

Strokovni prispevek/Professional article

KALICIVIRUSI – POVZROČITELJI EPIDEMIČNEGA GASTROENTERITISA PRI OTROCIH V VRTCU – IZKUŠNJE V SLOVENIJI

CALICIVIRUSES IN ACUTE GASTROENTERITIS OF YOUNG CHILDREN IN THE DAY CARE CENTRE – EXPERIENCES IN SLOVENIA

Mateja Poljšak-Prijatelj¹, Tatjana Freljih², Janet Zimšek¹, Ingrid Berce², Darja Barlič-Maganja³

¹ Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

² Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Kostanjeviška 16a, 5000 Nova Gorica

³ Veterinarska fakulteta Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

Prispelo 2001-04-11, sprejeto 2001-05-24; ZDRAV VESTN 2001; 70: 619-22

Ključne besede: kalicivirusi; gastroenteritis; epidemija; otroški vrtec; elektronska mikroskopija; RT-PCR

Izvleček – Izhodišča. Človeški kalicivirusi, povzročitelji črevesnih okužb, predstavljajo genetsko in antigeno različno skupino virusov s pozitivno usmerjeno enovijačno RNK. Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja v Sloveniji v zadnjih dveh letih narašča število prijavljenih epidemij virusnega gastroenteritisa, povzročena s kalicivirusi. Do sedaj so bili vsi kalicivirusi dokazani z metodami elektronske mikroskopije. Z izboljšanimi molekularnimi diagnostičnimi metodami želimo dopolniti elektronskomikroskopske metode in tako pojašniti epidemije, pri katerih povzročitelja ne odkrijemo.

Metode. Po izbruhu epidemije v vrtcu smo opravili epidemiološko poizvedovanje, odredili pregled brisov na snažnost, preiskavo na patogene črevesne bakterije in lateksno aglutinacijo za določitev rotavirusov in adenovirusov 40/41. Uporabili smo tudi encimskoimunsko metodo za dokaz astrovirusov. Iztrebke bolnikov smo pregledali z metodo neposredne elektronske mikroskopije, izvedli verižno reakcijo s polimerazo s poprejšnjo reverzno transkripcijo (RT-PCR) s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in produkte RT-PCR potrdili s hibridizacijo.

Rezultati. Z analizo podatkov iz vprašalnikov smo ugotovili, da je po izbruhu epidemije v novogoriškem vrtcu zbolelo z gastroenteritisom 20 od 97 otrok in 2 od 12 zaposlenih. Bolezenski znaki z drisko, bruhanjem in povišano telesno temperaturo so trajali 1 do 3 dni. Nihče od bolnikov ni iskal zdravniške pomoči, niti ni bil hospitaliziran. Odzeti vzorci hrane so bili neoporečni. Iz brisov na snažnost z delovnih površin smo iz petih brisov izolirali koagulaza pozitivni stafilokok. Iztrebki, ki smo jih preiskali na patogene črevesne bakterije, so bili negativni. Vseh 39 iztrebkov, ki smo jih preiskali na rota- in adenoviruse, je bilo negativnih. Z elektronskomikroskopskim pregledom 15 iztrebkov smo določili male okrogle strukturirane viruse. Od 15 vzorcev smo v 11 z metodo RT-PCR in hibridizacije z gensko specifičnimi sondami potrdili kaliciviruse genske skupine GG II.

Zaključki. S takojšnjim ukrepanjem epidemiološke službe in uspešno identifikacijo povzročitelja s specifičnimi molekularnimi metodami, RT-PCR in hibridizacijo lahko epidemijo kalicivirusov potrdimo in omejimo.

Key words: caliciviruses; gastroenteritis; outbreak; day care centre; electron microscopy; RT-PCR

Abstract – Background. Human caliciviruses represent a genetically and antigenically diverse group of single-stranded RNA viruses associated with acute gastroenteritis in humans. In last two years the number of notified gastroenteric cases in Slovenia is increasing. Samples were analysed by direct electron microscopy (EM). For increased sensitivity RT-PCR assay was performed. Using molecular methods for the detection of caliciviruses we tried to detect causative agent in outbreaks where no viruses were found by direct EM.

Methods. After onset of outbreak an epidemiologic questionnaire was performed, hygienic testing, and determination of pathogenic bacteria. Latex agglutination for determination of rota- and adenoviruses 40/41 were performed. Additionally ELISA test for determination of astroviruses was used. Stool samples were examined by direct electron microscopy. RNA was isolated from 15 positive samples in which small round-structured viruses (SRSVs) were observed. RNA was amplified by RT-PCR using specific primers and the obtained products were confirmed in hybridisation test.

Results. 20 children from 97 and 2 adults from 20 became ill. Symptoms included diarrhoea, vomiting and fever lasting for 1 to 3 days. None of patients sought medical help neither were hospitalized. Obtained food samples were not contaminated. From five hygienic smears coagulase positive staphylococci were isolated. All stool samples tested for pathogenic bacteria were negative, as well as for rota- and adenoviruses. Electron microscopy revealed 15 stool samples containing SRSVs. 11 of them were positive for caliciviruses, corresponding to genotype II (GG II), as determined by RT-PCR and hybridisation assay.

Conclusions. If an outbreak in the community is reported early or at least soon enough caliciviruses can be identified by RT-PCR and hybridisation assay and the outbreak could be restricted to limited area.

Uvod

Viruse Norwalk, prve znane predstavnike družine *Caliciviridae*, so odkrili leta 1972 v iztrebkih osnovnošolskih otrok, ki so zboleli med epidemijo v mestu Norwalk v Ohiu. Med vsemi virusi so bili ti prvi, ki so jih povezali z okužbami črevesja (1, 2). Vloga teh virusov kot povzročiteljev okužb je dolgo ostala vprašljiva. Viruse Norwalk, velike samo 27 nm, so namreč opazili v elektronskem mikroskopu (EM) zelo redko; v celičnih kulturah in poskusnih živalih se niso razmnoževali. V EM so opazili še več morfološko podobnih virusov, ki so jih poimenovali »mali okrogli strukturirani virusi« (angl. small round-structured viruses – SRSVs). Vsi ti virusi so bili antigensko različni od prototipnih Norwalk virusov. Podobne viruse, ki so jih našli kasneje, so poimenovali po geografskih področjih, npr. Hawaii, Snow Mountain, Sapporo, Taunton itd. (3). Po odkritju virusov Norwalk so z EM odkrili še rotaviruse, danes najpomembnejše povzročitelje endemičnih drisk pri otrocih (4, 5), nato pa še črevesne adenoviruse (6) in druge male viruse z značilno morfologijo površine – astroviruse in kaliciviruse (7–9). Značilne kaliciviruse so dokazali leta 1978 v iztrebkih zbolelih osnovnošolskih otrok. Glavni simptomi boleznijo so bili bruhanje in driska. Pri zdravih otrocih virusov niso našli (10).

Standardizirana metoda za diagnostiko malih okroglih virusov je opazovanje morfologije v EM (11). S to metodo lahko ločimo SRSV od astrovirusov in značilnih kalicivirusov. SRSV so 34–38 nm veliki virusi brez ovojnice in jasnih morfoloških značilnosti (11). Značilni kalicivirusi so enako veliki, s čašastimi vdolbinami na obodu (8, 11), medtem ko imajo astrovirusi videz 5–6-krake zvezde in so brez vdolbin na površini (7). Dokler so virusni pripravki sveži, z morfološko klasifikacijo ni težav. Toda odtajevanje in zamrzovanje, učinkovanje proteolitskih encimov in vezava protiteles v črevesju povzročijo spremembe, zaradi katerih prepoznavna ni več mogoča.

Približno pred desetimi leti so začeli s kloniranjem in določanjem nukleotidnega zaporedja genoma virusov Norwalk in drugih malih okroglih strukturiranih virusov (12, 13). S poznavanjem strukture genoma so raziskovalci razvili tudi občutljive molekularne diagnostične metode (metoda verižne reakcije s polimerazo s poprejšnjo reverzno transkripcijo – RT-PCR) (14, 15). Na osnovi določenih nukleotidnih zaporedij so viruse razdelili v dva rodova družine *Caliciviridae*. To sta rod »Norwalku podobni virusi« (angl. Norwalk like viruses – NLVs), ki vključuje viruse z neznačilno morfologijo in starim imenom SRSV, ter rod »Sapporu podobni virusi« (angl. Sapporo like viruses – SLVs), z virusi, ki imajo značilno morfologijo kalicivirusov (16).

NLV, ki so jih zelo redko določili z EM pri bolnikih z akutnim gastroenteritisom, so po tem, ko so jih začeli odkrivati z molekularnimi metodami, dobili pomembno vlogo povzročiteljev epidemij (17–19). Enake viruse so dokazali retrogradno tudi v okuženi hrani in vodi (20, 21).

Človeški kalicivirusi imajo enovijačno pozitivno usmerjeno RNK, ki se razlikuje od predstavnikov družine *Picornaviridae* po razdelitvi bralnih okvirjev (angl. open reading frame – ORF) v virusnem genomu. 5' – konec genoma kodira nestrukturne, medtem ko 3' – konec strukturne proteine. Velikost genoma je 7,3–7,6 kb, RNK ima dva ali tri glavne ORF. Genoma NLV in SLV se razlikujeta po razporeditvi ORF (22, 23).

Prenos virusov je fekalno-oralni, virusi se širijo med ljudmi z neposrednim stikom ali s kontaminirano hrano in vodo (20, 21). Bruhanje je običajno, viruse najdemo tudi v izbruhani (24). Aerosoli pri bruhanju so pomembni za prenos okužb (25, 26). Klinična znamenja so blaga, bolezen sama zamre, parenteralna rehidracija in hospitalizacija sta potrebni le redkokdaj (27, 28). Okužbo povzroči že 10–100 virusov (29). Na kalicivirusno okužbo sumimo, kadar ne določimo bakterij in

parazitov v iztrebku, pri bruhanju v več kot 50%, pri trajanju bolezni od 12 do 60 ur ter pri inkubacijski dobi 24 do 48 ur (30). Za okužbo je značilna visoka sekundarna zboleznost – več kot 50% (31). Epidemije, povzročene s kalicivirusi, izbruhnajo v zaprtih skupnostih, kot so družine, šole, vrtci, vojaški oddelki, hoteli, bolnišnice, dijaški domovi, domovi za ostarele, na velikih turističnih ladjah itd. Zbolijo največkrat otroci in odrasli, novorojenčki in mali otroci redkeje. Viruse inaktiviramo s kuhanjem. Ker je prenos med asimptomatsko okužbo možen več kot teden dni, so lahko vir okužbe tudi razdeljevalci in prodajalci hrane. Virusi so odporni tudi na klor v vodi, preživijo zamrzovanje in segrevanje do 60°C. Imunost proti kalicivirusom še ni pojasnjena (3).

Najpogosteje uporabljeni metodi za določevanje kalicivirusov sta še vedno imunska elektronska mikroskopija (IEM) in neposredna elektronska mikroskopija (EM) (29). Da viruse dokažemo, mora biti koncentracija virusov v vzorcu najmanj 10⁶/mL (9). Običajno se pri kalicivirusni okužbi izloča manjše število virusov in tako je diagnoza, postavljena z EM, lahko lažno negativna. Kljub temu ostaja EM metoda, s katero najpogosteje najdemo možne povzročitelje virusnih gastroenteričnih okužb.

Z EM diagnostiko črevesnih virusnih okužb smo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo začeli že pred dvajsetimi leti. Iskali smo predvsem rotaviruse (32–34), pozneje tudi male okrogle viruse, vendar smo jih v vzorcih določili v manj kot 1%. V letu 2000 smo začeli uporabljati tudi molekularne metode. Uvedli smo metodo RT-PCR za dokazovanje malih okroglih virusov v okviru rodu NLV in SLV (19).

V letu 2000 je bilo na Inštitut za varovanje zdravja prijavljenih 14 epidemij virusnega gastroenteritisa – od tega osem rotavirusnih epidemij in šest epidemij, ki so jih povzročili mali okrogli virusi (podatki Inštituta za varovanje zdravja). Novembrsko virusno epidemijo pri otrocih v novogoriškem vrtcu v enoti Kekec smo potrdili tudi z molekularnimi metodami.

Preiskovanci, material in metode

Epidemiološko službo Zavoda za zdravstveno varstvo Nova Gorica je dne 16. 11. 2000 pediatrija Zdravstvenega doma Nova Gorica obvestila, da je v enoti Kekec zbolelo več otrok s slabostjo, bruhanjem in drisko. Pri epidemiološkem izsledovanju, ki smo ga opravili še isti dan, smo ugotovili, da eno obiskuje 97 otrok, in sicer v skupini malih šolarjev 22 otrok, v skupini šest let 22 otrok, v skupini 4–5 let 20 otrok, v skupini 3–4 let 18 otrok ter v skupini treh let 15 otrok. V enoti je zaposlenih pet vzgojiteljic in pet pomočnic vzgojiteljic ter osebi, ki sta zadolženi za pripravo in delitev dnevnih obrokov in čiščenja enote.

Preiskovanci. V vrtcu je zbolelo 20 otrok in dve odrasli osebi. Vsi zaposleni (12 oseb), tako zdravi kot bolni, so oddali iztrebek za pregled na rota- in adenoviruse. Odvzeli smo tudi iztrebke 27 otrok, od tega 19 vzorcev otrok, ki so imeli klinične znake, in sedem vzorcev otrok brez kliničnih znakov. Vključili smo tudi en vzorec izbruhanine. Pri vseh 27 vzorcih smo opravili preiskave na adeno- in rotaviruse. Pri treh vzorcih smo opravili tudi preiskavo na patogene črevesne bakterije. Petnajst vzorcev bolnih otrok in dva vzorca bolnih zaposlenih smo pregledali z EM metodami, druge pa z metodo lateksne aglutinacije za rotaviruse (Biomerieux) in adenoviruse 40/41 (Orion-Diagnostika) po navodilih proizvajalca.

Vzorci hrane. V razdelilni kuhinji smo odvzeli vzorce obrokov hrane drugi dan epidemije (zajtrk, kosilo, popoldanska malica). Vzorca pitne vode nismo odvzeli, ker smo hidrično epidemijo izključili.

Nadzor okolja. Odvzeli smo 15 brisov na snažnost z delovnih površin, ki so jih uporabljali zaposleni in otroci.

Elektronska mikroskopija. Uporabili smo standardno metodo negativnega kontrastiranja. Pripravili smo 10% suspenzijo iztrebka v fosfatnem pufru (PBS) in kapljico suspenzije inkubirali 5 minut na elektronskomikroskopski mrežici, prevlečeni s formvarom in ojačeni z ogljikom (Agar Scientific). Mrežice smo kontrastirali s 3% fosforvolframovo kislino pH 4,5. Vzorce smo pregledali v transmisijskem elektronskem mikroskopu Jeol JEM 1200EX II pri 40-100.000-kratni povečavi.

Encimskoimunski test (EIA) za določanje astrovirusov v iztrebkih. Iztrebke bolnikov smo pregledali tudi z encimskoimunskim testom za določanje astrovirusnih antigenov v iztrebkih (Dako) po navodilih proizvajalca.

Izolacija in ekstrakcija virusne RNK. Za ekstrakcijo RNK smo pripravili 10% suspenzijo iztrebka v PBS pH 7,4. RNK kalicivirusov smo izolirali iz 250 µL vzorca z reagentom TRIzol (Gibco BRL) po navodilih proizvajalca. Virusno RNK smo uporabili takoj v verižni reakciji s polimerazo s poprejšnjo reverzno transkripcijo (RT-PCR) ali jo shranili pri -80°C.

RT-PCR. Izbrali smo začetna oligonukleotida JV12 in JV13 (19), za pomnoževanje odseka virusnega genoma za encim polimerazo, s katerima lahko določimo vse doslej znane antigenske skupine kalicivirusov. Uporabili smo reagente in encime proizvajalca Promega (Access RT-PCR), ki omogočajo, da poteka reverzna transkripcija in pomnoževanje nukleinske kisline v eni stopnji. K 5 µL izolirane RNK smo dodali 1 µL (20 pmol) obeh začetnih oligonukleotidov (JV12 in JV13) in denaturirali 5 min pri 90°C. Dodali smo reakcijsko mešanico (voda, PCR pufer, dNTP, MgSO₄, AMV reverzna transkriptaza in *T7*/DNK polimeraza). Epruvete smo vstavili v termopomnoževalnik in vključili program: sinteza prve verige cDNK 42°C 45 min; denaturacija 94°C 2 min; sinteza druge verige in pomnoževanje v 40 ciklih (94°C 30 s.; 37°C 1 min; 68°C 2 min); dodatna elongacija (68°C 7 min). Po pomnoževanju smo 326 bp dolge produkte analizirali z elektroforezo v 3% agaroznem gelu. Specifičnost in pripadnost genskim skupinam GG I in GG II smo potrdili s hibridizacijsko metodo (PCR-ELISA-DIG Detection, Roche) po navodilih proizvajalca z uporabo z biotinom označenih sond.

Rezultati

Epidemiološki izsledki

Po anamnestičnih podatkih smo izvedeli, da je prvi otrok zbolel v noči iz 12. na 13. november s bruhanjem. Težave so bile kratkotrajne, tako da otrok ni izostal iz varstva. Z vprašalnikom smo opravili epidemiološko poizvedovanje. Z analizo podatkov iz vprašalnikov smo ugotovili, da je zbolelo 20 otrok in dve odrasli osebi - vzgojiteljica in pomočnica vzgojiteljice. Največ otrok, 11, je zbolelo v skupini 6 let. Prvi klinični znaki so se pojavili 12. novembra. Največ otrok je imelo težave tretji dan - 19 oseb, četrti dan sta zboleli še dve osebi, zadnji bolnik je imel težave peti dan. Težave so trajale pri devetih otrocih en dan, pri osmih otrocih dva dni, pri treh otrocih tri dni. Ena odrasla oseba je imela težave en dan, druga pa dva dni. Bruhanje je navajalo 17 otrok, trije otroci in ena odrasla oseba so navajali bruhanje in drisko, medtem ko je 1 odrasla oseba navedla drisko, bruhanje in povišano temperaturo. Nihče od bolnikov ni iskal zdravniške pomoči, niti ni bil hospitaliziran. V enoti vrtca smo skupaj z zdravstveno inšpekcijo opravili higienski pregled kuhinje.

Pregled brisov na znažnost

Vsi kontrolni obroki hrane so bili negativni. Iz brisov na znažnost smo v petih brisih izolirali koagulaza pozitivni stafilokok.

Tab. 1. *Opisi, epidemiološke ugotovitve, rezultati RT-PCR in hibridizacije 15 vzorcev iztrebkov, v katerih smo z EM ugotovili prisotnost SRSV.*

Tab. 1. *Descriptions, epidemic findings, RT-PCR and hybridisation results of 15 stool samples, positive for SRSV by EM.*

Št. vz. Sp. No.	Spol Sex	Starost (leta) Age (years)	Bolez. znaki Symptoms	Trajanje (dnevi) Duration (days)	EM	RT-PCR in hibridizacija RT-PCR and hybridisation
1	Ž	34	B, D, T	2	SRSV	GG II
2	Ž	29	B, D	1	SRSV	GG II
3	Ž	4	B	2	SRSV	GG II
4	Ž	5	B	1	SRSV	GG II
5	M	5	B	1	SRSV	GG II
6	M	5	B	3	SRSV	GG II
7	M	6	B	2	SRSV	GG II
8	M	6	B	3	SRSV	GG II
9	M	6	B, D	2	SRSV	GG II
10	M	6	B, D	2	SRSV	GG II
11	M	6	B, D	2	SRSV	GG II

M	- moški / male
Ž	- ženski / female
B	- bruhanje / vomiting
D	- driska / diarrhoea
T	- povišana telesna temperatura / fever
EM	- elektronskomikroskopski pregled / electron microscopy
RT-PCR	- reverzna transkripcija s polimerazno verižno reakcijo / reverse-transcription polymerase chain reaction
GG II	- genska skupina II / genogroup II
SRSV	- mali okrogli strukturirani virusi / small round-structured viruses

Preiskava na patogene črevesne bakterije

Trije iztrebki, ki smo jih preiskali na patogene črevesne bakterije, so bili negativni.

Preiskava na rotaviruse in adenoviruse 40/41 z lateksno aglutinacijo

Vseh 39 iztrebkov, ki smo jih preiskali na rota- in adenoviruse, je bilo negativnih.

Elektronska mikroskopija

Pregledali smo 15 iztrebkov in v vseh določili SRSV.

RT-PCR in hibridizacija

Od 15 iztrebkov (dva vzorca bolnih zaposlenih in 13 vzorcev bolnih otrok) smo v enajstih vzorcih s pomočjo RT-PCR in hibridizacije z gensko specifičnimi sondami potrdili kalicivirusse (tab. 1).

Razpravljanje

Že leta 1982 so raziskovalci nakazali, da povzročajo Norwalku podobni virusi najmanj 42% epidemij vseh nebakterijskih gastroenteritsov (30). Viruse so večinoma dokazovali z metodami imunske elektronske mikroskopije, pri katerih so uporabljali protitelesa, pridobljena od okuženih prostovoljcev (37). Nezadovoljiva občutljivost teh metod in dejstvo, da niso preiskovali vseh epidemij, je bila vzrok, da je bila incidenca gastroenteritsov, povzročenih s kalicivirusi, prikrita. Večino epidemij, tudi po svetu, prijavljajo na območne zavode za zdravstveno varstvo. Le pri manjšem številu teh epidemij so načrtno iskali kalicivirusse. Na Nizozemskem so z molekularno epidemiološkimi raziskavami na osnovi RT-PCR dokazali kalicivirusse kot povzročitelje akutnega gastroenteritisa v 87% vseh prijavljenih gastroenteritsov v enem letu (19). Podobne rezultate so dobili tudi v ZDA in Veliki Britaniji (35, 36).

Pri otrocih so kalicivirusse dokazali kot pomembne povzročitelje drisk, takoj za rotavirusi (38).

Z EM diagnostiko črevesnih virusnih okužb smo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo začeli že pred dvajsetimi leti. Iskali smo predvsem rotavirusse (32-34), pozneje tudi ma-

le okrogle viruse, vendar smo jih v vzorcih določili v manj kot 1%. V letu 2000 smo začeli uporabljati tudi molekularne metode. Uvedli smo metodo RT-PCR za dokazovanje malih okroglih virusov v okviru rodu NLV in SLV (19) in tako dokazali kalicivirus kot povzročitelja akutnega gastroenteritisa pri otrocih in dveh zaposlenih osebah v vrtcu. Glede na potek bolezni, klinično sliko ter laboratorijske izvide smo zaključili, da je epidemijo v vrtcu povzročila okužba s kalicivirusi, ki se je prenašala stično s človeka na človeka.

Igralnice v enoti Kekec so razporejene v dva trakta. V prvem traktu sta igralnici skupin 6 let in 4–5 let, ki imata skupne sanitarije. V drugem traktu so ostale skupine, ki imajo svoje sanitarije, tako da se otroci obeh traktov ne srečujejo in družijo pogosto. Iz obdelave epidemije je razvidno, da se je bolezen začela v skupini otrok, starih šest let, kjer je bilo tudi največ zbolelih, sledila je skupina 4–5 let starih otrok iz istega trakta, ki uporablja iste sanitarije. Iz drugih skupin so zboleli le posamezniki.

Zaposleni v vrtcu so takoj po množičnem pojavu bolezni opravili čiščenje in razkuževanje vseh prostorov, opreme, igrač in sanitarij. Zato menimo, da je tudi ta ukrep prispeval k temu, da se širjenje ni nadaljevalo in množično razširilo na otroke v drugih skupinah.

Za preprečevanje širjenja okužbe je pomembna identifikacija in odstranitev vira okužbe, posebno oseb, ki so zaposlene pri pripravi in delitvi hrane. Zelo pomembna je osebna higiena, predvsem umivanje rok, ter čiščenje in razkuževanje sanitarij ter površin, ki se jih dotikamo z rokami. Glede na možnost kapljičnega prenosa (24–26) priporočamo prezračevanje prostorov. Ti ukrepi vplivajo predvsem na širjenje okužbe iz enote v enoto, nimajo pa večjega vpliva na potek bolezni v skupini, ko se bolezen že pojavi.

Za potrditev okužb s kalicivirusi je občutljivost RT-PCR ključnega pomena. Ker uporabljamo oligonukleotidne začetnike ohranjenega dela polimeraznega gena (19), je smiselno vse pozitivne produkte PCR dokazati še dodatno s hibridizacijo ali določanjem genomskega zaporedja. To je pomembno pri dokazovanju večjih epidemij, povzročenih s kalicivirusi. V teh primerih je ključnega pomena pravočasen odvzem vzorcev iztrebkov, če je le možno, v prvih 12 urah po pojavu bolezenskih znakov.

Rezultati te epidemije in večjega števila sporadičnih primerov (neobjavljeni podatki) nakazujejo, da so kalicivirusi pogosti povzročitelji virusnega gastroenteritisa tudi v Sloveniji. Ker so okužbe večinoma blage in trajajo kratek čas, večina zbolelih ne išče pomoči zdravnika.

Epidemiologija in klinična slika, povzročena z virusi rodu NLV in rodu SLV, se razlikujeta (5, 29). Z RT-PCR lahko dokažemo etiologijo rodov kalicivirusov in zapolnimo vrzel nepojasnjenih virusnih povzročiteljev gastroenteritisa.

Zahvala

Zahvaljujem se Adi Hočevar-Grom, dr. med., spec. med. dela, prometa in športa, z Oddelka za epidemiologijo nalezljivih bolezni Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije, za posredovanje epidemioloških podatkov za leto 2000.

Literatura

- Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969; 119: 668–73.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075–81.
- Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk group of viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. eds. *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 783–810.
- Bishop RF. Natural history of human rotavirus infections. In: *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 2nd edition. AZ Kapikian ed. Marcel Dekker, New York, 1994; 131–68.
- Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BM, Knipe DM, Howley PM et al. eds. *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 1657–708.
- Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1975; 1: 4–5.
- Madeley CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; i: 451–2.
- Madeley CR, Cosgrove BP. Calicivirus in man. *Lancet* 1976; i: 199–200.
- Madeley CR. Comparison of the features of astrovirus seen in samples of faeces by electron microscopy. *J Infect Dis* 1979; 139: 519–23.
- Cubitt WD, McSwiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Pathol* 1970; 32: 786–93.
- Caul EO, Appleton H. The electron microscopical and physical characteristic of small round human fecal viruses: An interim scheme for classification. *J Med Virol* 1982; 257–65.
- Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genom cloning and characterization. *Science* 1990; 250: 1580–3.
- Lamden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-Like) virus. *Science* 1993; 259: 516–9.
- De Leon R, Matsui SM, Baric RS et al. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and non-radioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3151–7.
- Jiang X, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2529–34.
- Pringle CR. Virus taxonomy. *Arch Virol* 1999; 144: 421–9.
- Carter MJ, Milton ID, Madeley CR. Caliciviruses. *Rev Med Virol* 1991; 1: 177–86.
- Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; 181: S284–7.
- Vinje J, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses (SRSV) in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174: 610–5.
- Shieh YSC, Monroe SS, Fankhauser RL et al. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J Infect Dis* 2000; 181: S360–6.
- Schaub SA, Oshiro RK. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. *J Infect Dis* 2000; 181: S374–80.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; 195: 51–61.
- Liu BL, Clarke IN, Caul EO, Lamden PR. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 1995; 140: 1345–56.
- Greenberg HB, Wyatt RG, Kapikian AZ. Norwalk virus in vomitus. *Lancet* 1979; 1: 55–5.
- Sawyer LA, Murphy JJ, Kaplan JE et al. 25 to 30 nm particle associated with hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am J Epidemiol* 1988; 127: 1261–71.
- Chadwick PR, McCann R. Transmission of small round-structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* 1994; 26: 251–9.
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H et al. Transmission of infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971; 123: 307–12.
- Middleton PJ, Szymanski MT, Petric M. Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Am J Dis Child* 1977; 131: 733–7.
- Caul EO. Viral gastroenteritis: small round-structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. *J Clin Pathol* 1996; 49: 959–64.
- Kaplan JE, Garry GW, Baron RC et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982; 96: 576–61.
- Estes MK, Atmar RL, Hardy ME. Norwalk and related diarrhea viruses. In: Richman Douglas eds. *Clinical Virology*, 1997: 1073–95.
- Drinovec B, Poljšak-Prijatelj M, Grom J. Elektronsko mikroskopska prepoznavna rotavirusov. *Zb Biotehn fak UL Vet* 1980; 17: 183–8.
- Drinovec B, Poljšak-Prijatelj M, Marin J et al. Hitra elektronsko mikroskopska diagnostika virusnih infekcij. *Zdrav Vestn* 1981; 50: 409–13.
- Poljšak-Prijatelj M, Drinovec B. Elektronsko mikroskopske preiskave nekaterih virusnih gastroenteritisa. *Zbornik 4. kongresa mikrobiologov Jugoslavije*, Beograd 1981: 257–8.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of «Norwalk-like viruses» in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998; 178: 1571–8.
- Maguire AJ, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in East Anglia, United Kingdom, during the 1996–1997 season. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 81–9.
- Madore HP, Treanor JJ, Pray KA, Dolin R. Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 456–9.
- Pang XL, Joensuu J, Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis* 1999; 18: 420–6.