

TÜRKİYE'DE 2008 YILINDA ORTAYA ÇIKAN İLK NOROVİRUS SALGINININ LABORATUVAR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF LABORATORY DIAGNOSIS OF THE FIRST NOROVIRUS OUTBREAK IN TURKEY IN 2008

Yavuz UYAR¹, Ahmet ÇARHAN¹, Etem ÖZKAYA¹, Mustafa ERTEK²

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Viroloji Tanı ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

² Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara.

ÖZET

Norovirüsler, dünyada yaygın olarak görülen ve tüm yaş gruplarını kapsayan gastroenteritler ile su/gıda kaynaklı salgınların başlıca etkenlerindendir. Etiyolojik etkenin tanımlanmasının önem taşıdığı gastroenterit salgınlarında, NoV varlığının araştırılması için, hızlı ve güvenilir sonuçlar açısından en az iki farklı metodun kombine olarak kullanılması önerilmektedir. Bakteriyel olmayan gastroenteritlerle ilgili süreyans sistemine sahip olmayan ülkemizde, 2008 yılına kadar "salgın şeklinde" norovirus (NoV) enfeksiyonu bildirimi yapılmamıştır. Bu çalışmada, ülkemizde "ilk kez salgın yapan" NoV'un laboratuvar tanısı ile ilgili bulguların tartışılması amaçlanmıştır. 2008 yılı Mayıs ayından itibaren önce Aksaray olmak üzere, Şereflikoçhisar, Kırşehir ve Adana şehirlerinde "ishal ve bulantı-kusma" ile karakterize olgular ortaya çıkmış; bölgesel laboratuvarlarda yapılan incelemelerde bilinen bakteriyel (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., enterotoksijenik *Escherichia coli*), viral (rotavirus, adenovirus) ve paraziter etkenlerin saptanamadığı bildirilmiştir. NoV açısından değerlendirilmek üzere bu merkezlerden toplam 50 dışkı örneği uygun koşullarda ve soğuk zincir kurallarına uyularak Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarına gönderilmiştir. NoV laboratuvar tanısı için antijen-ELISA (Ridascreen, R-Biopharm, Almanya) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) yöntemleri kullanılmış; dışkı örneklerinin %26 (13/50)'sında antijen, %33 (13/40)'ünde ise nükleik asit pozitifliği saptanmıştır. ELISA ve PCR ile örneklerdeki pozitiflik oranı sırasıyla; Aksaray'da %57 (4/7) ve %71 (5/7), Şereflikoçhisar'da %25 (1/4) ve %25 (1/4), Kırşehir'de %28 (7/25) ve %40 (6/15), Adana'da %7 (1/14) ve %7 (1/14) olarak belirlenmiştir. NoV RNA varlığı saptanan 13 örneğin 9 (%69.2)'unda GI, 4 (%30.8)'ünde ise GII genotipi tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR ile karşılaştırıldığında, ELISA testinin duyarlılığının %61.5, özgüllüğünün %100 olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, yayılım hızı yüksek olan ve ciddi ekonomik ve iş gücü kayıplarına yol açan NoV salgınları ile ilgili olarak, ülkemizde daha geniş epidemiyolojik çalışmalara ve genom dizilimi araştırmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Norovirus, salgın, antijen tespiti, ELISA, gerçek zamanlı PCR, Türkiye.

ABSTRACT

Norovirus (NoV) is one of the most prominent agents of gastroenteritis and water/food-borne outbreaks affecting all of the age groups in the world. As the identification of the etiologic agent is important during gastroenteritis outbreaks, it is recommended to combine two different methods for rapid and reliable laboratory diagnosis of NoV. Although NoV outbreaks have been observed in many different countries of the world, there was no report on “NoV outbreak” in Turkey till 2008 due to the absence of a regular surveillance system for non-bacterial gastroenteritis. This study aimed to present the laboratory results for “the first NoV outbreak” in Turkey in 2008. A number of cases with diarrhea and nausea/vomiting initially emerged in Aksaray (located at the southern part of central Anatolia) in May 2008, followed by cases from Sereflikochisar, Kırşehir, and Adana provinces (located at central and southern Anatolia; geographically closer regions). However, regional laboratories declared that no known bacterial (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., enterotoxigenic *Escherichia coli*), viral (Rotavirus, Adenovirus) and parasitic agents were detected. A total of 50 stool samples were sent to the Virology Reference Laboratory (Refik Saydam Hygiene Center, Ankara) for further investigations including NoV. For the investigation of NoV, the samples were analysed by using antigen-ELISA (Ridascreen, R-Biopharm, Germany) and real-time polymerase chain reaction(PCR) (Roche Diagnostics GmbH, Germany) methods. Of the samples, 26% (13/50) were found antigen positive, whereas 33% (13/40) were positive for viral nucleic acids. The positivity rates determined by ELISA and PCR were as follows, respectively; 57% (4/7) and 71% (5/7) in Aksaray, 25% (1/4) and 25% (1/4) in Sereflikochisar, 28% (7/25) and 40% (6/15) in Kırşehir, 7% (1/14) and 7% (1/14) in Adana. Nine (69.2%), and 4 (30.8%) out of 13 positive samples were genotyped as NoV GI and GII, respectively. The sensitivity and specificity of antigen-ELISA method were found as 61.5% and 100%, respectively, when compared with real-time PCR. In conclusion, further epidemiological studies and genomic analysis are needed for the detection and control of circulating strains in Turkey, since NoV outbreaks spread rapidly and cause serious economical and workforce loss.

Key words: Norovirus, outbreak, antigen detection, ELISA, real-time PCR, Turkey.

GİRİŞ

İshal, her yıl dünyada yaklaşık 1.5 milyar insanı etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Bakteriyel, paraziter ve viral etkenlerle oluşabilen ishalin seviyesi toplumlar arasındaki sosyoekonomik faktörlere (suyun doğru kullanımı, hijyen alışkanlıkları gibi) bağlı olarak değişir¹. Viral gastroenterit salgınları genellikle rotaviruslar, astroviruslar, adenoviruslar ve insan calicivirusları (norovirus ve sapovirus) ile ortaya çıkabilir. Dünyadaki gıda kaynaklı salgınların yaklaşık %28’inden norovirus (NoV) enfeksiyonları sorumludur². Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde yapılan bir araştırmada, sebebi viral ajanlar olarak açıklanmış ishal salgınlarının %60-95’inin norovirus genusu ile oluştuğu bildirilmiştir³.

NoV zarfsız, pozitif polariteli, tek zincirli bir RNA virusu olup virionun çapı yaklaşık 28-35 nm’dir⁴. NoV çevresel etkilere karşı stabil ve 60°C’ye kadar ısıya dayanıklıdır⁵. NoV, RNA polimeraz ve kapsid bölgesinin genetik farklılığına göre en az beş farklı genogruba (GI, GII, GIII, GIV ve GV) ayrılmaktadır^{5,6}. GI, GII ve GIV genotipleri insanlarda gastroenterit ile ilişkilidir^{6,7}. NoV’lar insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturabilir. İnsanlarda NoV enfeksiyonunun kuluçka süresi 12-48 saat olup, hastalık son 12-60 saat içerisinde oluşan kusma, ishal veya her ikisinin birlikte görülmesiyle karakterizedir. Hastalık genellikle 1-3 gün sürmektedir. NoV enfeksiyonu her yaş grubunda görülebilir, ancak kusma, çocuklarda erişkinlerden daha sık rastlanan bir belirtidir. Olguların yarısında hafif ateş (> 37.5°C) olabilir^{6,8}.

lara ait toplam 50 dışkı örneği RSHMB Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarına gönderildi. Testler ya aynı gün çalışıldı ya da örnekler çalışılincaya kadar -20°C’de saklandı.

Antijen-ELISA Testi

NoV antijenin tespitinde GI ve GII genotiplerini tayin edebilen, ticari ELISA kiti (RI-DASCREEN, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Bu yöntemde, mikrokuyucukların yüzeyi monoklonal antikorlar ile kaplı olup dışkıdaki antijeni yakalama özelliğinde idi. Dışkı örnekleri 1:6 (v/v) oranında sulandırıldı ve yöntem firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçüldü. Negatif kontrolün ölçülen optik dansite (OD) değerinin üzerine 0.150 eklenerek “cut-off” değeri belirlendi.

Örneklerden Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu ve Gerçek Zamanlı PCR

Falkon tüpü içerisine 5 adet cam boncuk konularak üzerine 0.5 ml kloroform ile 10 ml PBS (Phosphate buffer solution) eklendi. Bu tüp içerisine her dışkı örneğinden yaklaşık 2 g aktarıldı ve dışkı parçalanıncaya kadar mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından tüp, soğutmalı santrifüjde 3500 rpm’de, +4°C’de 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatandan NoV RNA’sı “Roche High Pure Viral RNA” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ekstraksiyon kiti ile elde edildi.

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu iki aşamalı olarak, cDNA sentezi ve PCR olarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi, “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak 10 µl viral RNA örneği içeren toplam 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Takiben, NoV GI ve GII’ye ait 94 bazlık bölge PCR reaksiyonu ile çoğaldı¹². Bu amaçla, her bir örnek için 5 µl cDNA üzerine 15 µl “LightMix” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) reaksiyon karışımı eklendikten sonra LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) cihazına yüklendi. Döngü; 95°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 saniye (45 döngülük), 52°C’de 10 saniye, 72°C’de 5 saniye ve “melting curve”; 95°C’de 20 saniye, 40°C’de 20 saniye, 85°C’de 5 saniye, 45°C’de 30 saniye olacak şekilde gerçekleştirildi.

BULGULAR

RSHMB Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarına Aksaray ilinden 7, Şereflikoçhisar (Ankara) ilçesinden 4, Kırşehir ilinden 25 ve Adana ilinden 14 olmak üzere toplam 50 dışkı örneği NoV açısından incelenmek üzere gönderilmiştir. Kırşehir iline ait örneklerin 15’i PCR incelemesi için uygun kabul edilmiş, 10 örnek ise çalışmaya alınamamıştır. Bu nedenle toplam 40 örnekte gerçek zamanlı PCR çalışılabilmiştir.

Çalışmamızda, örneklerin %26 (13/50)’sında antijen; %33 (13/40)’ünde ise nükleik asit pozitifliği saptanmış; pozitiflik oranlarının şehirlere göre dağılımı Tablo I’de gösterilmiştir. NoV RNA varlığı saptanan 13 örneğin 9 (%69.2)’unda GI, 4 (%30.8)’ünde GII genotipi bulunmuştur. Aksaray örneklerinde PCR pozitif saptanan beş örneğin dördü GI, biri GII; Adana ve Şereflikoçhisar örneklerinden pozitif saptanan birer örnek GI ve Kırşehir örneklerinden pozitif saptanan altı örneğin üçü GI, üçü GII olarak saptanmıştır (Tablo II). Gerçek zamanlı PCR ile karşılaştırıldığında ELISA antijen testinin duyarlılığı %61.5, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.

Tablo I. Norovirus Antijen ve Nükleik Asit Pozitifliğinin Şehirlere Göre Dağılımı

Şehirler (toplam örnek sayısı)	NoV antijen-ELISA Pozitif Sayı (%)	NoV gerçek zamanlı PCR Pozitif Sayı (%)
Aksaray (n= 7)	4 (57)	5 (71)
Şereflikoçhisar (n= 4)	1 (25)	1 (25)
Kırşehir (n= 25)	7 (28)	6* (40)
Adana (n= 14)	1 (7)	1 (7)
Toplam (n= 50)	13 (26)	13* (33)

* Kırşehir ilinden gelen 10 örnekte materyal yetersiz ve/veya uygun olmadığından PCR testi çalışılmamıştır.

Tablo II. Norovirus Antijen ve Nükleik Asit Sonuçları ile Genotiplerin Şehir ve Olgulara Göre Dağılımı

Şehirler	Olgu no	NoV antijen-ELISA (Ridascreen)	NoV gerçek zamanlı PCR (Roche)	NoV genotipi
Aksaray	1	+	+	GI
	2	+	+	GI
	3	+	+	GII
	4	-	+	GI
	5	-	+	GI
Adana	6	+	+	GI
Şereflikoçhisar	7	+	+	GI
Kırşehir	8	+	+	GI
	9	+	+	GII
	10	+	+	GI
	11	-	+	GI
	12	-	+	GII
	13	-	+	GII

TARTIŞMA

Norovirus (NoV), dünyada tüm yaş gruplarını kapsayan ve yaygın olarak görülen gastroenteritlerin başlıca etkenlerindendir^{6,8}. Ülkemizde, bakteriyel olmayan gastroenteritlerle ilgili surveyans sistemi ne yazık ki mevcut değildir ve Türkiye’de 2008 yılına kadar “salgın şeklinde” NoV enfeksiyonu bildirimi bulunmamaktadır. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde bu konuda iki uzmanlık tezi yapılmıştır. İlk çalışmada (1997-1998), ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile erişkinlerde %8, çocuklarda %28 oranında NoV pozitifliği saptanırken¹³; ikinci çalışmada (2002-2004) çocuk-

larda hastane kaynaklı ishallerde NoV sıklığı %6.9 oranında bulunmuştur¹⁴. Ülkemizde 1998 yılından bu yana varlığı bilinen NoV’lar 2008 yılında “ilk kez” salgın oluşturmuştur. Sağlık Bakanlığı, 22 Mayıs 2008 tarihinde ilk önce Aksaray’da görülen gastroenterit olgularının “Türkiye’deki ilk norovirus salgını olduğunu” resmi olarak açıklamıştır.

Gastroenterit salgınları sırasında etkenin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. NoV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında, hücre kültürü ve deney hayvanları modeli geliştirilememiştir. Bu nedenle NoV tanımlanması için birçok alternatif yöntem kullanılmıştır^{6,8}. Bu amaçla en çok elektron mikroskopi (EM), ters transkripsiyonlu PCR (RT-PCR) ve “in-house” ELISA yöntemlerinden yararlanılmıştır^{8,15}. EM yönteminin dışkıda tespit düzeyi düşük olup (dışkının 1 gramında yaklaşık 10^6 virus partikülü varlığında), iyi yetişmiş bir uzman ve donanıma ihtiyaç vardır¹⁵. ELISA ise, çok özel donanım gerektirmeyen çalışılması kolay bir yöntem olup, başarısı yeterli ve uygun miktarda NoV antijenlerinin varlığına bağlıdır ve duyarlılığı düşüktür^{16,17}. Günümüzde, NoV’un moleküler tanısında RT-PCR teknolojisi veya bu metodun farklı varyasyonları olan gerçek zamanlı veya multipleks gerçek zamanlı RT-PCR protokolleri kullanılmaktadır¹⁷. Bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü son derece yüksek olmakla birlikte, iyi yetişmiş bir uzman elemana ve karmaşık bir cihaz olan “real-time” ısı döngü ekipmanına ihtiyaç vardır. Son yıllarda, NoV’un moleküler ve serolojik tanısı için ticari kitler piyasada yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde NoV salgınlarında, en üst düzeyde laboratuvar performansını yakalamak için en az iki farklı metodun kombine olarak kullanılması önerilmekte ve PCR ve ELISA kombinasyonunun en iyi sonuçları verdiği belirtilmektedir⁸. Bruin ve arkadaşları¹⁷, 158 olgudan RT-PCR ile pozitif tespit edilen 74 (%47)’ünü, “Southern blot” ve sekans (nükleotid dizileme) yöntemlerini kullanarak doğrulamışlardır. Bu sonuçlar ile RT-PCR yönteminin NoV tanısında “altın standart” olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir¹⁷. Türkiye’de ortaya çıkan bu “ilk NoV salgını”nda da, önerilen şekilde iki farklı yöntem seçilmiş ve antijen-ELISA ile gerçek zamanlı PCR yöntemleri için ticari kitler kullanılmıştır.

Çalışmamızda, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile örneklerin %33 (13/40)’ünde NoV RNA varlığı gösterilmiştir. PCR pozitif saptanan 13 olgunun 9 (~%69)’unda GI, 4 (~%31)’ünde GII genotipleri bulunmuştur (Tablo II). Bu sonuçlar, ülkemizde dolaşan NoV genotiplerinin Avrupa’da ve dünyada görüldüğü şekilde yaygın olan GI ve GII olduğunu vurgulamaktadır. 1990 yılından bu yana küresel gastroenterit epidemileri yapan genogrup genellikle NoV GII’dir¹⁸. 1995-1996 yıllarında ABD’de gastroenterit salgınlarının %55’inde GII US95/96 suşu etken olarak saptanmıştır¹⁹. Sonrasında bu etken 1997- 2000 yılları arasında beş kıtada yedi ayrı ülkeye de yayılmıştır^{20,21}. NoV GII’ye bağlı gastroenteritler 2004 yılı boyunca Avrupa²², ABD²³ ve Avustralya²⁴’da görülmüştür. Japonya’da 2001-2003 yıllarında meydana gelen salgınlarda NoV GII tespit edilirken GI saptanmamıştır²⁵. Finlandiya’da 1998-2003 yılları arasında görülen NoV salgınlarında, GI ve GII yaygın olarak saptanmıştır²⁶. Hollanda’da 2002-2003 yıllarında görülen 23 salgından 16’sı NoV ile oluşurken, bunların 13’ünde GII, üçünde GI varlığı gösterilmiştir¹⁷.

Bruin ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında, ticari ELISA kitinin duyarlılık ve özgüllüğü, al-tın standart olarak kullanılan RT-PCR ile karşılaştırılmış; 10 (%6) örnekte her iki yöntem-le de pozitiflik, 71 (%45) örnekte her iki yöntemle de negatiflik saptanırken, 77 (%49) örnekte kullanılan yöntemlerin herhangi birisi ile pozitiflik tespit edilmiştir. Bizim çalışma-mızda, örneklerin %33 (13/40)'ünde PCR ile NoV RNA varlığı gösterilmiş, örneklerin %67.5 (27/40)'inde ise hem PCR hem de ELISA ile negatiflik saptanmıştır. Buna karşın ELISA ile antijen varlığının araştırıldığı 50 örneğin 8 (%16)'inden pozitif sonuç alınmış, bu sekiz örnekte PCR ile de pozitiflik saptanmıştır (Tablo I). Dolayısıyla, gerçek zamanlı PCR ile tespit edilemeyen ve antijen-ELISA ile reaktif bulunan olguya rastlanmamıştır. Bruin ve arkadaşları¹⁷, RT-PCR temel alındığında "Ridascreen" kitinin duyarlılığını %36, özgüllüğünü %88 olarak bildirirken; Schmid ve arkadaşları²⁷ gerçek zamanlı PCR ile kar-şılaştırıldığında bu oranları sırasıyla %36.3 ve %65.3 olarak rapor etmişlerdir. Sanz ve ar-kadaşları²⁸ RT-PCR'yi temel aldıkları çalışmalarında, Ridascreen ELISA antijen kitinin du-yarlılık ve özgüllüğünü %80 ve %90; Castriciano ve arkadaşları²⁹ RT-PCR ve EM referans alındığında %69.2 ve %100 olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak yapılan çalışmalarda du-yarlılık %36-80, özgüllük %65-100 oranları arasında değişmektedir. Çalışmamızda, ger-çek zamanlı PCR ile karşılaştırıldığında ELISA antijen testinin duyarlılığı %61.5 ve özgül-lüğü %100 olarak bulunmuştur.

Laboratuvar tarafından NoV tanısı konulduğunda; hastaların gereksiz antibiyotik kul-lanması önlenmiş olacaktır. NoV enfeksiyonunda bulaşın önlenmesi için hijyen kuralları önemlidir. Ayrıca, gıda, su, kişisel temaslar ve çevresel yüzeyler aracılığıyla kolay bulaş-ma olduğundan, NoV ilişkili salgınları kontrol etmek güçtür. NoV bulaşına karşı, tuvalet kağıdı kullanılması, tuvalet sonrası el temizliğinin su ve sabunla çok iyi yapılması ve sık sık ellerin yıkanması önerilmektedir. Salgınlar çoğunlukla su ve gıda kaynaklı olduğundan bu kaynakların kontamine olmasını engelleyici önlemler korunmada önemlidir. Su kay-nağının kontamine olması kuşkusunda yüksek klor konsantrasyonları (> 10 mg/l) 30 da-kika veya daha uzun süre uygulanırsa yararlı olabilir¹³. Bebek ve çocuk bakımı yapanla-rın el temizliğine özellikle dikkat etmeleri, kapı kolları, masa, sandalye gibi eşyaları çama-şır suyu ve deterjanlarla sık sık temizlemeleri tavsiye edilmektedir. Hastaneye yatırılan hastalar için enterik koruma önlemleri uygulanır. Hasta çıkartılarıyla temas eden sağlık personeli eldiven ve maske kullanmalıdır. Temas sonrası hijyenik el yıkama yapılmalıdır. Kontamine çevre %5-10 oranında sulandırılan ve taze hazırlanan çamaşır suyu ile temiz-lenmelidir¹³.

NoV salgınları, diğer ishal salgınlarında olduğu gibi ciddi ekonomik ve iş gücü kayıp-larına neden olmaktadır³⁰. Kısa sürede büyük popülasyonu etkileyebilmesi ve bir turizm ülkesi olmamız nedeniyle herhangi bir olumsuzluğa sebebiyet vermemesi açısından ishal salgınlarında hızlı laboratuvar tanısı önemlidir. Bu çalışma ile, Türkiye'de "ilk kez salgın yapan" NoV gastroenteritinin laboratuvar tanısı, genotip tayini ve laboratuvar sonuçla-rının tartışılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak ülkemizde dolaşan NoV suşlarının tespiti ile birlikte daha geniş epidemiyolojik çalışmalara ve genom dizilimi araştırmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Aksaray, Ankara, Kırşehir ve Adana İl Sağlık Müdürlüklerine bu salgının sonuçlandırılmasında gösterdikleri iş birliği için, Aksaray ilinden gelen ilk grup örneklerin test edilmesinde ve etkenin belirlenmesindeki yardımları için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Sayın Dr. Kenan Midilli’ye ve testlerin kısa sürelerde çalışılmasında gösterdikleri gayretlerinden ötürü RSHMB Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365: 1147-52.
2. Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 964-9.
3. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 607-25.
4. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinje J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26: 187-205.
5. Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses, pp: 841-74. In: Knipe DM, Howley PM (eds), *FIELDS Virology*. 2001, 4th ed. Lippincott- Raven, Philadelphia.
6. Centers for Disease Control and Prevention. “Norwalk-like viruses”: public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001; 50 (No. RR-9): 1-17.
7. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; 346: 312-23.
8. Rabenau HF, Stürmer M, Buxbaum S, Walczok A, Preiser W, Doerr HW. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Intervirology* 2003; 46: 232-8.
9. Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, et al. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 802-10.
10. Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2004; 58: 42-9.
11. Becker KM, Moe CL, Southwick KL, McCormack JN. Transmission of Norwalk virus during football game. *N Engl J Med* 2000; 343: 1223-7.
12. Hoehne M, Schreier E. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 69.
13. Öztürk R. Norovirus Enfeksiyonları. www.ekmud.org/tr
14. Özdamar M. Pediatrik nozokomiyal ishallerde viral etkenlerin saptanması. Uzmanlık Tezi, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. İstanbul, 2004.
15. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 15-37.
16. Vipond IB, Pelosi E, Williams J, et al. A diagnostic EIA for detection of the prevalent SRSV strain in United Kingdom outbreaks of gastroenteritis. *J Med Virol* 2000; 61: 132-7.
17. de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 2006; 137: 259-64.
18. Tu ET, Nguyen T, Lee P, et al. Norovirus GII. 4 strains and outbreaks, Australia. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1128-30.
19. 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.

20. Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* 1999; 179: 1334-44.
21. White PA, Hansman GS, Li A, et al. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J Med Virol* 2002; 68: 113-8.
22. Lopman B, Vennema H, Kohli E, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004; 363: 682-8.
23. Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002. *J Infect Dis* 2004; 190: 27-36.
24. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II. 4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 327-33.
25. Onishi N, Hosoya M, Matsumoto A, et al. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis in Soma, Japan, 2001-2003. *Pediatr Int* 2008; 50: 65-9.
26. Maunula L, von Bonsdorff C-H. Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002. *J Clin Virol* 2005; 34: 186-94.
27. Schmid M, Oehme R, Schallast G, Brockmann S, Kimmig P, Enders G. Fast detection of Noroviruses using a real-time PCR assay and automated sample preparation. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 15.
28. Sanz JC, Revilla A, Fernández M, Herranz N, Moreno S, Sánchez-Fauquier A. Assessment of two methods of antigenic detection by ELISA for the diagnosis of norovirus outbreaks. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 564-7.
29. Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, et al. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods* 2007; 141: 216-9.
30. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, et al. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1827-34.