moldova a fost prima țară din Regiunea Europeană a OMS care a introdus vaccinarea cu rotavirus în programul de imunizare de rutină al copiilor. În vaccinul utilizat în Moldova, sunt prezente genotipurile G4, G2 și G9, care acoperă o bună parte de tulpini ale rotavirusurilor circulante în populația din țară, conform datelor monitorizării și supravegherii santinelă la copii până la vârsta de 5 ani.

Conform datelor noastre, acesta este primul studiu al pacienților cu infecție rotavirală până și după vaccinare în Republica Moldova și care a analizat potențialul profilactic al vaccinului antirotaviral în țară. Cu toate că vaccinurile au fost foarte eficiente în țările cu venituri mari, ele s-au dovedit a fi mult mai puțin eficiente în țările cu venituri mici și mijlocii. Boala asociată cu rotavirus a fost cauza morții la peste 200.000 de copii cu vârste mai mici de 5 ani în întreaga lume în 2013.

Discussion

Rotavirus is one of the most important causative agents of acute dehydrating diarrheal disease and is involved in 12.0-71.0% of acute hospitalized gastroenteritis cases. In developed countries rotaviruses cause from 1/3 to 1/2 of all serious diarrhea. Thus, about 3 million cases of rotaviral infection (RVI) are registered annually in the USA, which causes 67 thousand hospitalizations (250 thousand day/bed) and more than 100 cases of deaths [10].

In 2006, two live attenuated vaccines were developed and authorized: *Rotarix*[®] and *RotaTeq*[®]. *Rotarix* is a monovalent vaccine derived from a human G1P isolate [8]. *RotaTeq*[®] is a pentavalent, consisting of a mixture of mono-reassortants human bovine rotavirus, which transports genes encoding human G1, G2, G3, G4 and P[8] proteins into a genetic background of Wi79 bovine rotavirus (G6P[5]). Both vaccines have proven to be very effective in clinical trials and have been included in the mandatory national vaccination scheme for children in over 100 countries since 2006. Post-marketing studies have shown that both vaccines are highly effective at the population level.

Moldova was the first country in the WHO European Region to introduce rotavirus vaccination into the routine immunization program for children. In the vaccine used in Moldova are present the genotypes G4, G2, G9 that cover most strains of circulating rotaviruses in the population of the country according to the monitoring and sentinel surveillance data in children up to the age of 5 years.

According to our data, this is the first research study of patients with rotaviral infection even after vaccination in the Republic of Moldova and who analyzed the prophylactic potential of the antirotaviral vaccine in our country. Given that vaccines have been very effective in high-income countries, they have proven to be considerably less powerful in low- and middle-income countries. The disease associated with rotavirus was the cause of death in more than 200,000 children aged <5 years worldwide in 2013.

Ulrich Desselberger a stabilit faptul că eficacitatea vaccinului a fost ridicată în țările cu venituri mari, cu rate de protecție împotriva bolii RV severe la 80-90%, pe când în țările cu venituri mici și medii, aceasta a fost cu 30-50% mai mică. Au fost analizați diferiți factori, cu implicare potențială în reducerea eficienței vaccinării: malnutriția, starea microbiotei intestinale, administrarea vitaminei D3, co-infecțiile, imaturitatea sistemului imun la sugari și factorul genetic [11].

Raúl F. Velázquez a efectuat o meta-analiză referitoare la eficiența vaccinului, în care a demonstrat o scădere a spitalizărilor și a adresărilor la departamentul de urgență a copiilor cu infecție rotavirală [12].

Un alt studiu, efectuat în România de către Victoria Bîrluțiu și Rareș Mircea Bîrluțiu în perioada 1 ianuarie 2011 – 31 decembrie 2012, a avut drept scop urmărirea sezonității bolii, aspectele clinice, elementele de gravitate ale bolii, examinările de laborator, necesitatea reechilibrării parenterale, costurile spitalizării. Lotul de studiu a constituit 236 de copii cu infecție rotavirală, cu vârsta cuprinsă între 0 și 16 ani, monitorizați de serviciile de boli infecțioase la copii din or. Sibiu. Astfel, au fost diagnosticate 114 cazuri în 2011 și 122 – în 2012, mai frecvent, în lunile reci. Raportul pe sexe (M/F) a fost de 1,42:1 în 2011 și de 1,18:1 în 2012. Grupul de vârstă de 1-3 ani a constituit 58,90%. O evoluție medie spre severă a bolii au prezentat 91 (79,82%) din copii în anul 2011 și 112 (91,80%) – în 2012. Câte 15 copii au prezentat manifestări neurologice și insuficiență renală acută. Debutul sever al maladiei a condus la spitalizare în primele 24 de ore în 41,23% din cazuri în 2011 și în 51,64% din cazuri în 2012. O diaree cu o durată de peste 6 zile a fost documentată în 62 (54,39%) de cazuri în 2011 și în 75 (61,48%) de cazuri în 2012. Cazurile cu deshidratare severă au fost întâlnite la copiii cu vârsta cuprinsă între 1-12 luni și au fost asociate cu trombocitopenie, leucopenie, creșterea PCR (probabilitate 0,42), dezechilibre hidro-electrolitice cu semne de encefalopatie. Studiul respectiv evidențiază asocieră frecventă a hiponatremiei (<130 mEq/l) cu gastroenterită rotavirală (83 de cazuri în 2011 și 51 de cazuri în 2012). În acest context, este de menționat faptul că vaccinul rotaviral în România nu a fost inclus în Programul Național de Imunizare [13].

Studiul efectuat de către Stela Gheorghită a obținut rezultate ce indică un impact favorabil al programului de vaccinare asupra bolii rotavirale la copiii din Chișinău, Moldova. Vaccinarea contra rotavirusului cu 2 doze a redus spitalizarea cu 79% și evoluția severă a bolii cu 82%. În ansamblu, spitalizările cu rotavirus au scăzut cu două treimi până în al doilea an al programului, într-un model compatibil cu impactul vaccinului. Scăderea cea mai mare a ratei de spitalizare a fost observată în rândul copiilor mai mici de 1 an în primul an după implementarea vaccinării, și a celor mai mici de 2 ani – în al doilea an după punerea în aplicare a vaccinului. În plus, au existat scăderi clare a numărului de spitalizări cu rotavirus pentru toți copiii mai mici de 5 ani, incluzând și cohortele nevaccinate, fapt care indică la o protecție indirectă, care rezultă din imunizarea copiilor [1].

Eficacitatea vaccinării cu 2 doze în Moldova, în special, împotriva cazurilor severe, atinge 84% (95CI: 65% – 93%). Pro-

According to a study realised by Ulrich Desselberger, it was established that while vaccine effectiveness was high in high-income countries, with severe rotavirus disease protection rates at 80-90%, in low- and middle-income countries it was by 30-50% lower. Different factors were analyzed here that were identified or suggested to be involved in the differences in efficacy of the rotaviral vaccine, including malnutrition, intestinal microbiota status, vitamin D3 administration, co-infections, immunity of the infant immune system and genetic factor [11].

Raúl F. Velázquez performed a systematic review and meta-analysis to describe, compare and synthesize the effectiveness of the vaccine, from randomized clinical trials prior to authorization, finding a decrease in hospitalizations and addresses to the children's emergency department. with rotaviral infection [12].

Another study carried out in the neighboring country Romania (2014) by Victoria Birlutiu and Rares Mircea Birlutiu between January 1, 2011 – December 31, 2012, aimed at tracking the seasonality of the disease, the clinical aspects, the severity of the disease, the laboratory examinations, the need for parenteral rebalancing, the costs of hospitalization. The study group consisted of 236 children (2011 – 114 cases, 2012 – 122 cases) between 0 and 16 years old with rotaviral infection in the infectious diseases services in children in Sibiu. Thus, 114 cases were diagnosed in 2011, respectively 122 in 2012, more frequently in the cold months, more frequently in the male gender, sex ratio M/F 1.42:1 in 2011, 1.18:1 in 2012, in the group aged 1-3 years – 58.90%. 91 cases in 2011 – 79.82%, respectively 112 cases in 2012 – 91.80% with an average / severe score. Fifteen cases showed neurological manifestations, 15 cases acute renal failure. Severe onset cases led to hospitalization in the first 24 hours: 41.23% of cases in 2011 and 51.64% in 2012, prolonged with diarrhea over 6 days-it was established in 62 cases (54.39%) in 2011 and 75 cases (61.48%) in 2012. Cases with severe dehydration were found in children aged 1 to 12 months, being associated with thrombocytopenia, leukopenia, PCR increase (probability 0.42), hydro-electrolyte imbalances associated with signs of encephalopathy. This study highlights the frequent association of hyponatremia (<130 mEq/l) from electrolyte imbalance with rotavirus gastroenteritis, 83 cases in 2011 and 51 cases in 2012. In this context it is worth mentioning that in Romania the rotaviral vaccine was not included in National Immunization Program [13].

The study performed by Stela Gheorghita obtained results that indicate a favorable impact of the vaccination program on rotaviral disease in children from Chisinau, Moldova. Two-dose rotavirus vaccination reduced hospitalization by 79%, and severe disease progression was reduced by 82%. Overall, hospitalizations with rotavirus decreased by two-thirds until the second year of the program, in a model compatible with the impact of the vaccine. The decrease was the largest of the vaccinated cohorts children <1 year in the first year and <2 years in the second year after vaccine implementation. In addition, there were clear decreases in the number of rotavirus hospitalizations for all children <5 years old, including unvac-

porția este, în mare măsură, compatibilă cu estimările privind eficacitatea vaccinurilor (VE) din alte țări cu mortalitate scăzută (straturile de mortalitate A și B ale OMS). VE este de 85% (95CI: 80% – 88%), estimată pe baza analizei globale a 8 studii, care au inclus, în total, peste 32.000 de participanți [14].

Concluzii

Morbiditatea prin infecția rotavirală (IRV) a scăzut considerabil ca urmare a implementării vaccinului rotaviral. Sezonalitatea infecției în perioada rece a anului, cu afectarea crescută a sugarului după 6 luni, este păstrată.

Evoluția clinică a infecției rotavirale a fost mai ușoară la sugarii vaccinați vs. cei nevaccinați. În rezultatul vaccinării conform Programului Național de Imunizări, s-au modificat tulpinile rotavirale circulante în țară. Rezultatele studiului au reconfirmat necesitatea implementării vaccinului Rotarix®, ce conține genotipurile G4, G2, G9 prin programul Național de Imunizări (anul 2012), pentru reducerea poverii infecției rotavirale asupra sistemului de sănătate din Republica Moldova.

Declarația conflictului de interese

Nimic de declarat.

Contribuția autorilor

Proiectarea studiului (AD, NR, IM, VT), acumularea materialelor clinice (AD, TA, CS, SG), interpretarea datelor și analiza statistică (AD, TA), prepararea manuscrisului (SG, AMI, RC). Versiunea finală a manuscrisului a fost citită și aprobată de toți autorii.

Referințe / references

1. Gheorghita S., Birca L., Donos A. *et al.* Impact of rotavirus vaccine introduction and vaccine effectiveness in the Republic of Moldova. *Clinical Infectious Diseases*, 2016; 62 (suppl. 2): S140.
2. Denisyuk N. Genetic characteristics of rotaviruses of group A circulating in the Orenburg region during the 2016-2017 season. *Infections in Infants*, 2017; 16 (4).
3. WHO. Diarrhea (Newsletter). April, 2017.
4. Uciaikin V., Novokshonov A. Antiinflammatory therapy in complex therapies for the treatment of viral infections and viral-bacterial infections. *Infections in Infants*, 2012; Special Issue.
5. Grimwood K., Lambert S., Milne R. Rotavirus infections and vaccines: burden of illness and potential impact of vaccination. *Rotavirus Infections and Vaccines*, 2010; 12 (4): 235-256.
6. WHO. Early child development, 2013.
7. WHO Vaccine-Preventable Diseases Surveillance Standards, September 5, 2018.
8. Remel Diagnostic Tests, Thermo Scientific Oxoid Microbiology Products, 2019.
9. Dozornii epidnadzor za rotavirusnoi infectsiei v Respublike Moldova (iuni 2008 – avgust 2015) Natsionalinii Tsentri Obshestvenno Zdorovia 6-oe soveshchaniye Evropeiskovo reghionalinovo biuro VOZ po dozornomu epidnadzoru za rotavirusnoi infectsiei.

inated cohorts, suggesting indirect protection resulting from immunization of children [1].

Estimation of the efficacy of 2-dose vaccination in Moldova, especially against severe cases at 84% (95CI: 65% to 93%), is largely compatible with the estimates of vaccine effectiveness in other countries with low mortality (in the mortality layers A and B of WHO) VE is 85% (95CI: 80% to 88%) based on the overall analysis of 8 studies, including >32,000 participants [14].

Conclusions

The morbidity due to the rotaviral infection (RVI) decreased considerably as a result of the implementation of the rotaviral vaccine, keeping the seasonality of the infection in the cold period of the year with the increased affect in the infant after 6 months.

Clinical progression of rotaviral infection was easier in vaccinated vs. unvaccinated infants. As a result of the vaccination according to the National Immunization Program, the rotaviral strains circulating in the country have changed. The results of the study reconfirmed the need to implement the Rotarix® vaccine containing G4, G2, G9 genotypes through the National Immunization Program (y. 2012) in order to reduce the burden of rotaviral infection on the health system in the Republic of Moldova.

Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

Authors` contribution

Study design (AD, NR, IM, VT), accumulation of clinical materials (AD, TA, CS, SG), data interpretation and statistical analysis (AD, TA), preparation of the manuscript (SG, AMI, RC). The final version of the manuscript was read and approved by all authors.

10. Birca L., Spînu C., Rusu G. *et al.* Infecția rotavirală – particularități clinico-epidemiologice și opțiuni de profilaxie. *Anale Științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”*, 2008; 3(9): 324-328.
11. Desselberger U. Differences of rotavirus vaccine effectiveness by country: likely causes and contributing factors. *Pathogens*, 2017; 6 (4): 65.
12. Velázquez R., Linhares A., Muñoz S., Seron P., Lorca P. Efficacy, safety and effectiveness of licensed rotavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis for Latin America and the Caribbean. *BMC Pediatrics*, 2017; 17: 14.
13. Bîrluțiu V., Bîrluțiu R. Underevaluated rotavirus infection in Romania: prospective clinical and epidemiological study, therapeutic and economic implications. *Acta Medica Transilvanica*, 2014; 19 (1): 154-156.
14. Soares-Weiser K., Maclehose H., Bergman H. *et al.* Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012; 11.