

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA GERBEC

DOLOČANJE NOROVIRUSNIH ANTIGENOV V IZTREBKIH BOLNIKOV Z
ENCIMSKOIMUNSKO METODO

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA GERBEC

**DOLOČANJE NOROVIRUSNIH ANTIGENOV V IZTREBKIH BOLNIKOV Z
ENCIMSKOIMUNSKO METODO**

**DETECTION OF NOROVIRUS ANTIGENS IN STOOL SAMPLES OF PATIENTS
WITH GASTROENTERITIS BY AN ENZYME IMMUNOASSAY**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani) pod mentorstvom prof. dr. Miroslav Petrovca, dr. med. in somentorstvom asist. strok. svet. dr. Mateja Poljšak-Prijatelj, univ. dipl. biol. Praktični del naloge sem opravljala na Zavodu za zdravstveno varstvo Nova Gorica, v mikrobiološkem laboratoriju in v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so pomagali pri nastanku te naloge, predvsem mentorju prof. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med. in somentorici asist. strok. svet. dr. Mateji Poljšak-Prijatelj, univ. dipl. biol. Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem v mikrobiološkem laboratoriju ZZV Nova Gorica za vso pomoč pri praktičnem delu naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med. in somentorstvom asist. strok. svet. dr. Mateja Poljšak-Prijatelj, univ. dipl. biol..

Barbara Gerbec

VSEBINA

1.	UVOD.....	1
1.1.	Norovirus	1
1.2.	Epidemiologija norovirusov	2
1.3.	Patogeneza okužb z norovirusi	3
1.4.	Klinični znaki.....	4
1.5.	Prevenitva	4
1.6.	Dezinfekcijska sredstva	5
1.7.	Stabilnost norovirusov v okolju in na površinah	6
1.8.	Zdravljenje norovirusnih okužb	6
1.9.	Diagnostične metode za ugotavljanje norovirusnih okužb.....	6
1.9.1.	Elektronska mikroskopija	6
1.9.2.	Dokazovanje virusnih antigenov.....	7
1.9.3.	Dokazovanje nukleinske kisline (verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo, RT-PCR)	8
2.	NAMEN DELA	9
3.	MATERIALI IN METODE.....	10
3.1.	Vzorci in reagenti.....	10
3.2.	Priprava vzorcev.....	11
3.3.	Metode.....	12
3.3.1.	Princip encimskoimunskega testa (ELISA).....	12
3.3.2.	Komplet reagentov in laboratorijska oprema.....	12
3.3.3.	Izvedba testa.....	12
3.3.4.	Kontrola kvalitete.....	13
3.3.5.	Interpretacija rezultatov	13
4.	REZULTATI.....	15
4.1.	Rezultati preiskav	15
4.2.	Ujemanje rezultatov	15
4.2.1.	Značilnosti vzorcev, ki so bili pozitivni z ELISA testom.....	17
4.2.2.	Specifičnost in občutljivost testa ELISA RIDASCREEN®.....	22
5.	RAZPRAVA	23

6.	SKLEP.....	29
7.	LITERATURA.....	30

KAZALO SLIK

Slika 1:	Norovirus	2
Slika 2:	Elektronska mikroskopija – norovirus	7
Slika 3:	Delež vzorcev po posameznih letih	17
Slika 4:	Pojavnost okužb pri moških in ženskah	17
Slika 5:	Razporeditev pozitivnih vzorcev bolnikov obolelih za okužbo z norovirusi po pošiljateljih, v obdobju od januarja 2007 do decembra 2010	18
Slika 6:	Starost testirancev, ki so bili zajeti v raziskavo od januarja 2007 do decembra 2010	19
Slika 7:	Delež posamezne starostne skupine	19
Slika 8:	Pojavnost okužb po mesecih v letih 2007 do 2010	20
Slika 9:	Pojavnost glede na epidemijo oziroma sporadičnost	20
Slika 10:	Ustanove iz katerih so bili poslani vzorci kot sporadični	21
Slika 11:	Ustanove iz katerih so bili poslani vzorci kot epidemični.	21

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Prikaz razporeditve rezultatov	15
Preglednica II:	Ujemanje rezultatov	15
Preglednica III:	Kategorizacija Kappa vrednosti	16

POVZETEK

Norovirusi so najpogostejši povzročitelji prebavnih težav oz. virusnega gastroenteritisa pri ljudeh po vsem svetu. So zelo kužni, saj je kužni odmerek zelo nizek. Da se okužimo je dovolj že, da pridemo v stik z 18 do 1000 virusi. Prav zato noroviruse zelo pogosto določimo v vzorcih blata bolnikov, pri katerih drugih povzročiteljev gastroenteritisa ne najdemo.

Hitro določanje virusnih antigenov je zelo pomembno za preprečitev nadaljnjega širjenja okužbe.

V diplomskem delu smo določali virusne antigene z encimskoimunskim testom, nato pa smo rezultate primerjali z molekulskimi metodami – z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) za določanje nukleinske kisline norovirusov. Z izbranim diagnostičnim kompletom ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) smo določili specifičnost 78% in občutljivost 56% glede na RT-PCR kot izbrano referenčno metodo. Ocenjujemo, da je encimskoimunski test sicer slabo občutljiv, a je to verjetno dovolj za hitro ugotavljanje okužb in izbruhov. Za bolj zanesljivo diagnostiko je potrebna izvedba testa PCR.

ABSTRACT

Noroviruses are the most common agents of gastrointestinal disorders and viral gastroenteritis in humans worldwide. They are highly contagious, with the infectious dose being as low as 18 to 1000 viruses. It is for this reason that the noroviruses are very commonly detected in stool samples of gastroenteritis patients in whom other agents of this disease cannot be found.

Rapid detection of viral antigens is essential for prevention of further spread of the infection.

The aim of this thesis was the detection of norovirus antigens using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results were compared to the results obtained by the molecular methods – reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of norovirus nucleic acid. The chosen ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3rd generation diagnostic kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) demonstrated a specificity of 78% and a sensitivity of 56% in comparison with the RT-PCR as the chosen reference method. We estimate that the enzyme immunoassay is poorly sensitive, but this is probably enough for a rapid identification of outbreaks. For a more reliable diagnostics PCR test is needed.

SEZNAM OKRAJŠAV

ELISA	encimskoimunski test
PCR	verižna reakcija s polimerazo
P _e	pričakovano ujemanje
P _o	opazovano ujemanje
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo

1. UVOD

1.1. Norovirusi

Prvi pojav bolezni, ki so ga povzročili kalicivirusi, so opisali leta 1932 na farmi v Kaliforniji. Zboleli so prašiči (1).

Noroviruse so prvotno imenovali tudi virusu Norwalk podobni virusi, zato ker so jih leta 1972 Kapikian in sodelavci našli z elektronsko mikroskopijo v vzorcih fecesa v epidemiji, ki se je pojavila na osnovni šoli v mestu Norwalk, v državi Ohio v ZDA (2).

V virusno družino *Caliciviridae* spadajo rodovi: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* in *Nebovirus* po ICTV, to klasifikacijo je izdalo mednarodno združenje za taksonomijo virusov leta 2011. Človeške kaliciviruse predstavljata rodova *Norovirus* in *Sapovirus*. Lagovirusi, vezivirusi in nebovirusi pa povzročajo okužbe pri živalih (3).

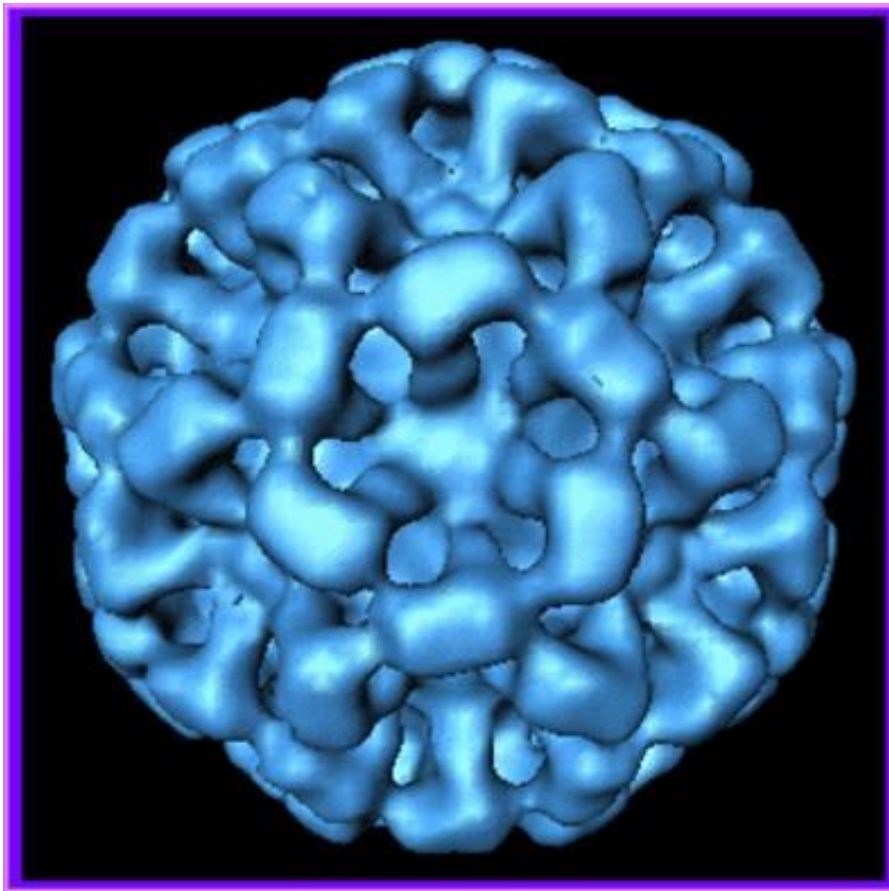
Predstavniki družine *Caliciviridae* so majhni virusi brez ovojnice. So ikozaedrične oblike in imajo na površini čašaste vdrtine. Premer kapside je 41 do 46 nm (4).

Genom je enovijačna pozitivno polarna RNA. Velikost genoma je približno 7600 nukleotidov (5).

Kalicivirusi se ne razmnožujejo v celičnih kulturah, niti v poskusnih živalih, zato je proučevanje njihove biologije zelo težko.

Rod *Norovirus* se glede na genetsko različnost v genomski regiji, ki nosi zapis za polimerazo in kapsido, deli v pet genskih skupin (G); in sicer: GI, GII, GIII, GIV in GV. GI in GII ter GIV povzročajo okužbe pri ljudeh. V genski skupini I je pri človeških norovirusih opisanih 15 genotipov, v genski skupini II pa 18 genotipov (6,7).

V Sloveniji je bilo v desetih letih prijavljenih 187 izbruhov okužb z norovirusi. V večini primerov so jih povzročili sevi GII.4.(8).



Slika 1: Norovirus (<http://www.sph.emory.edu/moelab/Projects-Viral.htm>).

Na zgornji sliki je slika norovirusa posneta s krioelektronsko mikroskopijo.

Slika 1 predstavlja ikozaedrično strukturo virusa. To strukturo sestavlja 180 kopij kapsidnega proteina. Na obodu kapside so vidne značilne čašaste vdolbine. Te so še najbolj izražene pri rodu Sapovirus (9).

1.2. Epidemiologija norovirusov

Norovirusne okužbe in izbruhi okužb z norovirusi se pojavljajo skozi vse leto. Obolevajo ljudje vseh starosti, od majhnih otrok do starostnikov, okužba je nevarna pri bolnikih z imunsko pomanjkljivostjo in pri ljudeh po presaditvi organov (8).

Pri otrocih starih do pet let so norovirusi poleg rotavirusov, drugi najpogostejši povzročitelj težkih gastroenteritisov. Ker je v tujini, predvsem v ZDA, že zelo veliko otrok cepljenih proti rotavirusom, bi lahko norovirusi v prihodnosti postali tudi najpogostejši povzročitelji virusnih okužb pri otrocih (10).

Okužba z norovirusi ne spodbudi dolgotrajne imunosti. Imunost traja le 6 do 14 tednov. Možne so tudi ponovne okužbe zaradi genetske variabilnosti virusov (11). Navadno se pogostejše pojavljajo v jesenskih in zimskih mesecih. Norovirusi se zelo hitro širijo v zaprtih institucijah, kot so bolnišnice, domovi za ostarele, šole, vrtci in drugih (12).

1.3. Patogeneza okužb z norovirusi

Norovirusi so zelo kužni. Za okužbo z njimi je dovolj, da pridemo v stik z 18 do 1000 virusi (13).

Prenašajo se fekalno-oralno, aerogeno in kontaktno (14).

Osebe, ki se okužijo z norovirusi, viruse izločajo z blatom. Če si ne umivajo rok, viruse prenašajo naprej na druge osebe. Ta način okužbe imenujemo fekalno-oralni način prenosa. Ker so virusi odporni na kislino, preživijo v želodcu in potujejo naprej do tankega črevesa, kjer se razmnožujejo. Zaradi razmnoževanja virusov v črevesni sluznici, se lahko pojavi vnetje notranje plasti sluznice in morfološke spremembe epitelijskih celic. Driska nastane kot posledica difuzije vode in ionov iz subepitelijskih kapilar v črevesno svetlino zaradi oslabljenih tesnih stikov med epitelijskimi celicami. Da se sluznica črevesja po okužbi popolnoma obnovi, potrebuje vsaj dva tedna (15).

Virusi se izločajo tudi pri bruhanju. Če pridemo v stik s kužnimi kapljicami, ki se sproščajo pri bruhanju se prav tako lahko okužimo (8).

Kontaktno se lahko z norovirusi okužimo preko onesnaženih površin in predmetov, pa tudi neposredno preko kontaminiranih rok z okužene osebe na zdravo osebo (8).

Norovirusi pa se lahko prenašajo še preko okužene vode, ali pa preko tihih klicenoscev (16). Tihi klicenosci so ljudje, ki nimajo težav in so na videz popolnoma zdravi, a viruse izločajo z blatom. Ljudje po preboleli okužbi izločajo viruse še nekaj dni.

1.4. Klinični znaki

Inkubacijska doba, to je čas od okužbe do pojava bolezni, traja od 12 do 48 ur. Bolezen nastopi iznenada. Poteka z eksplozivnim bruhanjem in drisko. Pogosto so pri bolnikih prisotne bolečine in krči v trebuhu, glavobol in rahlo povišana telesna temperatura. Za akutno fazo bolezni je značilno ponavljajoče bruhanje. Približno 10% bolnikov potrebuje zdravljenje v bolnišnici, z rehidracijo. Zdravi ljudje si opomorejo v enem do treh dneh, pri starostnikih se lahko driska za nekaj dni podaljša. Bruhanje je pogostejše pri osebah starejših od enega leta, pri otrocih, ki so mlajši od enega leta pa je pogostejša driska. V nasprotju z bakterijskimi okužbami v iztrebkih nikoli ni krvi, sluzi in levkocitov. Približno 30% ljudi nima kliničnih znakov, kar so ugotovili s poskusi na prostovoljcih (8).

Glavobol, bolečine v trebuhu in povišano telesno temperaturo zdravimo z analgetiki in antipiretiki (17).

Ljudje prebavne težave pogosto imenujejo trebušna gripa, čeprav z gripo nimajo nobene povezave.

1.5. Preventiva

Pri okužbah z norovirusi je zelo pomembna hitra diagnostika, da odkrijemo povzročitelja in preprečimo njegovo nadaljnje širjenje. Pomembno je tudi, da izvedemo vse preprečevalne ukrepe, ki jih bomo opisali v nadaljevanju.

Širjenje okužbe z norovirusi preprečimo z rednim umivanjem rok, zlasti po uporabi stranišča, menjavi plenice, pred pripravo hrane ter v zdravstvenih ustanovah po kontaktu z obolelimi pacienti. Bolniki, ki pravkar prebolevajo okužbo, naj ostanejo doma, da je ne širijo naprej, in naj se vrnejo v normalno življenje najmanj 24 ur po prenehanju driske oz. bruhanja. Najbolje pa je, če počakajo 72 ur (18).

Bolniki naj prav tako ne obiskujejo družin, ki imajo majhne otroke, kronične bolnike ali starejše člane. Okužene osebe naj ne pripravljajo hrane. Če so okužene osebe zaposlene v živilski stroki oziroma v restavracijah, morajo nujno ostati doma.

Površine, ki so prišle v stik z okuženimi izločki (blatom ali izbruhanino), moramo čim prej očistiti s klornim razkužilom (18). Oblačila in posteljnino, ki so onesnažena z izločki čim prej operemo pri najmanj 60°C (18).

V bolnišnicah in domovih za ostarele ter drugih podobnih ustanovah je mogoče tveganje za izbruh z norovirusi zmanjšati z doslednim izvajanjem ukrepov za obvladovanje okužb. To so enotni ukrepi, ki jih je potrebno izvajati pri vseh bolnikih: higiena rok (umivanje, razkuževanje in uporaba rokavic), uporaba maske, zaščitnega plašča, čiščenje površin in opreme, premestitev oziroma pravilna namestitev bolnikov z okužbo ter pravilno ravnanje s perilom, kužnimi pripomočki in odpadki (19).

1.6. Dezinfekcijska sredstva

Za čiščenje površin uporabljamo čistila, ki vsebujejo klor oziroma natrijev-hipoklorit. Čistilno raztopino pripravimo tako, da pripravimo 2% raztopino Na-hipoklorita (20). S tako pripravljeno raztopino očistimo površine v bolnikovi okolici, še posebej, če so prišle v stik z bolnikovimi izločki.

Roke si očistimo tako, da jih najprej dobro umijemo s toplo vodo in milom, nato pa jih razkužimo z alkoholnim razkužilom, ki vsebuje več kot 60% alkohola, saj so pri preizkušanju delovanja različnih čistil ugotovili, da 60% etanol in izopropanol nista učinkovita (8).

Pri čiščenju iztrebkov, izbruhanin in odstranjevanju onesnaženega perila si mora osebje nadeti rokavice, zaščitno obleko in masko. Pri delu je zelo pomembno, da ne pride do ustvarjanja aerosolov (8). Viruse uniči tudi temperatura višja od 60°C, saj norovirusi ostanejo kužni pri temperaturah nižjih od 60°C (8).

1.7. Stabilnost v okolju in na površinah

Norovirusi lahko preživijo v okolju pri temperaturah do 60°C. Obstojni so tudi na površinah, v bazenskih in pitnih vodah, v surovi hrani, kot so školjke, sadje in zelenjava (8).

1.8. Zdravljenje norovirusnih okužb

Specifičnega zdravila za zdravljenje norovirusnih okužb ni. Zdravljenje temelji na nadomeščanju izgubljene tekočine. Obolelim nadomeščamo tekočino sproti s pitjem izotoničnih tekočin.

Ljudje, ki jih bolezen zelo prizadene, potrebujejo hospitalizacijo, kjer jim intravensko nadomeščajo tekočino (17).

Za tiste, ki zelo pogosto bruhamo nekateri priporočajo antiemetike, v kritičnih stanjih se odraslim lahko daje snovi za zmanjšanje gibljivosti črevesja in za zmanjšanje števila odvajanj. Farmakoloških sredstev pri otrocih ne priporočajo (8).

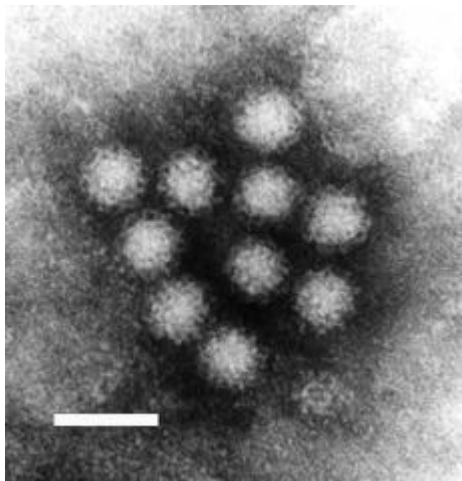
1.9. Diagnostične metode za ugotavljanje norovirusnih okužb

1.9.1. Dokazovanje prisotnosti virusa: elektronska mikroskopija

Elektronska mikroskopija je v preteklosti veljala za glavno diagnostično metodo, saj človeških norovirusov ni mogoče gojiti v celičnih kulturah. Šele po uspešnem kloniranju genoma norovirusov so elektronsko mikroskopijo nadomestile molekularne metode, kot je RT-PCR (5).

Metoda negativnega kontrastiranja v elektronski mikroskopiji je bila osnova za dokazovanje okužb z norovirusi do 90. let prejšnjega stoletja. Težava pa je v tem, da je metoda nizko občutljiva, saj je za dokaz virusa potrebno vsaj milijon virusov na mililiter iztrebka. Norovirusi pa se v iztrebkih izločajo v zelo majhnih koncentracijah do 1000 virusnih delcev v mililitru iztrebka. Zaradi tega so bili lažno negativni rezultati pogosti, saj

je bilo dokazovanje virusov v iztrebku mogoče le do 48 ur po prenehanju kliničnih znakov bolezni. Norovirusi tudi nimajo značilne strukture, zato jih je zelo težko ločiti od podobnih virusov z nejasno morfologijo (5).



Slika 2: Elektronska mikroskopija - norovirus

(<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Norwalk.jpg>)

Slika 2 prikazuje noroviruse, kot jih vidimo z elektronsko mikroskopijo.

V Sloveniji je bila elektronska mikroskopija poglavitna metoda pri določanju norovirusnih okužb do leta 2000, po tem letu pa viruse določamo z RT-PCR.

1.9.2. Dokazovanje virusnih antigenov

Najpogosteje uporabljamo ELISA metode, in sicer sistem dvojnih protiteles ali sendvič metodo. Reakcijo izvedemo tako, da izbrana virusna protitelesa vežemo na trden nosilec, nato dodamo vzorec. Če so v vzorcu ustrezni virusni antigeni, nastane kompleks antigenov in protiteles. Dodamo sekundarno protitelo označeno z encimom in po inkubaciji dobro speremo. Na koncu dodamo še substrat, ki po delovanju encima spremeni barvo. Z opazovanjem spremembe barve ali z merjenjem absorbance pri predpisani valovni dolžini kvalitativno ugotovimo, ali so v testiranem vzorcu antigeni (21).

Imunokromatski testi zaznavajo prisotnost norovirusnih antigenov v vzorcih blata in so kvalitativna metoda. Ob prisotnosti virusnih antigenov pride na testni ploščici do reakcije med obarvanimi monoklonskimi protitelesi in virusnimi antigeni. Imunokromatske metode

so hitre in preproste za izvedbo ter imajo visoko specifičnost in občutljivost. Primerne so za zgodnje ugotavljanje okužb in izbruhov, podobno kot encimskoimunski testi.

1.9.3. Dokazovanje nukleinske kisline (verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo, RT-PCR)

Ta metoda je postala običajna diagnostična metoda po tem, ko sta Jiang in De Leon leta 1992 prva uspela pomnožiti RNA virusa Norwalk (22).

Zaradi velike genetske raznolikosti pri družini *Caliciviridae* je bilo zelo težko predvideti začetne oligonukleotide s primerno občutljivostjo in specifičnostjo, ki bi lahko določevali vse norovirusne seve. Za diagnostiko se uporabljajo specifični začetni oligonukleotidi, ki nalegajo na dobro ohranjen del genoma, ki kodira polimerazo (23). Za razlikovanje med genskimi skupinami pa se uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki so specifični za kapsidni del RNA, ki kodira kapsidno beljakovino (23).

Velik napredek je bil razvoj RT-PCR v realnem času. Pri tej reakciji je mogoče hkratno pomnoževanje nukleinske kisline in detekcija pomnoženega produkta PCR s fluorescentnim barvilom. Ker obe reakciji potekata istočasno, je ta metoda veliko hitrejša od običajne metode RT-PCR. Zmanjšana je tudi možnost kontaminacij (24). Tako je metoda RT-PCR v realnem času postala nepogrešljiva pri diagnostiki številnih infekcijskih bolezni.

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preiskusiti komercialni komplet za določanje norovirusnih antigenov ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R Biopharm, Darmstadt, Nemčija) pri bolnikih z epidemičnim gastroenteritisom, kjer patogenih bakterij in rotavirusov nismo našli.

Testirali bomo torej iztrebke 126-tih bolnikov pri katerih v iztrebkih nismo našli niti bakterij, niti rotavirusov. Vzorce bomo analizirali s komercialnim kompletom, da bi ugotovili ali je ta encimskoimunska metoda dovolj hitra, enostavna in zanesljiva za pregledovanje večjega števila vzorcev pri sumu na norovirus, kot povzročitelja epidemij, v primerjavi RT-PCR kot referenčno metodo. Z uvedbo encimskoimunske metode bi zmanjšali čas od rezultata do ukrepanja za zajezitev izbruha. Zanimalo nas bo tudi ali so okužbe z norovirusi v Sloveniji povezane s spolom, starostjo ter z letnim časom.

Molekulskih metod ne bomo opisovali, saj bomo iskali hiter pa tudi dovolj zanesljiv test, ki bi ga lahko izvajali v slabše opremljenih in manj usposobljenih laboratorijih.

Vzorce bomo z reagenčnim kompletom testirali na ZZV Nova Gorica. Rezultate bomo nato primerjali z molekulskimi metodami določanja norovirusov (RT-PCR), ki bodo izvedene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Vzorci in reagenti

a) Vzorci

V nalogo smo vključili 126 vzorcev blata bolnikov, obolelih za gastroenteritisom obeh spolov in različnih starosti, ki smo jih od januarja 2007 do decembra 2010 preiskali v mikrobiološkem laboratoriju ZZV Nova Gorica z ELISA metodo, nato pa smo te vzorce poslali v potrditev še na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo MF v Ljubljani, za dokaz nukleinske kisline norovirusov. Vzorci so bili odvzeti hospitaliziranim bolnikom v bolnišnici v Novi Gorici ter bolnikom ob obisku zdravnika v zdravstvenih domovih v goriški regiji, ter iz domov upokojencev v goriški regiji.

Vzorci so bili do preiskave oziroma največ tri dni shranjeni v hladilniku pri 2 do 8°C, na molekulsko testiranje v Ljubljano pa so bili poslani v hladilnih torbah. Pred testiranjem smo vzorce v laboratoriju ogreli na sobno temperaturo (20-22°C).

b) Reagenti: komercialni diagnostični komplet RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija), ki vsebuje:

- mikrotitrne ploščice, ki imajo v luknjicah vezana specifična protitelesa usmerjena proti antigenom GI in GII,
- pufer za spiranje, ki ga predhodno pripravimo tako, da zmešamo 10 mL koncentriranega pufra in 90 mL destilirane vode ter dobro premešamo. (Pufer je uporaben 4 tedne, če ga hranimo v hladilniku pri 2-8°C),
- negativna kontrola : razredčitveni pufer,
- pozitivna kontrola: beljakovine virusne ovojnice,
- konjugat 1: protitelesa proti norovirusom označena z biotinom,
- konjugat 2: streptavidin peroksidaza v stabilizirani beljakovinski raztopini,
- substrat: TMB,
- stop reagent: 1N žveplena kislina,
- razredčitveni pufer za vzorce: fiziološka raztopina s proteini.

Reagente smo hranili v hladilniku. Pred uporabo smo jih ogreli na sobno temperaturo (20-22°C). Mikrotitrsko ploščico smo do uporabe hranili v originalni vrečki, da se ni navlažila.

Neuporabljene dele ploščice smo hranili v vrečki, ki smo jo neprodušno zaprli in shranili v hladilniku. Vse reagente smo dobro premešali. Nikoli nismo mešali reagentov različnih serij komercialnega reagenta.

c) Aparature

Spektrofotometer Humanreader, (Human, Wiesbaden, Nemčija) na katerem smo merili absorbanco.

Pri delu smo uporabili tudi:

- avtomatske pipete za pipetiranje vzorcev, kontrol in ostalih reagentov,
- večkanalno pipeto (300 μ L),
- staničevino
- rokavice za enkratno uporabo,
- nastavke za pipete,
- centrifugo
- laboratorijsko uro
- zbiralnik za infektivne odpadke

3.2. Priprava vzorcev

Vzorci smo od sprejema do začetka preiskave hranili v hladilniku. Vzorce blata smo pred preiskavo redčili v razredčitvenem pufu za vzorce iz ELISA kompleta, in sicer približno 100 μ L tekočega blata ali 50-10 mg formiranega blata smo suspendirali v 1mL pufu. Nato smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 5000 obr/min. Za preiskavo smo uporabili supernatant.

3.3. Metode

V diplomski nalogi smo dokazovali norovirusne antigene norovirusov z ELISA testom RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija). Vsi vzorci so bili najprej testirani z ELISA testom, nato pa še z molekulsko metodo verižne reakcije s polimerazo PCR.

3.3.1. Princip encimskoimunskega testa (ELISA)

S kompletom določamo norovirusne antigene v blatu bolnikov z gastroenteritisom. Na površini luknjic mikrotitrskih plošč so vezana specifična protitelesa proti antigenom različnih genotipov. Razredčene vzorce blata in kontrole, skupaj z monoklonskimi protivirusnimi protitelesi označenimi z biotinom (konjugat 1) pipetiramo v luknjice. Po inkubaciji ter spiranju dodamo konjugat 2 (streptavidin peroksidaza). Če so v blatu prisotni norovirusi, nastanejo kompleksi v "sendviču", ki so sestavljeni iz imobiliziranih protiteles, norovirusnih antigenov in protiteles konjugiranih z biotin-streptavidin-peroksidazo). Nevezan konjugat 2 se spere. Po dodatku substrata encim v luknjicah spremeni brezbarven substrat-kromogen v modro obarvan produkt. Po dodatku ustavitvenega reagenta se barva spremeni v rumeno. Absorbanco izmerimo pri 450 nm / 630 nm. Intenzivnost barve je neposredno sorazmerna s koncentracijo norovirusov v vzorcu.

Z vsemi kontrolami in reagenti ravnamo kot s kužnim materialom. Substrat moramo zaščititi pred svetlobo. Če se barva neuporabljenega substrata spremeni v modro, ga moramo zavreči.

3.3.2. Komplet reagentov in laboratorijska oprema

Za izvedbo testa smo uporabili komplet reagentov RIDASCREEN® Norovirus (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija).

3.3.3. Izvedba testa

Test smo izvajali v naslednjih korakih:

- V luknjice mikrotitrške ploščice smo nanесли po 100 µL supernatanta redčenega in predhodno centrifugiranega vzorca. V prvi dve luknjici smo nanесли kontrole, v eno smo nanесли po 100 µL negativne kontrole (NK), za kar smo uporabili razredčitveni pufer, v drugo pa 100 µL pozitivne kontrole.

- Nato smo dodali 100 μ L konjugata 1, pretresli na delovni površini in pokrili s folijo.
- Inkubirali smo 60 minut na sobni temperaturi.
- Po končani inkubaciji smo vzorce aspirirali z večkanalno pipeto in vsebino zavrgli v posodo z razkužilom. Nato smo vzorce natančno spirali 5-krat s 300 μ L pufru za spiranje. Po vsakem spiranju smo ploščice nežno potolkli ob staničevino, da se je odstranila vsa zaostala tekočina. S spiranjem se odstrani presežek vzorca in nevezanih protiteles.
- Nato smo v vsako luknjico dodali 100 μ L konjugata 2.
- Sledila je inkubacija, ki je trajala 30 minut, pri sobni temperaturi.
- Po končani inkubaciji smo vzorce aspirirali z večkanalno pipeto in vsebino zavrgli v posodo z razkužilom. Nato smo vzorce natančno spirali 5-krat s 300 μ L pufru za spiranje. Po vsakem spiranju smo ploščice nežno potolkli ob staničevino, da se je odstranila vsa zaostala tekočina.
- Nato smo v vsako luknjico dodali 100 μ L substrata. Encim peroksidaza, vezana na streptavidin, ob dodatku substrata le-tega pretvori v moder produkt. Če do kompleksa med imobiliziranimi protitelesi, antigeni norovirusov in biotin-streptavidin-peroksidaznim kompleksom ne pride, torej če virusni antigeni niso prisotni, se barva ne spremeni.
- Sledila je 15 minutna inkubacija na sobni temperaturi v temi.
- Po končani inkubaciji smo dodali še kapljico usatavitvenega reagenta, ki ustavi encimsko reakcijo in spremeni modro barvo v rumeno.
- Nato smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 450 in 630 nm.

3.3.4. Kontrola kvalitete

Kontrolo kvalitete za test predlaga proizvajalec.

Absorbanca za negativno kontrolo mora biti manjša od 0,20.

Absorbanca za pozitivno kontrolo mora biti večja od 0,50.

Mejna vrednost (COV) je absorbanca negativne kontrole +0,15.

3.3.5. Interpretacija rezultatov

Vzorec je pozitiven, če je absorbanca vzorca več kot 10% nad mejno vrednostjo.

Vzorec je negativen, če je absorbanca vzorca več kot 10% pod mejno vrednostjo.

Vzorec je dvomljiv ali ekvivokalen, če je absorbanca vzorca med 10% nad in 10% pod mejno vrednostjo. Tak vzorec moramo ponovno testirati. Če pri ponovnem testiranju vzorca ponovno izmerimo vrednost v tem razponu, ga vrednotimo kot negativnega.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati preiskav

V diplomski nalogi smo z encimskoimunskim testom dokazovali prisotnost antigenov norovirusov v iztrebkih bolnikov. Ko smo končali analizo z antigenским testom, smo vzorce poslali še na testiranje z molekulsko metodo PCR.

Preglednica I: Primerjava rezultatov testa ELISA in PCR.

TEST	ŠT. POZ. (%)	ŠT. NEG. (%)	SKUPAJ
ELISA	46 (36,51%)	80 (63,49%)	126
PCR	63 (50%)	63 (50%)	126

Iz preglednice I je razvidno, da smo skupaj testirali 126 vzorcev.

Od tega je bilo z ELISA testom pozitivnih 46 vzorcev, kar je 36,51%, negativnih pa je bilo 80 vzorcev, kar je 63,49%.

Z metodo PCR je bilo pozitivnih 63 vzorcev, kar je 50% in negativnih tudi 63 vzorcev kar tudi predstavlja 50%.

4.2. Ujemanje rezultatov

Preglednica II: Ujemanje rezultatov.

TEST	PCR poz.	PCR neg.	Skupaj
ELISA poz.	30	16	46
ELISA neg.	24	56	80
SKUPAJ	54	72	126

Od vseh 126 vzorcev, ki smo jih testirali, so se rezultati ELISA testa in PCR metode popolnoma ujemali v 86 primerih, kar je 68,25%, kar je razvidno iz preglednice II.

Pozitivnih z obema testoma je bilo 30 vzorcev, kar je 23,81%, negativnih z obema testoma pa je bilo 56 vzorcev, kar je 44,44% od vseh testiranih 126 vzorcev.

Preglednica II nam prikazuje tudi vzorce, pri katerih so se rezultati razlikovali. Prikazuje nam torej lažno pozitivne oziroma lažno negativne vzorce. Lažno negativnih vzorcev glede na metodo PCR je bilo 24, to je 19,05%, lažno pozitivnih vzorcev glede na metodo PCR pa je bilo 16, kar pomeni 12,70%.

Ujemanje rezultatov oziroma Kappa statistika nam dodatno ponazori kako se rezultati ujemajo. Podatke za izračun pridobimo iz preglednice ujemanja rezultatov. Izračunamo ga tako, da izračunamo najprej opazovano ujemanje P_o , nato pričakovano ujemanje P_e , iz tega pa nato izračunamo ocenjevalec zanesljivosti oziroma Kappa statistiko.

$$P_o = (30 + 56) / 126 = 0,68$$

$$P_e = [(46/126) * (54/126)] + [(80/126) * (72/126)] = 0,52$$

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e) = (0,68 - 0,52) / (1 - 0,52) = 0,34$$

Izračun ujemanja rezultatov oziroma Kappa statistika nam da vrednost med 0 in 1.

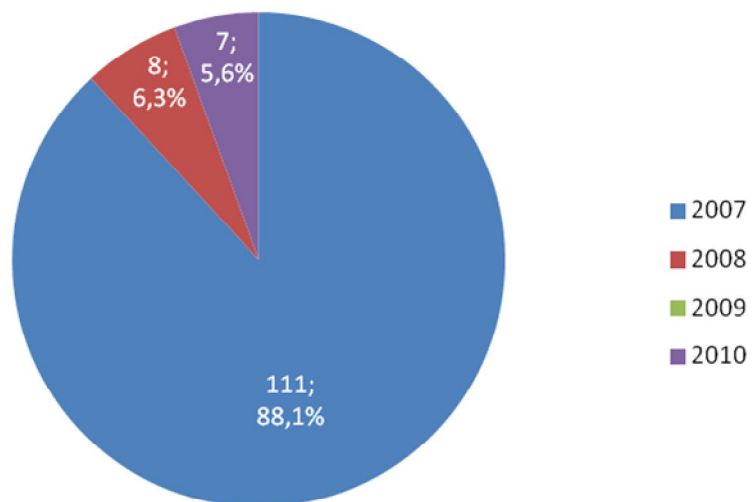
Bolj kot se ta vrednost približa številu 1 boljše je ujemanje rezultatov, ki jih dobimo z dvema različnima metodama. Vrednosti so razporejene v sledeče razrede:

Preglednica III: kategorizacija Kappa vrednosti

	slabo	rahlo	zadovoljivo	zmerno	znatno	skoraj popolno
Kappa	<0	0,01 – 0,20	0,21 – 0,40	0,41 – 0,60	0,61 – 0,80	0,81 – 0,99

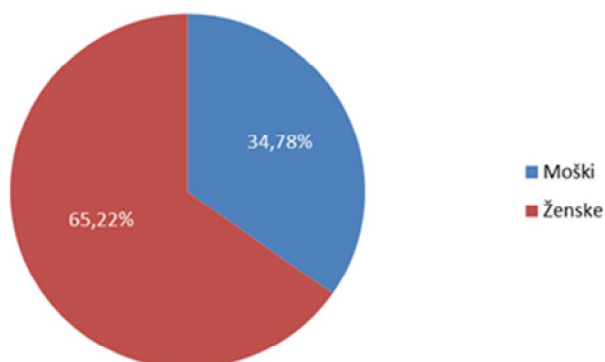
Ujemanje rezultatov oziroma Kappa statistika nam v našem primeru da rezultat 0,34, kar je zadovoljiv rezultat, saj je metoda ELISA izrazito slabše občutljiva kot metoda PCR.

4.2.1. Značilnosti vzorcev, ki so bili pozitivni s testom ELISA



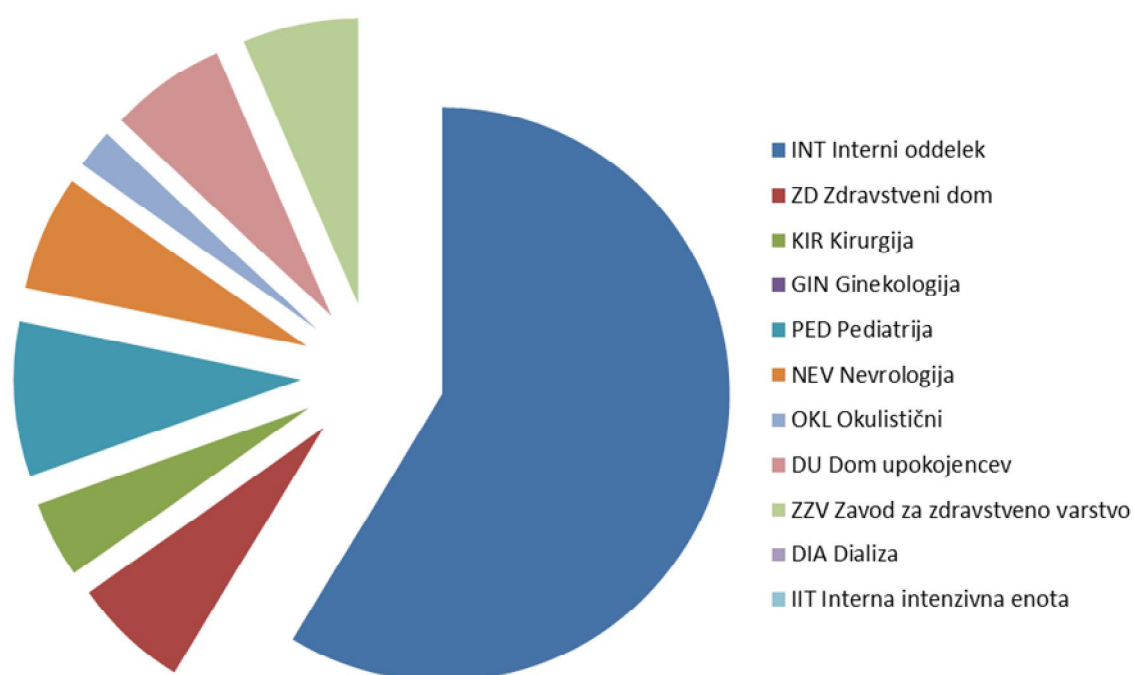
Slika 3: Delež vzorcev po posameznih letih.

Iz slike 3 je razvidno, da je bilo največ vzorcev pregledanih v letu 2007, sledi leto 2008, nato leto 2010, leta 2009 ni bilo nobenega vzorca.



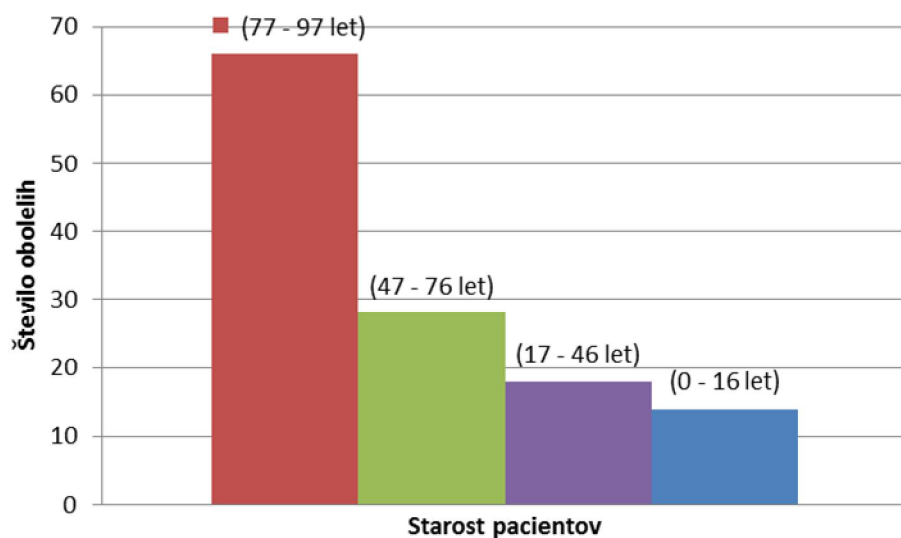
Slika 4: Pogostnost okužb pri moških in ženskah.

Iz slike 4 je razvidno, da je bilo med 126 vzorci je bilo obolelih kar 2/3 žensk.



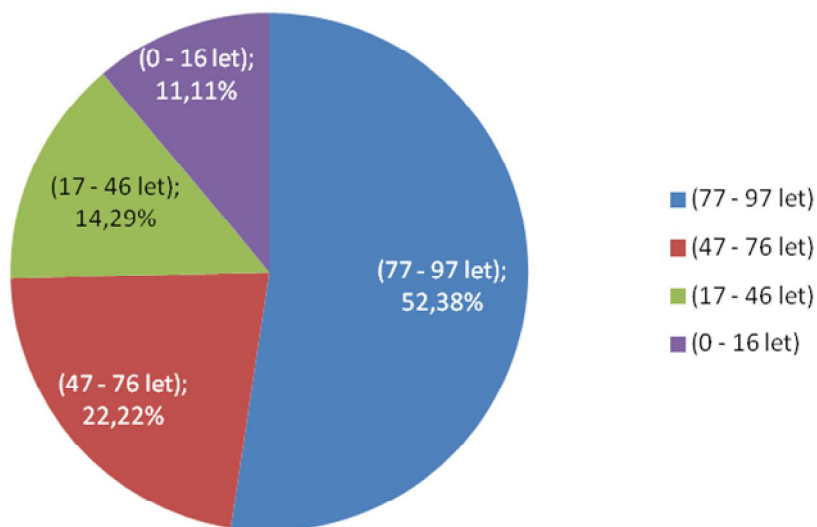
Slika 5: Razporeditev pozitivnih vzorcev bolnikov obolelih za okužbo z norovirusi po pošiljateljih, v obdobju od januarja 2007 do decembra 2010.

Največ pozitivnih vzorcev je bilo poslanih z bolnišničnih oddelkov, in sicer z internih oddelkov 4. a, 5. a in 5. b, sledi pediatrični oddelek, nato pa domovi za ostarele ter zdravstveni dom. Večina vzorcev je bila pridobljena ob epidemijah, ki so se pojavljale v tem časovnem obdobju.

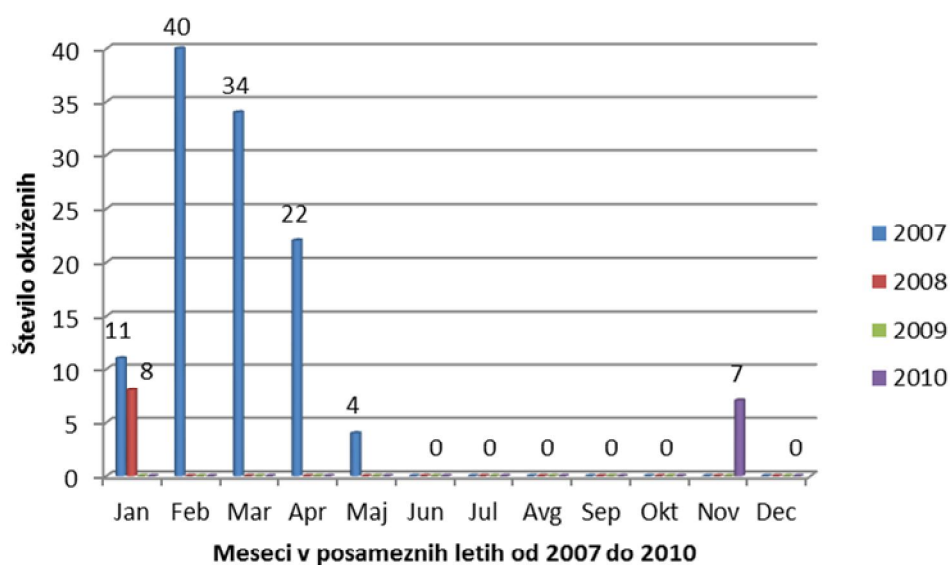


Slika 6: Starost pacientov, ki so bili zajeti v raziskavo od januarja 2007 do decembra 2010.

Večina bolnikov- Slika 6 je bila starostnikov starejših od 77 let. Nekoliko večja pojavnost je bila tudi pri ljudeh, ki so bili stari od 47 do 77 let. Manj obolelih, je bilo starih od 17 do 46 let, še najmanj, pa je bilo starih od 0 do 16 let. Najmanj je bila torej zastopana skupina otrok.

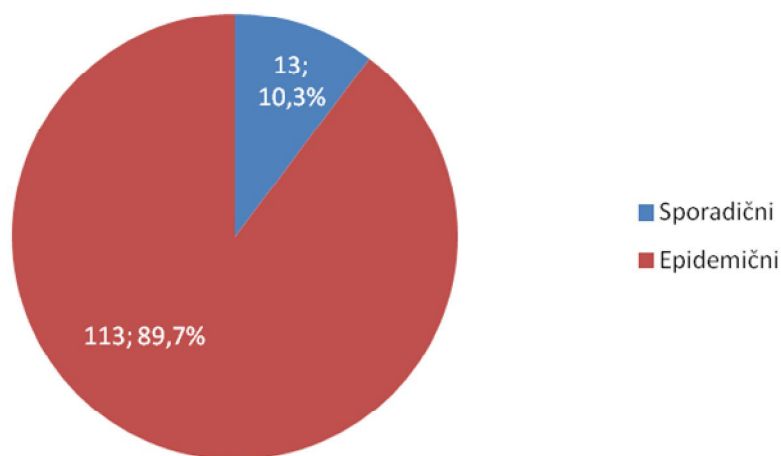


Slika 7: Delež posamezne starostne skupine obolelih.



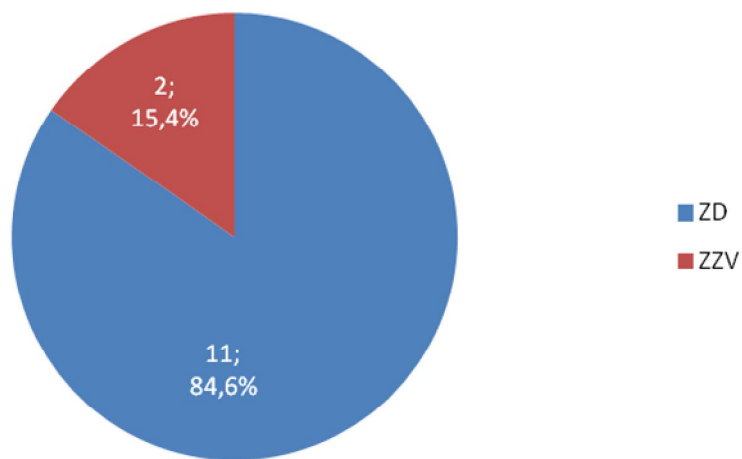
Slika 8: Pojavnost okužb po mesecih v letih 2007 do 2010.

Vzorci smo analizirali več zaporednih let, in sicer od začetka leta 2007 do konca leta 2010, kar nam kaže slika 8. Na podlagi tega smo ugotovili, da je bila pojavnost okužb največja v mesecu februarju leta 2007, sledijo pa mu marec in april ter januar istega leta.



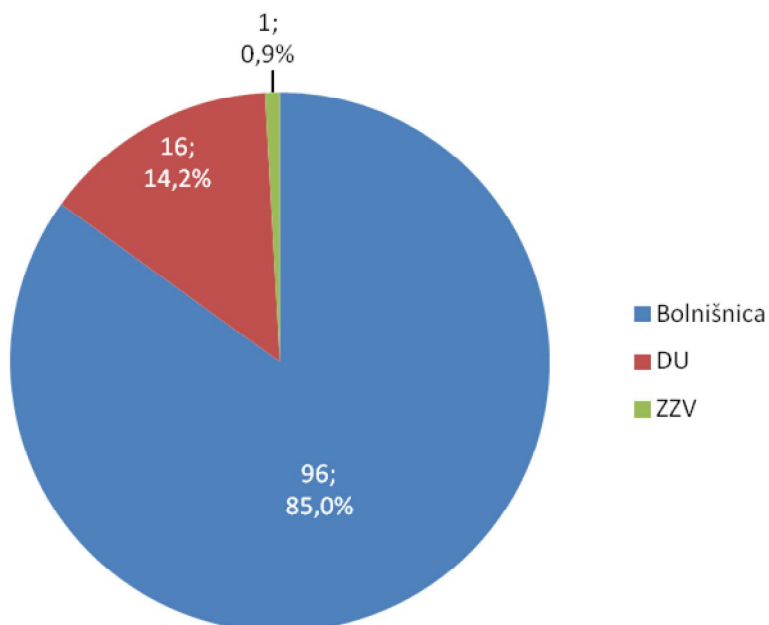
Slika 9: Pojavnost okužb glede na epidemijo oziroma sporadičnost.

Iz slike 9 je razvidno, da je bila velika večina vzorcev odvzeta v času epidemij, in sicer kar 113 od 126, to je 89,7%, ostalih 13 vzorcev, to je 10,3%, je bilo odvzetih bolnikom, pri katerih se je bolezen pojavila sporadično.



Slika 10: Ustanove iz katerih so bili poslani vzorci označeni kot sporadični.

Iz slike 10 je razvidno, da je bilo od 13 sporadičnih vzorcev 11 (84,6%) poslanih iz ambulant v zdravstvenih domovih, 2 (15,4%) vzorca pa smo dobili iz ambulate ZZV Nova Gorica.



Slika 11: Ustanove iz katerih so bili poslani vzorci označeni kot epidemični.

Največ vzorcev (slika 11), ki so bili označeni kot epidemični, je bilo poslanih iz bolnišnice v Šempetru 96 (85,0%), sledili so domovi za ostarele 16 (14,2%), samo 1 vzorec pa je bil poslan iz ambulate ZZV Nova Gorica (0,9%).

4.2.2. Diagnostična specifičnost in občutljivost testa ELISA RIDASCREEN®

Primerjali smo tudi specifičnost in občutljivost testa ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) pri vzorcih glede na rezultate metode PCR, uporabljene kot zlati standard.

Diagnostična občutljivost je sposobnost testa, da za resnično pozitivni vzorec poda pozitiven rezultat. Negativen rezultat pri okuženih osebah pomeni lažno negativen rezultat.

Diagnostična specifičnost testa pa je sposobnost testa, da nam poda negativne rezultate pri osebah, ki so neokužene, torej zdrave.

Občutljivost in specifičnost prikazujeta spodnji enačbi:

$$\text{Občutljivost} = (\text{resnično pozitivni} / (\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni})) \times 100$$

$$\text{Specifičnost} = (\text{resnično negativni} / (\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni})) \times 100$$

Na podlagi rezultatov iz preglednice II smo za ELISA test izračunali občutljivost 56% in specifičnost 78%.

Proizvajalec je za ta test podal občutljivost 78,6% in specifičnost 100%.

5. RAZPRAVA

Gastroenteritis je eno izmed pogostjših obolenj pri ljudeh (5).

V Veliki Britaniji ima letno vsaka peta oseba črevesno okužbo. Vsako leto hospitalizirajo več kot 35 tisoč oseb; od teh približno 300 oseb vsako leto umre (23).

Povzročitelji so lahko zelo različni. Lahko gre za bakterije, parazite ali pa viruse. Najbolj pogosti povzročitelji so virusi, med njimi so najpogostejši povzročitelji norovirusi, in to v vseh starostnih skupinah (25). Največ gastroenteritisov, ki niso bakterijsko povzročeni, po vsem svetu povzročijo norovirusi (5).

Okužbe z norovirusi so navadno pogostejše v zimskih mesecih. Navadno se število okužb začne povečevati v novembru, največ pa jih je v januarju. V pomladanskih mesecih pa se število okužb manjša. Okužbe se pojavljajo pri vseh starostnih skupinah, čeprav jih je navadno več pri otrocih mlajših od pet let in pri odraslih (23).

Razlogi za to, da se norovirusi zelo hitro širijo, so: nizek infektivni odmerek, dobra stabilnost v okolju, dokaj dobra odpornost na klor, odpornost na nizke temperature, slaba oziroma kratkotrajna imunost in velika genska raznolikost znotraj rodov (13).

Najhitreje se norovirusi širijo v bolnišnicah, domovih za ostarele in ostalih zaprtih ustanovah.

Ko so v Sloveniji raziskovali delež izbruhov v posameznih ustanovah v letih od 2001 do 2008, so ugotovili, da je bilo 25% izbruhov v domovih za ostarele, 24% v restavracijah in hotelih, 16% v vrtcih, 14% v bolnišnicah, 11% v počitniških hišicah in 5% v šolah (12). Glede na najnovejše podatke ZZV Nova Gorica iz prvih petih mesecev leta 2012 je največ okužb v domovih za ostarele. V marcu 2012 je bilo prijavljenih 19 in v maju 2012 56 primerov okužb v izbruhih v domovih za ostarele. V mesecu januarju 2012 in v februarju 2012 je bila prijavljena po ena okužba, v aprilu 2012 pa je bilo prijavljenih 6 okužb. Vse so bile sporadične (26).

Norovirusi se tam hitro širijo, ker imajo za to zelo dobre pogoje. Ljudje so večino časa skupaj, jedo isto hrano in uporabljajo iste sanitarije. Ob stiku ljudi z onesnaženimi površinami, prav tako pride do prenosa okužbe. Če pa pride do izločanja virusov v zrak ob bruhanju, se lahko okužijo tudi zaradi vdihovanja aerosolov. Oskrbovanci v domovih za

ostarele so lahko tudi dementni, zaradi tega težko sledijo navodilom da se morajo izogibati stiku z ostalimi oskrbovanci. Oskrbovanci so pogosto tudi inkontinentni in gibalno ovirani, zato težko skrbijo za higieno. S tem se možnost prenosa lahko še poveča.

Zelo pomembno je tudi preprečevanje širjenja norovirusnih okužb v bolnišnicah in drugih podobnih institucijah. Ukrepi zahtevajo zelo hitro in strogo kontrolo širjenja okužb. Ti ukrepi preprečujejo širjenje okužb tako med pacienti kot osebjem. Za hiter začetek preprečevanja okužb pa je potrebna tudi hitra laboratorijska diagnostika le-teh.

Zlati standard pri odkrivanju okužb je odkrivanje oziroma določanje virusne RNA z RT-PCR. Kljub veliki razpoložljivosti komercialno pripravljenih testov RT-PCR, le ti zahtevajo poseben prostor v laboratoriju in usposobljeno laboratorijsko osebje. V nasprotju z RT-PCR pa lahko teste ELISA rutinsko izvajamo v številnih laboratorijih, omogočajo velik pretok vzorcev, ki jih analiziramo v relativno kratkem času od 2 do 3 urah, kar je zelo pomembno pri odkrivanju okužb, predvsem pri potrjevanju epidemij (28).

Zelo pomembno oziroma nujno je tudi sodelovanje med laboratorijskim osebjem in medicinskim osebjem, ki bolnike zdravi. Pomembno je, da rezultate preiskav čim prej sporočimo bolnikovemu zdravniku, da ve kako ukrepati. Izvide preiskav takoj po končanem testiranju telefonsko sporočimo v ustanovo, kjer se bolnik zdravi in ne čakamo končnega izvida mikrobiološke preiskave, četudi je ta naročena. Tako se medicinsko osebje na podlagi izvida lahko odloči, ali bo bolnika osamilo, ali bo mogoče združilo več bolnikov, ki so zboleli za norovirusno okužbo, po potrebi pa lahko oddelek, kjer se je pojavilo večje število okužb, tudi zapre za obiskovalce. Ob pojavu norovirusnih okužb v bolnišnici uvedejo tudi strožji režim čiščenja in razkuževanja prostorov.

V literaturi smo našli več različnih podatkov za občutljivost in specifičnost uporabljenega testa ELISA. V študiji, ki so jo opravili v severovzhodni Braziliji, pri otrocih z drisko, so testirali 728 vzorcev blata (27). Najprej so opravili RT-PCR, nato pa so vse pozitivne vzorce testirali še z encimskoimunskima testoma ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) in IDEIA norovirus ELISA ter z imunokromatografskim testom RIDAQUICK ICG. Občutljivost testa RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) je bila po tej študiji 63%, specifičnost pa je bila več kot 98% glede na RT-PCR kot referenčni standard. Za ostala dva

testa pa je bila občutljivost za IDEIA norovirus ELISA 45% in specifičnost 100%, za test RIDAQUICK pa je bila občutljivost 69% in specifičnost 100%. Nizko občutljivost pri testu RIDASCREEN® Norovirus 3.generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) ELISA so povezali s slabo občutljivostjo za norovirusne genotipe genske skupine GI. V nasprotju s tem pa je bila zabeležena zelo visoka občutljivost za genotip genske skupine GII, ki je odgovoren za največ norovirusnih okužb.

V raziskavi so ugotovili, da je metoda RIDASCREEN® Norovirus 3.generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) ELISA dovolj hitra in zanesljiva metoda za ugotavljanje okužb z norovirusi, v zaključku jo podajo celo kot najbolj občutljivo izmed obeh encimskoimunskih testov, ki so jih v tej študiji primerjali. Metoda PCR pa je bila uporabljena kot referenčni standard.

Raziskavo so izvedli tudi v terciarni bolnišnici v Nemčiji (28). Cilj te študije je bil, da bi ugotovili diagnostično natančnost testa ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) in hitrega imunokromatografskega testa RIDAQUICK, podobno kot v prejšnji študiji. Analizirali so 410 vzorcev blata, ki so jih zbirali od oktobra 2009 do februarja 2010. Največ bolnikov (57,8%) je bilo starejših od 60 let. Sledili so bolniki, ki so bili stari od 0 do 5 let, torej otroci (21,7%). Starostna skupina od 6 do 21 let je bila zastopana 5,1%; 15,4% pa je bilo bolnikov v starostni skupini od 22 do 59 let. Z RT-PCR je bilo pozitivnih 33% vseh vzorcev, od tega je 99% pozitivnih vzorcev pripadalo GII. Nato so bili vsi vzorci testirani še z testom ELISA. Občutljivost pri tej študiji je bila 77%, specifičnost pa 96%. Za RIDA®QUICK test pa je bila občutljivost 69% in specifičnost 97%.

Tudi v tej študiji so ugotovili da je test ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) primeren za ugotavljanje okužb z norovirusi.

Ugotovili so, da so metode PCR bolj zanesljive in primerne za uporabo od testov ELISA, če je zahtevana večja občutljivost. Po drugi strani, pa so testi ELISA veliko cenejši, zahtevajo manj specializirane laboratorije in so hitreje izvedeni.

Tudi v Sloveniji v različnih mikrobioloških laboratorijih za diagnostiko uporabljajo encimskoimunske teste.

V naši nalogi smo pri analizi 126 vzorcev, analiziranih najprej z ELISA testom RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) nato pa še z RT-PCR, izračunali diagnostično občutljivost 56% in diagnostično specifičnost 78%. Glede na prej omenjene študije, sta bili ugotovljeni občutljivost in specifičnost razmeroma nizki.

Vzorci v naš laboratorij prinesejo kurirji in so v transportu manj kot dve uri na sobni temperaturi, oziroma se od odvzema do transporta hranijo v hladilniku. Transport poteka v hladilnih torbah. Ko vzorci prispejo v laboratorij, so v najkrajšem možnem času označeni in pospravljeni v hladilnik, kjer ostanejo do izvedbe testa ELISA, vendar največ tri dni. Zato sklepamo, da zgoraj opisani pogoji najverjetneje ne vplivajo na rezultate testa ELISA.

Vzorci dobivamo iz regionalne bolnišnice, zdravstvenih domov v regiji ter iz domov upokojencev. Največ pozitivnih vzorcev je bilo poslanih iz bolnišničnih oddelkov, sledi pa jim dom upokojencev. To smo v bistvu pričakovali, saj so v bolnišnico navadno sprejeti bolniki z drugo primarno boleznijo, redkeje odrasli z virusnim gastroenteritisom. Širjenje okužbe je lahko v bolnišnici hitrejše. Bolniki so v bolnišnicah tudi imunsko oslabljeni in tudi zaradi tega je širjenje hitrejše. Okužbe pa se lahko, kot smo že prej opisovali, zelo hitro širijo tudi v zaprtih institucijah, kot so domovi za ostarele.

Pri pregledu pozitivnih rezultatov smo ugotovili, da je bilo največ bolnikov starejših od 16 let. To ni bilo popolnoma v skladu s pričakovanji, saj bi lahko norovirusne okužbe pričakovali pogosteje pri mlajših otrocih ter pri starejših ljudeh. Norovirusne okužbe smo najpogosteje dokazali pri starostnikih starejših od 77 let, kar pa je bilo v skladu s pričakovanji.

Tudi v raziskavi, ki so jo v letu 2004 opravili na Švedskem, je bila večina okuženih starejša od 70 let ali mlajša od 5 let. Vzorce v raziskavi so pregledali z elektronskim mikroskopom, RT-PCR metodo in z ELISA (29).

Norovirusne okužbe so bile v populaciji vedno prisotne, čeprav jih prav z uvedbo testa ELISA in metode PCR večkrat odkrijemo, oziroma pogosteje določimo.

Prednosti ELISA komercialnega testa so enostavnost, saj ne zahteva posebnih prostorov in zahtevnih postopkov, pa tudi hitra izvedba; test namreč izvedemo v 2 do 3 urah ter

sorazmerno nizka cena. Za naš laboratorij je to zelo pomembno, saj v zdravstvenih ustanovah od koder nam pošiljajo rezultate pričakujejo hiter odziv z naše strani v primeru pojava okužb z norovirusi. To je zelo pomembno ne samo za obolele temveč tudi za paciente v njihovi okolici, saj se z ustreznimi ukrepi lahko dokaj učinkovito prepreči širjenje okužbe.

Slabosti pa sta nizka občutljivost in specifičnost testa za določene redkejši seve.

V laboratoriju ZZV Nova Gorica opravljamo veliko število preiskav, tako na prisotnost virusov, kot na prisotnost bakterij v iztrebkih bolnikov. Naloga našega laboratorija je, da čim hitreje in čim učinkoviteje odkrijemo povzročitelje obolenj pri bolnikih ter da informacije posredujemo zdravnikom, ki le-te zdravijo. To pa je velikokrat zelo težko, saj imamo pogosto težave s pomanjkanjem kadra, predvsem v času dopustov in v času povečanega obsega dela. Da bi se hitro odzvali na sum okužbe, bi morali v laboratorij kar najhitreje poslati vzorce bolnikov, pri katerih posumimo na okužbo z norovirusi. Prav tako pa je potrebno, da v ustanovo, iz katere je bil poslan pozitiven vzorec na noroviruse, takoj sporočimo izvide, da tam ustrezno ukrepajo in tako zaježijo okužbo.

Število okužb je bilo v naši nalogi pričakovano najvišje pozimi in zgodaj spomladi. Največ v februarju, sledila sta mesec marec in nato januar. Leta 2002 je v Italiji skupina znanstvenikov vseh 12 mesecev spremljala okužbe z norovirusi. Prišli so do zaključka, da so bile okužbe prisotne skoraj v vseh mesecih, razen aprilu in juniju. Število okužb se je povečalo že v avgustu in septembru, največ pa jih je bilo od novembra do februarja, nato se je število okužb zmanjševalo in obolevanje se je končalo v mesecu maju (30).

Podobno študijo so izvedli tudi v Sloveniji med leti 2001 in 2008. Največji delež izbruhov so zaznali od oktobra do marca. Izbruhi se pojavljajo tudi v ostalem delu leta, vendar so manj številni (31). Večina naših vzorcev je bila pridobljena med izbruhi v zimskem času leta 2007, največ v mesecu februarju in marcu.

Podatki o pojavnosti okužb z norovirusi v Sloveniji kažejo, da je bilo v letih, ko smo izvajali našo nalogo, prijavljenih 1043 okužb in 22 izbruhov v letu 2007, 1043 okužb in 24 izbruhov v letu 2008, 1393 okužb in 20 izbruhov v letu 2009 ter 2010 okužb in 51 izbruhov v letu 2010 (32).

Za Goriško, žal nismo našli tako točnih podatkov. V prvih treh mesecih leta 2007 je bilo prijavljenih 172 okužb z norovirusi, vsi so bili posledica izbruhov. Za leto 2008 nismo našli sistematičnih podatkov. V letu 2009 je bilo v prvih štirih mesecih prijavljenih 36 okužb, v letu 2010 je bilo vseh okužb 59, največ jih je bilo v januarju, aprilu in decembru. V poročilih o pogostosti pojavnosti obolenj v posameznih mesecih so črevesne virusne okužbe v vseh letih na vodilnih mestih (25).

V naši nalogi je bilo med pozitivnimi vzorci 30 (65,2%) vzorcev obolelih žensk in 16 (34,8%) vzorcev obolelih moških. Glede na to, da je po statistiki med starostniki več žensk kot moških, bi lahko bil tudi to vzrok za večjo obolevnost žensk.

6. SKLEP

V vzorcih bolnikov z gastroenteritisom smo določali antigene norovirusov z encimskoimunsko metodo.

Analizirali smo 126 vzorcev iztrebkov bolnikov z gastroenteritisom. Najprej smo pri njih opravili test RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija), nato pa še testiranje z metodo PCR. Izmed teh vzorcev je bilo z ELISA testom pozitivnih 46/126; (36,5%) vzorcev, z metodo PCR pa kar 63/126 (50%) vzorcev. Iz tega sklepamo, da je metoda PCR bolj občutljiva in bolj specifična od uporabljenega testa ELISA, vendar pa je bolj zahtevna za izvedbo, zahteva poseben prostor in za to usposobljeno laboratorijsko osebje. Komercialni encimskoimunski kompleti so zadovoljiva alternativa in uporabni pri pregledovanju večjega števila vzorcev pri sumu na epidemijo, so enostavni in hitri.

Večino pozitivnih rezultatov smo dobili pri vzorcih poslanih iz bolnišnice in domov za ostarele, kar je bilo pričakovano, saj imajo tam norovirusi zelo dobre pogoje za širjenje. Večina bolnikov je bila starejša od 16 let, največ pa jih je bilo starejših od 77 let.

Vzorci smo pregledovali v letih od 2007 do 2010. Največ okužb je bilo v mesecu februarju, ko je bilo pregledanih tudi največje število vzorcev, in sicer 40. Število okužb je padalo v pomladanskih mesecih in maja so bili pregledani le 4 vzorci. To je bilo pričakovano, saj je navadno največje število okužb prav v zimskih mesecih.

V naši nalogi smo za test ELISA RIDASCREEN® Norovirus 3. generacije (R-Biopharm, Darmstadt, Nemčija) določili diagnostično občutljivost 56% in diagnostično specifičnost 78%. Občutljivost in specifičnost sta bili v naši nalogi nizki, sploh glede na podatke, ki jih navaja proizvajalec.

Test je po našem mnenju zadovoljiv za hitro ugotavljanje izbruhov, vendar pa je potrebna za bolj zanesljivo diagnostiko okužbe pri posamezniku še izvedba testa PCR, ki da bolj zanesljive in točne rezultate.

7. LITERATURA

01 Smith WA, Skilling ED, Castello DJ: Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. *Medical Hypotheses* 2004; 63: 560-566.

02 Kapikian A, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanok RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology* 1972; 10: 1075-1081.

03 Medici MC, Martinelli M, Rugegeri FM, Abelli LA, Bosco S, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Calderaro A, Chezzi C, Dettori G: Broadly reactive nested reverse transcription-PCR using an internal RNA standard control for detection of Noroviruses in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43:3772-3778.

04 Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Human sapoviruses. Genetic diversity, recombination and classification. *Reviews in Medical Virology* 2007c; 17: 133-141.

05 Atmar RL, Estes M: Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14,1: 15-37.

06 Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ: Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2005; 12 (11): 1874-1881.

07 Shiotta T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H: Characterization of a broadly reactive monoclonal antibody against norovirus genogroups I and II: Recognition of a novel conformational epitope. *Journal of Virology* 2007; 81: 12298-12306.

08 Mateja Poljšak-Prijatelj; Janet Zimšek Mijovski. Kalicivirusi. V: *Medicinska virologija*. M Poljak, M Petrovec (ur). Ljubljana: Medicinski razgledi, 2011:251-260.

09 Parasad BVV, Hardy, Estes ME: X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; 286: 287-290.

10 Courns AT, Steiner CA, Barrett M, Hunter K, Wilson E, Parashar UD. Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 US states. *Journal of Infectious Diseases* 2010, 201:1617-1624.

11 Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Vinje J, Parashar UD: Systematic Literature Review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 8 (14): 1224-1231.

12 Poljšak-Prijatelj M, Frelj T, Zimšek J, Berce I, Barlič-Magajna D: Kalicivirusi-povzročitelji epidemičnega gastroenteritisa pri otrocih v vrtcu - Izkušnje v Sloveniji. *Zdravniški vestnik* 2001; 70: 619-622.

13 Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS: Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology* 2008; 8 (8): 4538-4543.

14 Widdowson MA, Sulka A, Bulenos SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R: Norovirus and foodborne disease. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2005; 11 (1): 95-102.

15 Troeger H, Luddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD: Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *International Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009; 58: 1070-1077.

16 Frankhauser RL, Noel SJ, Monroe SS, Ando T, Glass RI: Molecular epidemiology of »Norwalk-like Viruses« in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *Journal of Infectious Diseases* 1998; 178: 1571-1578.

17 Treanor JJ, Dolin R: Norwalk virus and other caliciviruses . V: Mandell G., Bennet JE: Principles and practice of infectious diseases. Fifth edition. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000: 1949-1956.

18 IVZ: Okužba s kalicivirusi (norovirusi) in rotavirusi; dostopno na internetu 10.april 2012.

http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=165&pi=5&_5_id=954&_5_PageIndex=2&_5_groupId=298&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=165-5.0.

19 IVZ: Priporočila za obravnavo izbruha ali suma na izbruh z norovirusi v ustanovah; dostopno na internetu 18.november 2012.

http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=149&pi=5&_5_id=1843&_5_PageIndex=0&_5_groupId=282&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=149-5.0

20 Wilhelmi I, Roman E Sanchez – Fauquier A: Viruses causing Gastroenteritis. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 247-262.

21 Marin J. Neposredno dokazovanje virusov. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, et.al V: Splošna medicinska virologija. Ljubljana. Medicinski razgledi 2005: 116-126.

22 Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Detection of Norwalk virus in stool by polimerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 1992; 30: 2529-2534.

23 Lopman BA, Brown D, Kopmans M: Human caliciviruses in Europe. Journal of Clinical Virology 2002; 24: 137-1608.

24 Espy MJ, Uhl J, Sloan LM, Buckwalter S, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF: Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews 2006; 19: 165-256.

25 de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeak LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, Bartelds AI, van DuynhovenYT: Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in The Netherlands: incidence and etiology. American Journal of Epidemiology 2001; 154 (7): 666-674.

26 ZZV Nova Gorica: spremljanje, obvladovanje in preprečevanje nalezljivih bolezni; dostopno na internetu 6. junij 2012.

<http://www.zzv-go.si/index.php?id=53>

27 Kirby A, Gurgel R., Dove W, Viera SCF, Cunliffe NA, Cuevas LE: An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in fecal specimens. *Journal of Clinical Virology* 2010; 49: 254-257.

28 Gegiant G, Kaiser D, Schrempf S: Evalation of third-generation ELISA and rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a tertiary care hospital . *Clinical Microbiol Infect Dis* 2012 31: 733-737.

29 Martin S, Andersson ., Hedlund KO, Giesecke J: New norovirus surveillance system In Sweden. *Eurosurveillance* 2004; 8(39): 7-10.

30 Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, Ruggeri MF, Di Bartolo I, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Izzi G, Bernasconi S, Chezzi C, Dettori G: Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northerh Italy. *Journal of Medical Virology* 2006; 78 (11): 1486-1492.

31 Poljšak-Prijatelj M, Zimšek Mijovski J, Kovač K, Steyer A, Hočever Grom A: Detection and molecular epidemiology of calicivirus outbreaks in Slovenija from 2001 to 2008. V: *Microbiology for today*, Portorož, 19-22 nov. Slovensko mikrobiološko društvo, Ljubljana, 2008; 66-66.

32 IVZ: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2007, 2008, 2009, 2010; dostopno na internetu 6. junij 2012

http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=78&pi=6&_6_id=788&_6_PageIndex=0&_6_groupId=-2&_6_newsCategory=IVZ+kategorija&_6_action=ShowNewsFull&pl=78-6.0

Slikovni viri

<http://www.sph.emory.edu/moelab/Projects-Viral.htm>.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Norwalk.jpg>.