

*Artur Sulik¹, Elżbieta Pogorzelska¹, Małgorzata Wojtkowska², Dorota Rożkiewicz¹,
Elżbieta Ołdak¹*

ZAKAŻENIA NOROWIRUSOWE U DZIECI HOSPITALIZOWANYCH Z OSTRĄ BIEGUNKĄ W PÓŁNOCNO-WSCHODNIEJ POLSCE

¹Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: Elżbieta Ołdak

²Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatrycznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: Jolanta Wysocka

*Zakażenie norowirusami wykryto u 11,4% dzieci z ostrym nieżytem
żołądkowo-jelitowym, hospitalizowanych w Klinice Obserwacyjno-Za-
kaźnej Dzieci AM w Białymstoku. Najwięcej zachorowań obserwowano
od września do grudnia.*

Słowa kluczowe: norowirus, nieżyt żołądkowo-jelitowy, epidemiologia

Key words: norovirus, viral gastroenteritis, epidemiology

WSTĘP

Norowirusy stanowią istotny czynnik etiologiczny wirusowych zakażeń przewodu pokarmowego zarówno u dzieci jak u osób dorosłych. Wiele ostatnich badań wskazuje, iż w określonych populacjach są one najczęstszym czynnikiem etiologicznym z wszystkich innych czynników wirusowych. W najbliższym czasie może wzrosnąć udział zakażeń norowirusami, ponieważ rozpowszechnienie szczepień ochronnych przeciwko rotawirusom ograniczy częstość ich występowania (1).

Najczęściej źródłem zakażenia norowirusem na drodze fekalno-oralnej jest chory człowiek. Do zakażenia wystarczy niewielka liczba cząsteczek wirusa, co sprzyja rozprzestrzenianiu się infekcji w środowisku. Źródłem zakażenia może być też skażona woda i to zarówno woda pitna (2) jak i woda w basenach kąpielowych (3). Ponadto wykazano obecność norowirusów u zwierząt, choć dotychczas nie wskazano na możliwość przeniesienia zakażenia na człowieka (4). Nie jest pewne, jak często dochodzi do bezobjawowego nosicielstwa oraz czy ma to istotne znaczenie epidemiologiczne (5, 6). Istnieją również uwarunkowania genetyczne zachorowań na zakażenia norowirusowe. Badania na ochotnikach, zakażanych w warunkach laboratoryjnych, wskazały na mniejsze ryzyko zakażenia objawowego u osób z grupą krwi B (7).

Obecnie dostępnych jest kilka metod diagnostycznych pozwalających wykryć obecność norowirusów w próbce kału. Są to: mikroskopia elektronowa, polimerazowa reakcja łańcuchowa (RT-PCR) oraz metody immunoenzymatyczne. Metody te różnią się czułością, swoistością, złożonością procedury testowej oraz kosztami oznaczeń. Obecne pilotażowe badania miały na celu określenie roli zakażeń norowirusowych wśród dzieci hospitalizowanych w naszej klinice oraz wstępną ocenę przydatności komercyjnie dostępnych testów immunoenzymatycznych do wykrywania norowirusów w kale.

MATERIAŁ I METODY

Do badań włączono 149 dzieci z niebakteryjną infekcją przewodu pokarmowego, hospitalizowanych w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci AM w Białymstoku w okresie następujących po sobie 12 miesięcy. Przy przyjęciu każdorazowo wykonywano badania testem lateksowym Bio-Merieux celem wykluczenia najczęściej spotykanych u dzieci zakażeń rotawirusowych i adenowirusowych. Następnie kał zamrażano i przechowywano w temperaturze $<-20^{\circ}\text{C}$. Jednocześnie wykonano badania na obecność norowirusów genogrupy 1 i 2 testem immunoenzymatycznym IDEIA Norovirus, dostarczonym przez Dakocytomation Ltd. Procedurę testową przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

Wyniki badań skorelowano z podstawowymi danymi klinicznymi oraz przedstawiono graficznie. Zastosowany protokół badawczy został zaakceptowany przez uczelnianą komisję bioetyczną.

WYNIKI

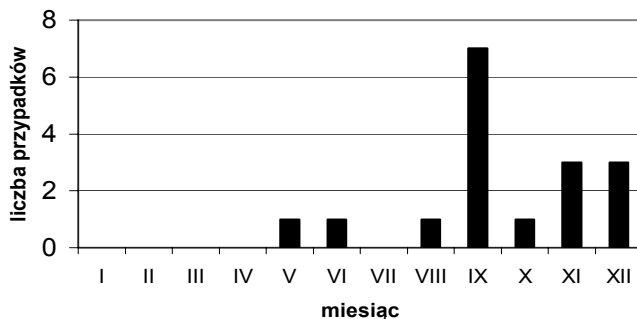
Wśród 149 dzieci włączonych do badań, zakażenie norowirusem genogrupy 1 (G1) stwierdzono u jednego dziecka, zaś genogrupy 2 (G2) u szesnaściorga dzieci. Łącznie norowirusy przy użyciu zastosowanej metody wykryto u 11,4% badanych dzieci. Wiek dzieci z zakażeniem norowirusowym wyniósł od 3 tygodni do 15 lat (średnia wieku 5,9 roku). Wśród dzieci z zakażeniem norowirusami było dwanaście dziewcząt i pięciu chłopców. Sezonowość zakażeń norowirusami w okresie kolejnych 12 miesięcy od stycznia do grudnia przedstawiono graficznie (ryc. 1). Dzieci pozostawały w szpitalu od 2 do 8 dni, średnio 3,7 dnia. Pomimo zastosowanych technik badawczych, u 64 (43%) dzieci nie wykryto czynnika etiologicznego biegunki.

DYSKUSJA

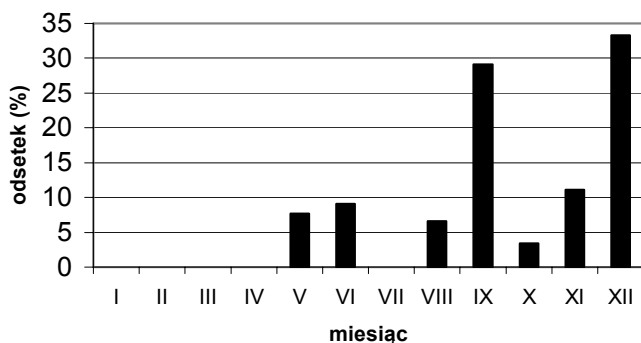
Podsumowując wyniki badań epidemiologicznych niebakteryjnych zakażeń przewodu pokarmowego, przeprowadzonych w latach 1995-2000 na terenie 10 krajów europejskich, wskazano na norowirusy jako główną przyczynę (>85%) zachorowań o charakterze epidemicznym (8).

Na wzrastającą rolę zakażeń norowirusowych wskazuje szereg badań. Jednakże brak jasnej odpowiedzi na pytanie, czy rzeczywiście obecnie stwierdzamy zwiększoną liczbę zakażeń norowirusowych, niż w czasach kiedy w 1929r. *Zahorsky* opisywał „*winter vomiting disease*”. Możliwe, iż jest to efekt wprowadzenia nowych metod wykrywania norowirusów w kale, jak też i zainteresowania badaczy.

A)



B)



Ryc. 1. Sezonowość zakażeń norowirusowych. Liczba wykrytych przypadków (A) oraz odsetek dzieci z zakażeniem norowirusowym (B) w kolejnych dwunastu miesiącach

Fig. 1. Seasonal distribution of norovirus infection. Number of cases (A) and percentage of children (B) with norovirus infection in twelve consecutive months

Potrzebie rozpoznania sytuacji epidemiologicznej dotyczącej zakażeń norowirusowych w regionie północno-wschodnim Polski wychodzą naprzeciw nasze badania wskazując na znaczący (11,4%) udział norowirusów w wywoływaniu wirusowego nieżytu żołądkowo-jelitowego w populacji dziecięcej. Badania własne są tożsame z doniesieniami z innych państw europejskich. *Frentz* i wsp. ocenili częstość zakażenia norowirusami na 17,9%, badając 699 próbek kału pochodzących od pacjentów w wieku od 6 miesięcy do 75 lat z niebakteryjnym nieżytem żołądkowo-jelitowym (Szwajcaria) (9). Najwięcej zachorowań obserwowano w miesiącach zimowych, co odpowiada obserwacjom własnym, w których większość zakażeń zanotowano w miesiącach jesienno-zimowych. Do podobnych wniosków doszli *Colomba* i wsp. (10), którzy badając 215 próbek kału pobranych w okresie 12 miesięcy od hospitalizowanych dzieci (Włochy) wskazali na rotawirusy jako najczęstszą przyczynę biegunek. Norowirusy były odpowiedzialne za 18,6%, zachorowań stanowiąc drugi co do częstości czynnik etiologiczny. Analogicznie *Oh* i wsp. (11) badając dzieci hospitalizowane w Niemczech, z rozpoznaniem nieżytu żołądkowo-jelitowego wykazali, iż

norowirusy stanowią drugi co do częstości po rotawirusach czynnik etiologiczny. Zakażenie norowirusami wykryto u 45 dzieci spośród 217 badanych (20,7%).

Podczas analizy wyników badań przyczyn wirusowych zakażeń przewodu pokarmowego zdarza się, iż największą grupę stanowią zakażenia wywołane niezidentyfikowanym czynnikiem infekcyjnym. Wprowadzenie technik molekularnych oraz komercyjnych zestawów immunoenzymatycznych pozwala coraz częściej na wykrycie czynników etiologicznych w tej grupie zakażeń. W badaniach własnych nadal pozostał duży odsetek dzieci, u których nie udało się znaleźć czynnika przyczynowego (43%). Zapewne wśród tych dzieci są również te z infekcją norowirusową, u których uzyskano wynik fałszywie ujemny testu immunoenzymatycznego. Jednak zastosowana metodyka badań ma wiele zalet. Jest metodą stosunkowo tania, łatwą do wykonania technicznie. Jest to również metoda o dużej swoistości, sięgającej wg producenta 96,2% i podobnie ocenianej w niezależnych badaniach. Poważną wadą metody immunoenzymatycznej, w porównaniu do metod molekularnych (RT-PCR), jest niewysoka czułość sięgająca 64,3%. Ma to mniejsze znaczenie, gdy badania mają służyć wykrywaniu czynnika etiologicznego zachorowań epidemicznych, kiedy dysponujemy próbkami kału od wielu chorych. Podczas badania pojedynczej próbki kału, pobranej od jednej osoby, wskazana czułość może okazać się niewystarczająca, powodując niedoszacowanie roli zakażenia norowirusowego.

W ostatnim czasie w literaturze światowej opublikowano szereg prac oceniających przydatność komercyjnych zestawów do immunoenzymatycznego oznaczania norowirusów w kale. *De Burin* i wsp. (12) badając 158 próbek kału ocenili czułość dwóch komercyjnie dostępnych testów immunoenzymatycznych (Dakocytomation i R-Biopharm) na 38% i 36%, przy wysokiej swoistości – odpowiednio 96% i 88%. W badaniu tym za złoty standard, do którego odnoszono wyniki, uznano badania RT-PCR. Inni autorzy wskazują na wyższą czułość testów ELISA, w odniesieniu do próbek badanych przy użyciu RT-PCR, ocenianą na 55,5% przy bardzo wysokiej swoistości przekraczającej 98% (ELISA; Dokocytomation) (13). Czułość testów immunoenzymatycznych była jednak zdecydowanie wyższa, niż czułość mikroskopii elektronowej, którą w tych samych badaniach oceniano na niespełna 24%. Wobec nierównomiernego rozkładu wirusów w próbkach kału zaproponowano homogenizację badanych próbek (14) celem zwiększenia czułości testów immunoenzymatycznych, co może być cenną uwagą. Metoda RT-PCR ma też swoje ograniczenia. Choć potrafi ona wykryć obecność wirusów przy bardzo niskim ich stężeniu w badanej próbce kału, to jednak badane wiriony muszą być nienaruszone. Każda z trzech metod wykrywa inne komponenty wirionu dając często wykluczające się wyniki (15).

Wykrycie czynnika etiologicznego w przypadku zachorowań epidemicznych (16), gdy dostępne są próbki od wielu chorych osób, może być dokonane przy użyciu każdej z dostępnych metod: mikroskopii elektronowej, ELISA bądź RT-PCR. Z uwagi na koszt badań oraz stosunkowo prostą metodykę testy immunoenzymatyczne wydają się być najlepszym wyborem. W sytuacji gdy chcemy analizować wyniki pojedynczej próbki kału, *Rebenau* i wsp. zaproponowali wykonanie jednocześnie co najmniej dwóch różnych testów (15).

Wraz z poprawą standardów higienicznych związanych z produkcją i przygotowaniem żywności, znaczenie zakażeń bakteryjnych przewodu pokarmowego maleje. Większej uwagi wymagają obecnie czynniki wirusowe zakażeń. Zakażenia rotawirusowe mogą być znacznie ograniczone poprzez dostępne na rynku skuteczne i bezpieczne szczepionki. W takiej sytuacji epidemiologicznej wzrasta znaczenie zakażenia norowirusami (17). Duża zaraźliwość, brak

immunoprofilaktyki oraz swoistego leczenia w połączeniu z opornością na niekorzystne czynniki fizyczne – chlorowanie wody, zamrażanie, sprawiają, iż norowirusy będą dominującym czynnikiem etiologicznym biegunki infekcyjnej w krajach rozwiniętych. Tym bardziej wskazana jest kontynuacja badań nad zakażeniem norowirusowym, wciąż niedocenianym, w polskiej literaturze medycznej, czynnikiem etiologicznym ostrej biegunki.

PODSUMOWANIE

1. Norowirusy stanowiły istotny czynnik zakaźny wywołujący nieżyt żołądkowo-jelitowy u hospitalizowanych dzieci. Większość zakażeń obserwowano od września do grudnia.
2. Faktyczna liczba zakażeń jest zapewne zaniżona z uwagi na ograniczenia zastosowanej metody immunoenzymatycznej. Bardziej zaawansowane techniki z wykorzystaniem RT-PCR oraz jednocześnie zastosowanie dwóch metod byłoby wskazane by poznać faktyczną liczbę chorych.

A Sulik, E Pogorzelska, M Wojtkowska, D Rożkiewicz, E Oldak

NOROVIRUS INFECTION IN CHILDREN HOSPITALIZED WITH ACUTE GASTROENTERITIS IN NORTHEASTERN POLAND

SUMMARY

Noroviruses belonging to the family of Caliciviridae are a major cause of acute gastroenteritis in both children and adults. In the current study incidence of norovirus gastroenteritis was estimated in children hospitalized for acute gastroenteritis using commercially available ELISA tests. Epidemiological data were correlated with basic demographic findings.

A hundred and forty nine children with acute gastroenteritis were enrolled in the study. Screening for common viruses causing gastroenteritis: rotavirus and adenovirus was performed and than stool samples were frozen and stored in $<20^{\circ}\text{C}$ for future simultaneous testing with IDEIA Norovirus (Dakocytomation). Group I noroviruses were found in one child when 16 children were tested positive for Norovirus group two. In total noroviruses were found in 11.4% of children included in the study. Children with norovirus infection were 3 weeks to 15 years old (mean age 5.9 years). Seasonal peak of norovirus infection was seen in September through December. The infectious agent has not been identified in 43% of investigated children. Our results support important role of noroviruses as a causing agent of gastroenteritis in children in Northeastern Poland. The importance of noroviruses may grow as rotavirus infections are likely to be eliminated due to wide introduction of vaccine in the nearest future. Routine testing for noroviruses should be considered in clinical practice.

PIŚMIENNICTWO

1. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an update. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:839-40.
2. Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff CH. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1716-21.
3. Podewils LJ, Zanardi Blevins L, Hagenbuch M, i in. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect* 2007; 135:827-33.

4. van Der Poel WH, Vinje J, van Der Heide R, i in. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 2000;6:36-41.
5. Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, i in. Failure to detect norovirus in a large group of asymptomatic individuals. *Public Health* 2004;118:230-3.
6. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, i in. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154:666-74.
7. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, i in. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002;185:1335-7.
8. Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, i in. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-6.
9. Fretz R, Herrmann L, Christen A, i in. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:214-6.
10. Colomba C, De Grazia S, Giammanco GM, i in. Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:570-5.
11. Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol* 2003;71:82-93.
12. de Bruin E, Duizer E, Vennema H, i in. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 2006;137:259-64.
13. Richards AF, Lopman B, Gunn A, i in. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003;26:109-15.
14. Gonzalez GG, Liprandi F, Ludert JE. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigen in fecal samples from children with sporadic acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2006;136:289-91.
15. Rabenau HF, Sturmer M, Buxbaum S, i in. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Intervirology* 2003;46:232-8.
16. Dimitriadis A, Bruggink LD, Marshall JA. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks. *Pathology* 2006;38:157-65.
17. Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI. Are noroviruses emerging? *Emerg Infect Dis* 2005;11:735-7.

Otrzymano: 19.03.2007 r.

Adres autora:

Dr n. med. Artur Sulik
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
SP DSK AM w Białymstoku
ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok
tel. 85 7450693