

Molekulárněbiologické a epidemiologické charakteristiky viru planých neštovic (VZV)

Bošτίková Vanda¹, Chlíbek Roman¹, Salavec Miloslav², Smetana Jan¹, Sleha Radek¹, Šplíno Miroslav¹, Bošτίk Pavel^{3,4}

¹Katedra epidemiologie, FVZ UO, Hradec Králové

²Klinika nemocí kožních a pohlavních, FN a LF UK, Hradec Králové

³Klinika infekčních nemocí, FN a LF UK, Hradec Králové

⁴Centrum pokročilých studií, FVZ UO, Hradec Králové

SOUHRN

Genetická diverzita a epidemiologie infekce VZV jsou ovlivňovány místem výskytu onemocnění, charakterem klimatu v dané lokalitě a populačními faktory v oblasti.

Studium genetické diverzity VZV pak může mít přímé implikace jak v epidemiologické a evoluční analýze, tak

i v možném definování genetických korelátů virové patogenicity či rezistence k antivirotikům.

KLÍČOVÁ SLOVA

epidemiologie – herpes zoster – molekulární genetik – varicella-zoster virus

SUMMARY

Bošτίková Vanda, Chlíbek Roman, Salavec Miloslav, Smetana Jan, Sleha Radek, Šplíno Miroslav, Bošτίk Pavel: Molecular biological and epidemiological characteristics of the varicella-zoster virus (VZV)

The genetic diversity and epidemiology of VZV results from an interplay of the geographic area, climate conditions, and population factors.

Studies of the genetic diversity of VZV can have direct implications for both the epidemiological and

evolutionary analyses and identification of the genetic correlates of VZV pathogenicity or resistance to antiviral drugs.

KEYWORDS

epidemiology – herpes zoster – molecular genetics – varicella-zoster virus

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 62, 2013, č. 3, s. 148–152

ÚVOD

Termín „herpes“, odvozený od řeckého slova označujícího plazení, použil poprvé Hippokrates. Římský lékař Plinius Starší pak odlišil jednotlivé druhy oparů, popsal jejich projevy a navrhl léčbu pomocí rostliny aloe vera. Přízvisko „pásový“ použil poprvé o století později římský lékař Celsus. Pravděpodobně se inspiroval charakteristickým

výsevem puchýřků v okolí průběhu nervu připomínajícího opasek.

Varicella-zoster virus (VZV), spolu s herpes simplex virem jedna (HSV-1) a herpes simplex virem dva (HSV-2) patří do skupiny α -herpesvirů, tj. vysoce nakažlivých, neurotrovních virů, které nemají jiného než lidského hostitele. Člověk je pak zároveň i jejich jediným rezervoárem. Je pro ně typická

schopnost latentně infikovat hostitelské buňky a krátký replikační cyklus. VZV v raném věku vyvolává relativně benigní onemocnění plané neštovice (varicella), ale virus usazený v klidovém stadiu ve spinálních gangliích se může vlivem různých faktorů v pozdějším věku reaktivovat a vyvolat pásový opar nebo-li herpes zoster. VZV může být, jako jediný ze zástupců α -herpesvirů, přenášen aerosolovými kapénkami a podobně jako herpes simplex virus může vyvolat pneumonii či keratitidu, stejně jako závažné neurologické komplikace [1, 2].

Většina těchto onemocnění začala být dávana do souvislosti s VZV až s rozvojem molekulárněgenetických metod, které jsou schopny odhalit přítomnost VZV DNA v klinických vzorcích. Díky tomu je v současnosti možné využívat těchto metod pro správnou diagnostiku a rychlé cílené nasazení virostatické léčby, pokud je třeba. Zároveň nám tyto analýzy přinášejí informace a formují naše představy o kmenovém rozlišení VZV.

Struktura VZV DNA je podobně jako u dalších α -herpesvirů tvořena unikátními dlouhými oblastmi UL a unikátními krátkými segmenty Us, z nichž každá je obklopena obrácenými repetitivními sekvencemi DNA. Vzhledem k přítomnosti těchto repetitivních oblastí se unikátní oblasti genomu rearanžují během replikace a vytvářejí mix čtyř izomer s různě orientovanými UL a Us segmenty. Repetitivní oblasti jsou vysoce variabilní a dosahují maximální délky 10 kbp.

DNA herpetických virů se vyznačuje nízkým výskytem spontánních bodových mutací. Díky tomu je základním mechanismem ovlivňujícím vznik nových virových kmenů v průběhu evoluce rekombinace. Právě rekombinace umožňuje herpetickým virům získat pro ně "výhodné" mutace z rodičovských genomů, a tím funkčně profitovat - lépe než z obměny jednotlivých genomů v rámci nukleotidové substituce.

Genetická rekombinace je obecně vzato molekulárním procesem, v rámci něhož se přeskupuje genetický materiál, a vytváří se tak nové kombinace a varianty genů. Probíhá v buňkách během jejich replikace. V konkrétním případě virů, je rekombinace jevem, který nastane v případě, že dva viry infikují tu samou buňku. Virové potomstvo pak obsahuje genetickou informaci obou rodičovských kmenů. Známe čtyři základní typy rekombinačních mechanismů: homologní rekombinace, místně specifické rekombinace, transpozice a nehomologní rekombinace [3].

V průběhu homologní rekombinace dochází k rozlomení homologních úseků DNA, které se přestaví a zpětně spojí. Tím pádem se tedy vymění homologní úseky DNA mezi sebou.

Místně specifická rekombinace probíhá na krátkých specifických nukleotidových sekvencích

(nemusejí být homologní), které jsou rozpoznány místně specifickými rekombinačními enzymy. Na tomto principu funguje integrace virového genomu do napadené hostitelské buňky.

Transpozice neboli přemístění se děje ve specifických DNA sekvencích rozeznávaných přes transpozon-kódované proteiny.

Nehomologní neboli ilegální rekombinace probíhá bez přítomnosti homologních sekvencí či specificky identifikovaných sekvencí.

U herpetických virů byly dosud popsány homologní a nehomologní rekombinací mechanismy [3, 4].

Dosud byly detekovány a popsány rekombinace mezi různými kmeny VZV pěstovanými v tkáňových kulturách. Zrovna tak byly na základě analýz jednotlivých nukleotidových bází analyzovány a detekovány rekombinanty v několika klinických izolátech VZV. Norberg et al. [4, 5] studovali celou skupinu lidských herpetických virů a našli rekombinantu u klinických izolátů HSV-1 ve Švédsku. V současnosti se množí práce popisující nálezy rekombinantu u klinických izolátů HHV-8, CMV a EBV [4].

Právě rekombinace pravděpodobně zásadně ovlivňuje hladinu virulence VZV, HSV-1 a HSV-2. I to je důvodem, proč je třeba neustále sledovat a kontrolovat antivirovou terapii, a být opatrní při vývoji a používání živých atenuovaných a na vektorech založených vakcín.

Morfologie VZV z hlediska molekulární biologie, funkce genových produktů.

Molekulární hmotnost VZV se udává 100 x 106 Da, velikost virionu se pohybuje mezi 150-200 nm. Dvoušroubovicová lineární DNA (umístěná v jádře) se skládá z 124 884 bazických párů (referenční kmen VZV Dumas, X043870.1, GI:59989) obklopených nukleokapsidou (o průměru 100 nm) vytvořenou ze 162 hexagonálních kapsomer. Kapsida je obklopena tegumentem a chráněna lipidovým obalem (lipid envelope) [6].

Hlavní funkcí glykoproteinů obsažených v obalu viru je umožnit zachycení a vstup viru do hostitelské buňky. Dosud známé glykoproteiny jsou gB, gE, gH, gI, gC a gL. Víme, že gB je nutný pro zajištění infekčnosti VZV. gH hraje roli při vstupu viru do hostitelské buňky, stejně jako gC. gE se chová jako receptor pro fragment imunoglobulinu, napomáhá blokovat hostitelské protilátky, zároveň interaguje s mannosu-6-fosfátovými receptory na buňkách, což iniciuje infekční proces. Dalším velmi důležitým genovým produktem je bezprostředně časný protein IE 62, obsažený v tegumentu virových částic a v jádře infikované buňky, který je zodpovědný za zahájení replikace virové DNA. V tegumentu byly kromě IE 62 lokalizovány také IE 4, IE 10, IE 47, IE 62 a IE 63.

Virová kapsida je vytvořena z produktů ORF (open reading frame) 20, 23, 33, 33.5, 40 a 41.

Celá sekvence VZV DNA byla poprvé přečtena a zveřejněna v roce 1986 Davidsonem a Scottem [7]. Stabilita VZV genomu je extrémně vysoká [9–11]. V rámci celého VZV genomu je popsáno pouhých 0,1% změn, projevujících se záměnou jednotlivých nukleotidových bází (SNP-single nucleotide polymorphism) [9]. Pro srovnání, diverzita genomu HSV-1 je oproti VZV genomu 6krát vyšší [7, 8].

Celkem 46,02% lineární VZV DNA pak tvoří bazické páry G + C [22]. Do současnosti se podařilo funkčně analyzovat méně než 20% VZV genomu. Snahy o globální funkční analýzy zesilují, za účelem odhalení funkcí jednotlivých genů v procesu virové replikace. Používá se např. kosmidový model VZV nebo model imunodeficientní myši s lidskými kožními štěpy. Nicméně stále je většina ORF nevyšetřena a jejich role zůstává nejasná. Množství informací o VZV ORF je odvozováno od informací získaných na HSV-1 modelu díky vysoké genomové homologii mezi oběma herpetickými viry. Dalším možným modelem by byla konstrukce rekombinantních VZV virů laboratoři, ale to se zatím nepodařilo. Novým přístupem je metoda klonování VZV genomu do bakteriálního umělého chromozomu, který nese jednak zelený fluorescenční protein, jednak luciferázový reporter gen. PCR mutagenese umožňuje delecii jednotlivých VZV ORF. Takto konstruované mutanty se vsadí do homologního rekombinantního systému *E. coli* a infikují se jimi tkáňové kultury. Tento systém umožňuje studium virové replikace, na jehož principu byly získány seznamy VZV ORF, které jsou a nebo nejsou esenciální pro replikaci viru (esenciální-ORF 6, 21, 22, 37, 38, 59, 51, 54, 62 a 63) [11].

Virus VZV se replikuje v jádře a dozrává v cytoplasmě. Studium těchto mechanismů, faktorů ovlivňujících infekčnost a patogenicitu viru a genové exprese stále pokračuje. Je ztěžováno tím, že VZV se in vitro neuvolňuje z infikovaných hostitelských buněk.

METODY GENETICKÉ ANALÝZY PRO ROZLIŠENÍ JEDNOTLIVÝCH VZV KMENŮ

Metody jsou založeny na analýze SNP v jednotlivých ORF VZV oblastech, vztahené vůči referenčním kmenům VZV. Nejprve je nutné izolovat virovou DNA z klinických vzorků, často se jedná o stěry vezikulárních lézí. Pro tyto metody není třeba velkého množství materiálu, takže není nutné se snažit získat a udržet živý VZV virus pomnožováním na tkáňových kulturách. Navíc zmiňované metody nejsou časově náročné (v porovnání s tkáňovými kulturami).

Odlišení vakcinačních kmenů od divokých kmenů VZV se děje primárně na základě analýzy virového genomu v oblastech ORF 38, 54 a 62 [7]. K detekci jsou používány real-time PCR, využívající vysoce specifické hybridizační fluorescenční sondy FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) [10]. Přítomnost či nepřítomnost příslušných markrů z výše jmenovaných ORF oblastí pak určí daný virový kmen [7, 11]. SNP lokalizované v ORF 38 jsou přítomny ve většině divokých kmenů VZV a SNP v ORF 54 jsou typicky přítomny v sekvencích Oka vakcinačních kmenů [11].

Na základě této prvotní analýzy se izoláty podrobují genotypizační analýze pomocí sekvenačního čtení krátkých úseků DNA, které obsahují úseky virového genomu, ve kterých dochází k charakteristickým SNP změnám, především ORF 22 [9].

V případě nálezu evropského kmene E se provádí další sekvenace pro oblast ORF 21 a ORF 50. SNP v těchto segmentech diferencují mezi evropským kmenem E1 a E2.

Detekce a charakterizace acyklovir-rezistentních VZV kmenů, převážně nacházených u imunodeficientních pacientů, je technicky obtížná. Nicméně jde o důležitou záležitost právě z hlediska rychlého nasazení správné terapie. Jedním z možných detekčních přístupů je fenotypový test, využívající model *Escherichia coli* [12]. Další možnosti jsou například analýzy DNA pol genů [13].

Sekvence získané z genotypizací lze vyhodnocovat pomocí různých softwarů, jednou z možností je ClustalW v 1.83 [3, 7, 10] a BioEdit Sequence Alignment Editor pro Windows 95/98/NT/XP. Tyto programy porovnávají sekvence analyzovaného kmene se sekvencemi referenčních kmenů a vytvářejí fylogenetické stromy.

VYUŽITÍ A PŘÍNOS GENETICKÝCH ANALÝZ PRO PRAXI

Evoluční vývoj VZV trvá více než 400 milionů let. Virovými rezervoáry byli původně primáti, poté člověk. Výhradně v lidské populaci virus existuje více než 45 tisíc let [6].

Genetická diverzita a epidemiologie infekce VZV jsou ovlivněny místem výskytu onemocnění, charakterem klimatu v dané lokalitě a populačními faktory včetně historické migrace [14, 15].

Z fylogenetického pohledu je za nejpravděpodobnější verzi vzniku různých divokých kmenů VZV považována hypotéza předpokládající existenci ancestrálního VZV kmene (t0 - prapředka), ze kterého se vydělily kmeny evropské - E a japonský - J (t1). Předpokládá se, že E a J kmeny prošly minimálně dvěma rekombinačními procesy (t2 a t3), které umožnily existenci mozaikových kmenů (M). Během následující evoluce pak prav-

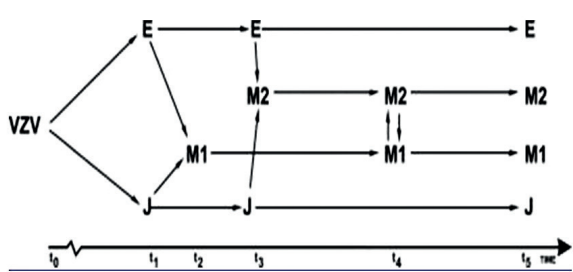


Schéma. 1 Evoluční model VZV [14]

Fig. 1 An evolutionary model of VZV [14]

děpodobně došlo k minimálně jednomu dalšímu rekombinantnímu procesu (t4), následovanému individuálním nezávislým vývojem jednotlivých divokých kmenů E, J, M1 a M2 až do současnosti (t5) (Schéma 1), [9, 16].

Pomyslnou hranici v rámci distribuce VZV kmenů, pokud vyloučíme migrační faktory, tvoří obratník Raka a Kozorooha [17, 18]. V subtropických a tropických oblastech převažují tedy tzv. mozaikové (M) kmeny, vzniklé pravděpodobně rekombinacemi a selekčními tlaky z kmenů evropských (E1, E2) a japonského kmene (J). Evropské kmeny jsou typické pro oblasti mírných pasů a část Austrálie, vyznačující se mírným klimatem [15]. V současnosti byly detekovány dva evropské kmeny, které značíme E1 a E2. Japonský kmen (J) je pak typický pro Japonsko a některé asijské země (Jižní Korea, Tchaj-wan, Mongolsko). Kmeny M1 a M2 jsou již plně charakterizované na základě podrobných analýz jejich virových genomů. V současnosti byly detekovány kmeny M3 a M4, nicméně jsou označovány jako „provizorní“, protože nedostatek DNA materiálu neumožnil podrobnou genotypovou analýzu celého VZV genomu [19–21].

Od roku 2006 se nově objevují zatím kusé informace o záchytech VZV rekombinant, a to jak mezi divokými kmeny VZV, tak i mezi divokým kmenem a vakcinačními kmeny VZV [4, 22]. O dopadu na klinickou praxi se diskutuje.

V roce 1998 doporučila Světová zdravotnická organizace (WHO) rutinní očkování proti varicelle v těch zemích, kde je onemocnění planými neštovicemi sociálně ekonomickým problémem, a také tam, kde je vakcína dostupná. Od roku 2009 je očkování proti varicelle zařazeno v dětském očkovacím kalendáři Austrálie, Kanady, Německa, Řecka, Kataru, Jižní Koreje, Saudské Arábie, Taiwanu, USA, Uruguaye, Itálie a Španělska. V České republice se očkuje na vyžádání rodiči a očkovací látka je dostupná na našem trhu od roku 2003. Všechny tyto země mají k dispozici atenuovanou živou vakcínu [23], která zaručuje

70–90% ochranu proti VZV a více než 95% ochranu vůči středně těžkému až těžkému průběhu onemocnění. Očkované osoby mohou planými neštovicemi onemocnět, ale obvykle s velmi mírným průběhem nemoci [24]. Studie uvádějí velmi malou pravděpodobnost komplikací. Použití živého kmene VZV k očkování ustanovuje latentní infekci v sensorických nervových gangliích. Následně může dojít u očkováných osob k výskytu zosterové infekce v důsledku reaktivace vakcinačního kmene viru. Nicméně tyto případy jsou velmi vzácné [8, 25].

Lze shrnout, že evoluce viru je ovlivněna dvěma nezávislými procesy: bodovými mutacemi a rekombinantními mechanismy. Z toho usuzujeme, že ve skutečnosti cirkuluje celosvětově kolem nás podstatně více divokých kmenů VZV, než bylo dosud detekováno. Zároveň je nutné počítat s tím, že masivní očkovací kampaně živou atenuovanou vakcínou, tak jak je známe z USA, umožňují další rekombinační postupy mezi divokými a vakcinačními kmeny VZV [15, 20] a vznik nových kmenových variant.

ZÁVĚR

Využití moderních molekulárněbiologických metod (PCR, sekvenování, genotypizace, mikroerogové čipy a další) v diagnostice a charakterizaci izolátů VZV otevírá nové možnosti jak pro studium viru jako takového, tak potenciálně i pro studium korelací mezi genotypickými charakteristikami viru a závažností průběhu onemocnění či vzniku lékových rezistencí (acyklovir, brivudin, penciclovir, sorivudine, foscarnet). Spolu s epidemiologickými daty a klinickými popisy je pak v současnosti již možné vztáhnout data z těchto analýz ke klinickým nálezům [7, 9, 11, 17].

Molekulární typizace kmenů VZV se stává důležitým nástrojem, který umožňuje: snadnější sledování epidemiologických ukazatelů, sledování geografické distribuce kmenů a jejich změn v důsledku migrace obyvatel, vyhledávání tzv. „index cases“ (primárních šířitelů onemocnění) při epidemických výskytech, detekci a sledování možných rekombinant mezi kmeny nebo mezi divokými a vakcinačními kmeny (důležité pro potenciální vývoj více patogenních nebo rezistentních mutant), a potenciální predikci závažnosti onemocnění či vzniku rezistence podle daného virového genomu [5, 16]. Právě divoké kmeny M, mozaikové, jsou dávány do souvislosti s těžkými průběhy varicelové infekce v tropických pásech nebo s importovanou infekcí z těchto zeměpisných oblastí.

Tento druh molekulárněgenetického monitorování poskytuje také informace o účinnosti vak-

cinací, o jejich dopadu na onemocnění planými neštovicemi a epidemie. Byly zaznamenány případy „průlomových“ infekcí varicelly po expozici očkováných jedinců divokému kmenu VZV nebo případy pásového oparu, vyvolané reaktivací vakcinačního kmene. Také byly detekovány přenosy vakcinačních kmenů od vakcinovaných osob. Zrovna tak je důležité sledovat situaci v populaci, kde jsou zaváděna očkování proti pásovému oparu. Ve Spojených státech je rozšířena živá atenuovaná vakcína Zostavax firmy Merck – Oka/Merck VZV vakcína (VZV Merck vakcína Varivax – plané neštovice – obsahuje minimálně 1 350 PFU (plaque-forming unit), zatímco Zostavax-pásový opar obsahuje minimálně 19 400 PFU) [25]. Majoritní otázkou je, zda tyto vysoké dávky nemohou zasáhnout při masivní proočkování do epidemiologie VZV. Cestou, jak tento problém obejít, mohou být rekombinantní proteinové neživé vakcíny, které jsou předmětem studií v Evropě.

Literatura

1. **Arvin, A.** Varicella vaccine: genesis, efficacy, and attenuation. *Virology*, 2001, roč. 284, s. 153–158.
2. **Marešová, V. et al.** Varicella and its complications a 5 year long retrospective analysis of hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, roč. 10, s. 669–674.
3. **Boščíková, V. et al.** Překvapivé výsledky molekulárně genetické analýzy klinických izolátů varicella-zoster viru (VZV). *Vakcinologie*, 2011, roč. 1, s. 10–12.
4. **Norberg, P.** Divergence and genotyping of human alpha herpesviruses: an overview. *Infect. Genet. Evol.*, 2010, roč. 10, s. 14–25.
5. **Norberg, P. et al.** Genotyping of clinical HSV1 isolates by use of restriction enzymes. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, roč. 44, s. 4511–4514.
6. **Peters, G. A. et al.** A full-genome phylogenetic analysis of VZV reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence of recombination between major circulating clades. *J. Virol.*, 2006, roč. 80, s. 9850–9860.
7. **Loparev, V. N. et al.** Improved identification and differentiation of VZV wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV ORF 62-based PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, roč. 38, s. 3156–3160.
8. **Perella, D. et al.** Validity of reported varicella history as a marker for varicella zoster virus immunity among unvaccinated children, adolescents, and young adults in the post-vaccine licensure era. *Pediatrics*, 2009, roč. 123, s. 820–828.
9. **Loparev, V. N. et al.** Global identification of three major genotypes of VZV: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J. Virol.*, 2004, roč. 78, s. 8349–8358.
10. **Davison, A. J. et al.** The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.*, 1988, roč. 67, s. 1759–1816.
11. **Loparev, V. N. et al.** Rapid genotyping of varicella-zoster virus vaccine and wild-type strains with fluorophore-labeled hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, roč. 38, s. 4315–4319.
12. **Sahli, R. et al.** A rapid phenotypic assay for acyclovir resistant VZV. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, roč. 44, s. 873–877.
13. **Sauerbrei, A. et al.** Resistance testing of clinical VZV strains. *Antiviral. Research.*, 2011, roč. 90, s. 242–247.
14. **Loparev, V. N. et al.** Distribution of varicella-zoster virus (VZV) wild type genotypes in northern and southern Europe: evidence for high conservation of circulating genotypes. *Virology*, 2009, roč. 383, s. 216–225.
15. **Loparev, V. N. et al.** Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J. Virol.*, 2007, roč. 81, s. 12758–12765.
16. **Norberg, P. et al.** Complete-genome phylogenetic approach to varicella-zoster virus evolution: genetic divergence and evidence for recombination. *J. Virol.*, 2006, roč. 80, s. 9569–9576.
17. **Quinlivan, M. et al.** The molecular epidemiology of VZV: evidence for geographic segregation. *J. Infect. Dis.*, 2002, roč. 186, s. 888–894.
18. **Carletti, F. et al.** Rapid, differential diagnosis of orthopox- and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons. *Viral. Methods.*, 2005, roč. 129, s. 97–100.
19. **Dayan, G. H. et al.** Varicella seroprevalence and molecular epidemiology of VZV in Argentina, 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, roč. 42, s. 5698–5704.
20. **Pahud, B. A. et al.** Varicella zoster disease of the central nervous system: epidemiological, clinical, and laboratory features 10 years after the introduction of the varicella vaccine. *J. Infect. Dis.*, 2011, roč. 20, s. 316–323.
21. **Sergeev, N. et al.** New mosaic subgenotype of VZV in USA. *J. Virol. Methods.*, 2006, roč. 136, s. 8–16.
22. **Koshizuka, T. et al.** Characterization of varicella-zoster virus-encoded ORF0 gene-comparison of parental and vaccine strains. *Virology*, 2010, roč. 405, s. 280–288.
23. **Sauerbrei, A. et al.** Genetic profile of an Oka varicella vaccine virus variant isolated from an infant with zoster. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, roč. 42, s. 5604–5608.
24. **Sedláček, D.** Jsou komplikace planých neštovic časté? *Pediatric pro praxi*, 2008, roč. 9, s. 243–247.
25. **Schmid, D. S. et al.** Impact of varicella vaccine on VZV dynamics. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010, roč. 23, s. 202–217.

Do redakce došlo dne 8. 7. 2013.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Radek Sleha

Katedra epidemiologie
 Fakulta vojenského zdravotnictví
 Univerzita obrany
 Třebešská 1575
 500 01 Hradec Králové
 e-mail: radek.sleha@upce.cz