

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSHALLİ HASTA DIŞKILARINDA NOROVİRÜS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Cihan YEŞİLOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Betigül ÖNGEN

İSTANBUL

2019

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSHALLİ HASTA DIŞKILARINDA NOROVİRÜS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Cihan YEŞİLOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Betigül ÖNGEN

İSTANBUL

2019

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Cihan YEŞİLOĞLU

ÖNSÖZ

Tez konusunun seçiminden, planlanışına, deney sürecinden sonuçların değerlendirilmesine kadar bilgi birikimini benimle sonuna kadar paylaşan, uzmanlık eğitimim süresince tüm sorularımı sabırla dinleyen, yanıtlayan benden destek ve teşviklerini esirgemeyen, akademik hayatımda olduğu gibi sosyal hayatımda da hiçbir karşılık beklemeden soru ve sorunlarımla ilgilenen, bilgi ve deneyimlerinden faydalanma fırsatına sahip olduğum için her zaman minnettar olacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Betigül Öngene'e,

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan'a, bölümümüzün değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Arif Kaygusuz, Prof. Dr. Zayre Erturan, Prof. Dr. Meltem Uzun, Prof. Dr. Özden Boral, Prof. Dr. Zerrin Aktaş, Prof. Dr. Dilek Şatana, Doç. Dr. Yaşar Nakipoğlu, Doç. Dr. Lütfiye Öksüz'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerinden faydalanma fırsatı bulduğum emekli öğretim üyeleri Prof. Dr. Yaşar Ali Öner, Prof. Dr. Selim Badur, Prof. Dr. Nezahat Gürler, Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Prof. Dr. Derya Aydın, Prof. Dr. Şadi Yenen, Prof. Dr. Bülent Gürler, Prof. Dr. Şengül Derbentli ve Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu'na,

Bölümümüzde görevli Doç. Dr. Sevim Meşe, Doç. Dr. Hayriye Uysal ve Uzm Dr. Bahar Akgün Karapınar'a

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum mesai ve çalışma arkadaşlarım Dr. Onur Tosun, Dr. Mehmet Akif Durmuş, Dr. Kamran Nuriyev, Dr. Gözde Öztürk Altinyurt, Dr. Aynur Veliyeva, Dr. Aygün Mehdiyeva, Dr. Günel Musayeva, Dr. Ilvana Caklovica, Ar. Gör. Gonca Erköse Genç, Biyo. Ayşegül Şahin Aydın, Biyo. Kenan Akbulut, Biyo. Öner Kiprtiçi, PhD. Dr. Kutay Sarsar, Msc. Biyo. Ilgın Kaya, PhD. Dr. Osman Köksal, Doktora Öğr. Aykut Kurt, Biyo. Nermin Teksoy, Msc Biyo. Neslihan Cihanoğlu'na

Örnek toplama sürecimde yardımlarını esirgemeyen Lab. Kaniye Ataseven, Lab. Betül Demir, Lab. Neşe Karasakal'a

Örneklem hesaplaması konusunda bilgilerinden faydalandığım Biyoistatistik Anabilim Dalı'na, istatistiki verilerimi düzenlememe yardımcı olan Dr. Çiğdem Aslaner'e

Projeyi destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi ve çalışmada kullanılan BD Max Enterik Viral Panel kiti hiçbir bedel ve talepte bulunmadan sağlayan Labormed Tıbbi Ürünler San. Ve Tic. Ltd. Şti.'ne,

Ve tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini eksik etmeyen annem Vildan Yeşiloğlu, babam Kemal Yeşiloğlu, kardeşim Dr. Caner Yeşiloğlu ve eşi Dr. Aslı Aydoğdu Yeşiloğlu'na

TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 29623



İÇİNDEKİLER

1. TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ÖZET	
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
3. GENEL BİLGİLER.....	5
3.1. TARİHÇE.....	5
3.2. VİRÜSÜN ÖZELLİKLERİ.....	5
3.2.1. Taksonomi ve Virüsün Yapısı.....	5
3.2.2. Genomik Yapısı.....	6
3.3. KLİNİK ÖZELLİKLER.....	7
3.3.1. Aseptomatik Enfeksiyon.....	7
3.3.2. Semptomatik Enfeksiyon.....	8
3.3.2.1. İnkübasyon periyodu.....	8
3.3.2.2. Klinik belirtiler.....	8
3.3.3.3. Hastalığın süresi.....	9
3.3.3.4.Ciddi seyirli enfeksiyonlar, kronik enfeksiyon, hastaneye yatış ve mortalite.....	9
3.4. PATOGENEZ.....	10
3.5. EPİDEMİYOLOJİ.....	12
3.5.1. Seropozitiflik.....	12
3.5.2. Prevalans.....	13
3.5.2.1. Salgınlarda norovirüs prevalansı ve gerçekleşme yerleri açısından salgınlara incelenmesi.....	13

3.5.2.2. Norovirüsün sporadik gastroenteritlerdeki prevalansı...	15
3.5.3. Bulaş Yolları ve Kaynakları.....	16
3.5.3.1. Bulaş yolları	16
3.5.3.2. Bulaş kaynakları	16
3.5.3.2.1. Gıda kaynaklı enfeksiyonlar.....	16
3.5.3.2.2. Su kaynaklı enfeksiyonlar.....	17
3.5.3.2.3. Diğer kaynaklar	17
3.5.4. Yaş.....	18
3.5.5. Sezon	19
3.5.6. Moleküler Epidemiyoloji	19
3.5.7. Türkiye’de Norovirüs.....	20
3.6. TANI.....	21
3.6.1. Klinik ve Epidemiyolojik Özelliklere Dayanan Tanı Kriterleri ...	21
3.6.2. Elektron Mikroskopisi.....	22
3.6.3. Norovirüs Antijen Tespiti.....	22
3.6.3.1. Enzim immünoassay.....	22
3.6.3.2. İmmünokromatografi.....	23
3.6.3.3. Moleküler tanı yöntemleri.....	24
3.7. TEDAVİ.....	24
3.8. KORUNMA.....	25
3.8.1. Virüsün Çevre Koşullarına Dayanıklılığı ve İnaktivasyonu.....	25

3.8.2. Enfeksiyon Yönetimi ve Salgın Kontrolü.....	26
3.8.3. Aşı.....	27
4. GEREÇLER ve YÖNTEMLER.....	28
4.1. HASTA GRUBU.....	28
4.2. GEREÇLER.....	28
4.2.1. Örneklerin Toplanması.....	28
4.2.2. Gerçek Zamanlı Multiplex RT-PCR Kiti.....	28
4.2.2.1. Kit içeriğinde sağlanan reaktif ve materyaller.....	28
4.2.2.2. Kit içeriği dışında gerekli ekipman ve gereçler.....	29
4.2.3. Enzim İmmünoassay (EIA) Kiti.....	29
4.2.3.1. Kit içeriğinde sağlanan reaktif ve materyaller.....	29
4.2.3.2. Kit içeriği dışında gerekli ekipman ve gereçler.....	29
4.2.4 İmmünokromatografi (İKG) Kiti.....	30
4.2.4.1. Kit içeriğinde sağlanan reaktif ve materyaller.....	30
4.2.4.2. Kit içeriği dışında gerekli ekipman ve gereçler.....	30
4.3. YÖNTEMLER.....	30
4.3.1. Örneklerin Toplanması.....	30
4.3.2. Gerçek Zamanlı Multiplex RT-PCR	31
4.3.2.1. Örneğin hazırlanışı.....	31
4.3.2.2. Çalışma prensibi.....	32
4.3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi.....	32

4.3.3. Enzim İmmunassay (EIA).....	33
4.3.3.1. Örneğin hazırlanışı.....	33
4.3.3.2. Çalışma prensibi.....	34
4.3.3.3. Sonuçların değerlendirilmesi.....	34
4.3.4. İmmünokromatografi.....	35
4.3.4.1. Örneğin hazırlanışı.....	35
4.3.4.2. Çalışma prensibi.....	35
4.3.4.3. Sonuçların değerlendirilmesi.....	36
4.3.5. İstatistiksel Analiz.....	36
4.3.5.1. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması.....	36
4.3.5.2. Verilerin istatistiksel analizi.....	36
5. BULGULAR.....	37
5.1. HASTALARA AİT DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER.....	37
5.2. DIŞKI ÖRNEKLERİNE AİT ÖZELLİKLER.....	37
5.3. ENZİM İMMÜNOASSAY SONUÇLARI.....	37
5.4. İMMÜNOKROMATOĞRAFİ SONUÇLARI.....	38
5.5 GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARI.....	39
6. TARTIŞMA.....	42
7. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
8. KAYNAKLAR	55

EKLER

Hasta Takip Formu

Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

ÖZGEÇMİŞ

ETİK KURUL KARARI



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo-1: Farklı bölgelerde çocukluk ve erişkin yaş gruplarında norovirüs seropozitifliği

Tablo-2: Farklı ülkelerde sağlık bakımı ile ilişkili kuruluşlarda gelişen bazı norovirüs salgınları

Tablo-3: Türkiye’de yapılan bazı norovirüs çalışmaları

Tablo-4: Çalışmaya dâhil edilen hastaların yaş ve cinsiyet özellikleri.

Tablo-5: Belirtileri dört günden uzun süren hastaların altta yatan hastalıkları ve belirtilerinin devam etme süreleri

Tablo-6: Moleküler yöntemle pozitif saptana hastaların diğer yöntemler ve bazı özellikler açısından incelenmesi

RESİMLER LİSTESİ

Resim-1: Örnek tampon tüpleri

Resim-2: Rafa yerleştirilmiş birimlere ayrılmış reaksiyon kartuşları ve örnek tampon tüpleri

Resim-3: Barkodların okutulması

Resim-4: BD Max Sistemine yerleştirme

Resim-5: EIA plağı (pozitif (sarı) ve negatif (renksiz) hasta örnekleri, plağın sağ alt köşesinde pozitif ve negatif kontroller)

Resim-6: İmmunokromatografi kaset test ile pozitif saptanan (çift çizgi) örnek

Resim-7: İmmunokromatografi kaset test ile negatif saptanan (tek çizgi) örnek

Resim-8: Gerçek zamanlı multipleks RT-PCR ile norovirüs saptanan örneklerle ait sonuçlar

Resim 9: Gerçek zamanlı multipleks RT-PCR ile norovirüs saptanan örneklerle ait eğriler

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil-1: Gerçek zamanlı mltipleks RT-PCR sonuçları



1.ÖZET

Bu çalışmanın ana amaçları ishallerde hastalarda norovirüs sıklığının araştırılması ve günümüzde norovirüs tanısında altın standart kabul edilen moleküler yöntem referans alınarak diğer tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesidir.

Çalışmamıza İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve laboratuvarımızda araştırılan rutin bakteriyel etkenlerin saptanmadığı 184 ishaller dışkı örneği dâhil edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen tüm örnekler RT-PCR, EIA ve IKG yöntemleri ile incelenmiştir. Tüm hastalara ait demografik bilgilere ek olarak norovirüs varlığı açısından pozitif saptanan hastaların belirtilerine ait bilgiler toplanarak elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir.

Altın standart yöntem olarak kabul edilen RT-PCR ile 184 ishaller hastanın 14'ünde (%7,6) norovirüs pozitif olarak tespit edilmiştir. EIA ve IKG yöntemlerine ait duyarlılık oranları sırasıyla %50 ve %57 olarak, her iki yöntem için özgüllük ise %100 olarak saptanmıştır. Yaş grupları, cinsiyet, dışkının sulu ya da yarı katı olması gibi faktörlerin norovirüs pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı belirlenmiştir. EIA ve IKG yöntemlerinin belirtileri kısa süreli olan hastalarda daha yüksek duyarlılık gösterdikleri, belirtilerin uzun süre devam eden genellikle immünsüpresyonu olan bu hastalarda RT-PCR yöntemine ihtiyaç duyulduğu görülmüştür.

Sonuç olarak ülkemizde rutin olarak araştırılan bir etken olmayan norovirüsün ishallerde hastalarda göz ardı edilemeyecek bir oranda pozitiflik gösterdiği tespit edilmiştir. Duyarlılıklarının sınırlı olduğu saptanan antijen tespitine dayalı yöntemlerin belirli hasta gruplarında kullanımının uygun olabileceği, uzun süreli enfeksiyon açısından risk grubu olarak kabul edilebilecek hastalarda ise moleküler yöntemin kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

1.ABSTRACT

The main aims of these study to investigate the frequency of norovirus in patients with diarrhea and the determination of the sensitivity and specificity of the other diagnostic methods by the reference molecular method which is accepted currently as the gold standard in the diagnosis of norovirus.

We evaluated the 184 stool samples of patients with diarrhea who applied to I.U Istanbul Faculty of Medicine Medical Microbiology Laboratory and whose bacterial agent investigation of stool samples resulted as negative. All of the samples which were included in the study were evaluated with RT-PCR, EIA and IKG methods. In addition to the demographic information of the patients, the information about symptoms of the norovirus positive patients were collected and the results were evaluated with this information.

Norovirus was detected 14 out of 184 (7,6%) patients with the gold standard RT-PCR method. Sensitivity of the EIA and ICG methods are calculated as 50% and 57% respectively and the specificity of both methods is calculated as 100%. Factors as age groups, gender, stool macroscopy were not found to be statistically significant in terms of norovirus positivity. The sensitivity performance of EIA and ICG methods were higher in patients with short-term symptoms beside that the requirement of RT-PCR method was noticed in the patients with long-term symptoms who were immunosuppressed in general.

As a result, it was found that norovirus which is not routinely investigated in our country has substantial positivity in diarrheal patients. Antigen detection methods which are found to have limited sensitivity can be used in specific patient groups beside that the use of molecular methods was considered as advantageous in the patients who is under the risk of long-term infection.

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre ishalli hastalıkların 2016 yılında tüm ölüm nedenleri içerisinde dokuzuncu sırada yer aldığı ve ishalli hastalıkların tüm ölüm nedenlerinin %2.4'lük bölümünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (1). İshal ve/veya kusma tablolarını içeren gastroenterit terimine virüslerin, bakterilerin ve parazitlerin neden oldukları bilinmekte olup (2) norovirüs insanlarda gastroenterite neden olduğu tanımlanan ilk virüstür (3).

Norovirüs ilk olarak 1968 yılında gerçekleşen salgın sonrası elektron mikroskopisi aracılığıyla tanımlanmış (4) ve yapılan araştırmalardan sonra *Caliciviridae* ailesine ait olduğu tespit edilmiştir (5). Özellikle bazı genogrupları insanda ishal ve kusma belirtilerinin önde olduğu bir klinik tabloya neden olmaktadır (6). Norovirüs enfeksiyonları genellikle hafif seyirli ve kısa sürelidir (7) ancak kimi zaman asemptomatik (8) kimi zaman da kronik enfeksiyon şeklinde (9) seyir gösterebilmektedir. DSÖ tarafından bildirilen bir çalışmada gıda kaynaklı bakteriyel, protozoal ve viral hastalıklara ait veriler değerlendirilmiş ishalli hastalıklar içerisinde en çok ölüme neden olan etkenin norovirüs olduğu bildirilmiştir (10). Hastalığın patogenezi ve hastalığa yönelik tedaviler konusunda ilerleme kaydedici çalışmalar mevcut olsa da henüz aydınlatılmamış bölümler mevcuttur. Hücre kültüründe ancak 2016 yılında üretilmiş olan (11) insan norovirüsüne karşı henüz bir aşı da geliştirilememiştir (12). Norovirüsün varlığının tespit edilışinden bu yana çeşitli tanı yöntemleri geliştirilmiş olup günümüzde RT-PCR (revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (13). Tüm bunlara ek olarak norovirüs epidemiyolojisi geçmişten bugüne ilgi çeken bir konu olmuş norovirüsün bulaş yolları (3) ve kaynaklarına (14), salgınlardaki (15) ve sporadik vakalardaki yerine (3), moleküler epidemiyolojisine yönelik (16) çok sayıda çalışma yayımlanmıştır.

Norovirüsün epidemik gastroenteritlerde etken olarak tartışmasız üstünlüğünün yanı sıra (17) sporadik gastroenteritlerin de önemli bir nedeni olduğu bilinmektedir (3). Buna rağmen ülkemizde norovirüs varlığının araştırılması Sağlık Uygulama Tebliği'nce işlem puanı olan (geri ödemesi tanımlanan) bir hizmet değildir (18). Bunun yanında değinileceği üzere tanı yöntemi seçiminde de soru işaretleri mevcuttur. Muhtemelen bu sebeplerle norovirüs ülkemizde laboratuvarlarda rutin araştırılan bir gastroenterit etkeni olarak yer almamaktadır. Bu durum ülkemizde norovirüs sıklığına ait verilerin de kısıtlı kalmasına neden olmuştur. Bu çalışmanın ilk amacı ishalli hastalardaki norovirüs sıklığının ortaya konması ve elde edilecek sonuçların

paylaşılarak ülke ve dünya genelindeki literatüre ve ileriye dönük saēlık uygulamalarında olabilecek deēiřmelere katkı saēlanmasıdır.

Norovirüs tanısında geliştirilen yöntemlerden antijen tespitine dayalı olan ve neredeyse her laboratuvarın uygulayabileceēi EIA (enzim immunoassay) ve IKG (immünokromatografi) yöntemlerinin özellikle sporadik vakalarda duyarlılık sorunu olduēu bildirilmiştir (13). Ülkemizde bu yöntemlerin duyarlılıēını saptamaya yönelik yapılan çalışmalar son derece kısıtlıdır. Bu çalışmaya dâhil edilen tüm rnekler EIA, IKG ve RT-PCR prensipleriyle çalışan ticari kitlerle incelenmiş olup daha önce ülkemizde bu üç yöntemin bir arada kullanılarak karřılařtırıldıēı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Anlařılacaēı üzere çalışmanın bir diēer amacı ülkemiz koşullarında bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesidir. Bizim alışmamızda altın standart yöntem olan RT-PCR prensibi ile çalışan kit referans yöntem olarak kabul edilmiş duyarlılık ve özgüllük oranları bu kitin sonuçlarına göre hesaplanarak bildirilmiştir. Elde edilecek verilerle tanı yöntemlerinin kullanımına yönelik çıkarımlar yapılması planlanmıştır.

Tüm sonuçlar doērultusunda çalışmanın saēladıēı epidemiyolojik veriler rutin olarak araştırılmayan bir etkenin ishalleri hastalıklardaki yerinin belirlenmesine katkı saēlayacak, tanı yöntemlerine yönelik sonuçlarla da laboratuvarlara kullanılacak tanı yöntemi seçimi konusunda, kliniklere ise hasta grubu-tanı yöntemi arasındaki baēlantıyı belirlemesi konusunda ışık tutacaktır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. TARİHÇE

Norovirüs partikülünün (önceki adıyla Norwalk virüs) ishalli hasta dışkılarında ilk tanımlanması 1968 yılında Norwalk, Ohio’da görülen salgın sonrası yapılan araştırmayla gerçekleşmiş olsa da (4), kusmanın ön planda olduğu akut gastroenterit tablosu ilk olarak 1929 yılında tarif edilmiştir. Bu hastalık tablosuna epidemiyolojik ve semptomatik özelliklerinden dolayı “winter vomiting disease” (kışın görülen kusma hastalığı) adı verilmiş ve hastalarda araştırılan bakteriyel etkenler izole edilememiştir (19).

Norwalk, Ohio’da 1968 yılı Ekim ayında bir ilkokulda yine bakteriyel bir etkenin izole edilemediği ve öğrencilerin %50’sinin etkilendiği bir gastroenterit salgını gerçekleşmiştir. Hastalık ön planda bulantı, kusma ve abdominal kramplar ile seyretmiş ve vakaların çoğunda belirtiler 12-24 saat boyunca devam etmiştir. Salgında primer vakalarla ilişkisi olan aile üyeleri de etkilenmiş, sekonder atak hızı %32.3, sekonder vakalarda inkübasyon süresi ortalama 48 saat olarak belirlenmiştir (19).

Daha sonra yapılan bir çalışmada Norwalk’ta gerçekleşen salgında sekonder enfekte olan hastaların rektal sürüntü örneklerinden filtratlar hazırlanmış ve bu filtratların oral yolla uygulandığı üç gönüllüden ikisinde hastalığın tipik semptomları kendini göstermiştir. Seri pasajlarla iki kez daha gönüllü çalışmalarına devam edilmiş ve bu kişilerde de hastalığın tipik semptomları görülmüştür (20).

Çocuklarda ve erişkinlerde epidemik gastroenteritin önemli bir etkeni olan bu virüs ilk olarak 1972 yılında immün elektron mikroskopi yöntemiyle 27 nm. büyüklüğünde virüs benzeri partikül olarak tanımlanmıştır (4).

3.2. VİRÜSÜN ÖZELLİKLERİ

3.2.1. Taksonomi ve Virüsün Yapısı

Uzun yıllar yapılan denemelere rağmen hücre kültürlerinde üretilmeyen (21-23) ve ancak 2016 yılında bildirilen bir çalışmayla bazı genotiplerinin kök hücre kaynaklı insan intestinal enteroid hücrelerinde üretilbildiği bildirilen (11) insan norovirüsünün ilk olarak protein yapısının benzerliği nedeniyle *Caliciviridae* ailesine ait olduğu düşünülmüştür (24).

Yapılan ilk çalışmalarda en az 7.5 kb uzunluğunda tek zincirli pozitif polariteli bir RNA virüsü olduğu tanımlanan (25) Norwalk virüsünün *Caliciviridae* ailesine ait olduğu nükleik asit çalışmalarıyla da desteklenmiştir (26). Ancak kesin taksonomik sınıflandırması tüm genom analizinin tamamlanması ve verilerin *Caliciviridae* ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırılması ile yapılmıştır (5).

Caliciviridae ailesi; zarfsız, izometrik şekilli, 35-40 nm. boyutlarında, ikozahedral simetrik kapsit yapısına sahip, tek zincirli, pozitif polariteli RNA virüsleridir (27). ICTV (Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi) sınıflamasına göre *Caliciviridae* ailesi şu an için *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Nebivirus* ve *Vesivirus* adları verilen beş cinsten oluşmaktadır (28).

3.2.2. Genomik Yapısı

Norovirüs genomu 7.3-7.5 kb uzunluğunda pozitif polariteli, lineer, tek zincirli bir RNA molekülünden oluşmaktadır. 3' ucu poliadenile olan genomik RNA 5' ucuyla virüs tarafından kodlanan ve VPg adı verilen proteine kovalent olarak bağlıdır. İnsan norovirüs genomu ORF-1, ORF-2 ve ORF3 olmak üzere üç adet korunmuş ORF bölgesi içermektedir. ORF-1 bölgesi RNA bağımlı RNA polimeraz enzimini de içeren ve posttranslasyonel olarak en az 7 yapısal olmayan proteine ayrılan bir poliprotein translasyonu gerçekleştirmektedir. Majör kapsit proteini VP1 ve minör kapsit protein VP2 ise sırasıyla ORF-2 VE ORF-3 bölgeleri tarafından sentezlenmektedir. Virüsün ikozahedral simetrik kapsit yapısını 90 VP1 ve birkaç VP2 dimeri oluşturmaktadır (29-31).

1968 yılında Norwalk'ta gerçekleşen salgın sonrası Snow Mountain, Hawaii, Montgomery gibi başka yerlerden de benzer klinik ve epidemiyolojik özelliklere sahip salgınlar bildirilmiş ve bu salgınlardaki etkenlerin farklı antijenik yapılarda oldukları bildirilmiştir (32,33). Viral partiküllerin moleküler karşılaştırmaları yapıldığında da virüs genomunda kapsit yapısını kodlayan bölümün bu farklılığa neden olduğu düşünülmüştür (34,35).

Günümüze değin yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda tamamlanmış kapsit gen dizilimine göre 7 genogrup (G) tanımlanmıştır. İnsanlarda hastalık yapan genogruplar büyük oranda GI ve GII olup, az sayıda epidemik ve sporadik vakada GIV saptanmıştır. GIII sığırlarda, GV farelerde, GVI ve GVII ise köpeklerde saptanmış olup (30)

GIII'e karşı oluşan antikorların da insanlarda varlığı bildirilmiştir (36). Ayrıca yarasalarda yapılan bir çalışmada izole edilen bir virüsün GVIII olabileceği bildirilmiştir (37).

Yapılan moleküler çalışmalarla genogruplar içerisinde genetik kümelenmeler tespit edilmiş (38,39,40) ve genogruplar içinde genotipler tanımlanmıştır (30). Günümüze değin G1 içerisinde dokuz genotip, GII içerisinde üçü (GII.11,GII.18,GII.19) sadece domuzlarda olmak üzere 22, GIII içerisinde üç, GIV, GV ve GVI'da iki ve GVII'de bir genotip tanımlanmıştır (29).

3.3. KLİNİK ÖZELLİKLER

3.3.1. Asemptomatik Enfeksiyon

Norovirüs enfeksiyonu asemptomatik seyredebilmekte olup norovirüsün global prevalansının incelendiği kapsamlı bir derlemede akut gastroenteritli ve kontrol grubuna ait verilerin bulunduğu 20 çalışmanın ortalamasına göre kontrol grubunda norovirüs prevalansı %7 olarak bildirilmiştir (8).

Asemptomatik enfeksiyonla ilgili çalışmalara dâhil edilen yaş grupları ve yapıldığı koşullara bağlı olarak farklı görüşler mevcuttur. Asemptomatik enfeksiyonun nadir rastlanır olduğunu (41,42) ya da bunun tam aksine daha sık rastlanan bir durum olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (13,43). Özellikle çocukluk yaş grubunda yüksek asemptomatik taşıyıcılık yüzdeleri bildirilmiştir. Meksika ve Brezilya'da çocuk yaş grubunda yapılan çalışmalarda asemptomatik taşıyıcılık oranları sırasıyla %49.2 ve %37.5 bulunmuştur (44,45). Afrika ülkelerinde Norovirüs epidemiyolojisini derleyen bir çalışmada asemptomatik taşıyıcılık oranlarının %7-31 aralığında olduğu bildirilmiştir (43). Burkina Faso'da semptomatik ve asemptomatik çocuklarda norovirüs enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini araştıran bir çalışmada ise norovirüs pozitifliği asemptomatik çocuklarda semptomatik çocuklara göre daha yüksek bir oranda bildirilmiştir (46).

Bunun yanında erişkinlerde yapılan veya erişkinlerin de dâhil edildiği çalışmalarda bu oranlar çocukluk yaş grubuna göre daha düşüktür (41,47). İngiltere'de yapılan çalışmada 35 yaş üstü grupta bu oranın %5'ten fazla olduğu bildirilmiştir (47).

Gönüllü çalışmaları veya salgın gibi gerçekleşmiş enfeksiyonla yakın ilişkili durumlarda yapılan çalışmalarda da yüksek asemptomatik enfeksiyon oranları bildirilmiştir. Örneğin 50

gönüllüyle yapılan bir çalışmada enfekte olan bireylerin %32'si asemptomatik seyretmişken (48), hastanede gerçekleşen bir salgın sonrası hastane personeli ve hastalarda asemptomatik enfeksiyon oranlarının sırasıyla %26 ve %33 olduğu bildirilmiştir (49). Japonya'da yapılan büyük kapsamlı bir çalışmada gıda kaynaklı norovirüs salgınları sırasında görülen tahmini asemptomatik enfeksiyon oranı %32.1 olarak bildirilmiştir (50).

Asemptomatik enfeksiyon oranları ülkelerin gelişmişlik seviyelerine göre de farklılık göstermektedir. Asemptomatik enfeksiyon her ne kadar düşük gelişmişlik seviyesine sahip ülkelerde daha yüksek yüzdelerde bildirilmiş olsa da (44-46) gelişmiş ülkelerde de %10'un üzerinde asemptomatik taşıyıcılık oranları bildiren çalışmalar mevcuttur (47,51).

3.3.2. Semptomatik Enfeksiyon

3.3.2.1 İnkübasyon periyodu

1968 yılında Norwalk'ta bildirilen ilk Norovirüs salgınında primer vakalarla etkileşim içinde olan aile bireylerinde gerçekleşen sekonder enfeksiyonlarda inkübasyon periyodu ortalama 48 saat olarak tespit edilmiştir (4). Sonraki yıllarda bildirilen salgınlarda da benzer inkübasyon periyotları bildirilmiş (52,53) ve konuyla ilgili yayımlanmış çok sayıda araştırmayı inceleyen sistematik bir derleme çalışmasında medyan inkübasyon periyodu genogrup I ve genogrup II için 1.2 gün (54), 1983-2010 yılları arasındaki 1022 salgına ait verilerin incelendiği bir diğer çalışmada ise medyan inkübasyon periyodu 33.5 saat, ortalama inkübasyon periyodu 32.8 saat olarak hesaplanmıştır (55).

3.3.2.2 Klinik belirtiler

Bildirilen ilk salgın ve bunu takip eden gönüllü çalışmasında hastalığın ön planda görülen belirtilerinin bulantı, kusma, karın ağrısı, halsizlik, ishal ve ateş olduğu ve bu belirtilerin genellikle kısa süre içinde sonlandığı bildirilmiştir (19,20,56).

Takip eden yıllarda norovirüs nedenli salgınlarda (53,52,57-60) ve çok sayıda salgına ait verinin incelendiği çalışmalarda (6) ön planda görülen belirtilerin kusma ve ishal olduğu bildirilmiştir. Örneğin en az 116 kişinin etkilendiği bir otel salgınında, hastaların %70'ten fazlasında (59) ve Fransa'da 84 kişinin etkilendiği bir bakım evinde ortaya çıkan salgında ise hastaların %50'den fazlasında (52) kusma ve ishal belirtileri görülmüştür.

Bu iki sık görülen belirtinin sıklıklarının çocuk ve erişkinlerde farklı olduğunu bildiren çalışmalar mevcut olup, ishal sıklığının erişkinlerde daha fazla, kusmanın ise çocuklarda daha sık görülen bir belirti olduğu bildirilmiştir (53).

Bununla beraber belirti olarak kusmanın görülmediği salgınlar da bildirilmiştir (55). Norovirüs enfeksiyonlarında görülen bir belirti olarak kusmanın incelendiği bir çalışmada ise semptomatik enfeksiyonlarda kusmanın sık bir bulgu olduğu (%40-98), fakat bu hastaların yalnızca %45’inde ishalin de bu semptoma eşlik ettiği bildirilmiştir (61).

3.3.3.3. Hastalığın süresi

Literatürde bildirilen norovirüsle gerçekleştiği kanıtlanmış ilk salgından bu yana norovirüs enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen belirtiler kısa süreli olmuş ve genelde 1-2 gün içerisinde sonlanmıştır (4,7,57,58). Ancak özellikle hastanede yatan ve immünsüprese hastalarda hastalık belirtilerinin daha uzun süre devam ettiği bildirilmiştir. Norovirüs enfeksiyonunun klinik özellikleri açısından hastane çalışanları, bakım evi çalışanları, bakım evinde yaşayan insanlar ve yatan hastaların karşılaştırıldığı prospektif bir çalışmada yatan hasta grubu dışında belirtilerin medyan devam etme süresi iki gün, hastaların %75’inin tam iyileşme süresi üç gün, yatan hastalarda ise bu süre nispeten daha uzun olup sırasıyla üç ve beş gün olarak bildirilmiştir (7). Benzer şekilde çalışan personeller ve yatan immünsüprese hastaların karşılaştırıldığı bir çalışmada belirtilerin çalışanlarda üç gün, immünsüprese hastalarda ise yedi günde sonlandığı bildirilmiştir (62).

3.3.3.4. Ciddi seyirli enfeksiyonlar, kronik enfeksiyon, hastaneye yatış ve mortalite

Az sayıda da olsa ense sertliği, fotofobi, bilinç bulanıklığı gibi belirtilerin bildirildiği, ventilatör desteği gerektiren yoğun bakım ihtiyacı, disemine vasküler koagülasyon gelişimi, bağırsak perforasyonu gibi ciddi bulgular gösteren vakaların olduğu da bildirilmiştir (60,63).

Ayrıca norovirüs enfeksiyonlarının süt çocuklarında gastroenterit ile ilişkili basit konvulsiyona, preterm bebeklerde nekrotizan enterokolite, özellikle kronik enfeksiyonda kilo kaybı ve büyüme geriliği gibi komplikasyonlara neden olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (64).

Norovirüse bağlı kronik enfeksiyon immünsüprese hastalarda vaka şeklinde bildirilmişse de (65,66) retrospektif bir çalışmada bu durum daha belirgin olarak gösterilmiştir: allojenik kök hücre nakli yapılan 63 hastada hastaların büyük bölümünde (%70) semptomların 14 günden

daha kısa sürede gerilediği ancak hastaların %16'sında semptomların 30 günü aştığı bildirilmiştir (9). Renal transplant yapılan ve norovirüs enfeksiyonu gelişen 65 hastanın ise %15.4'ünde kronik enfeksiyon gelişmiştir (9). 1974-2017 yılları arasındaki benzer çalışmaların dâhil edildiği sistematik bir derlemede de immünsüpresyonun kronik norovirüs ishal gelişimi için önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (64).

Norovirüs enfeksiyonlarında hastaneye yatış gereksinimi de daha çok uç yaş gruplarında olan hastalarda ve immünsüprese hastalarda gerçekleşmektedir. İmmünsüpresyonun hastaneye yatış riskini artırdığı, immünsüprese hastalarda hastaneye yatış oranı %50 iken diğer hastalarda bu oranın %30 olduğu bildirilmiştir (67). Tayvan'da 10 yıllık (2003-2013) bir dönemde tüm yaş gruplarının dâhil edildiği, ciddi seyirli norovirüs enfeksiyonu yükünün araştırıldığı bir çalışmada en çok hastaneye yatış ihtiyacının 5 yaş altı hastalarda gerçekleştiği (68), yaşlı erişkinlerde norovirüs enfeksiyonlarının incelendiği sistematik bir derleme çalışmasında ise 65 yaş ve üstü hastalarda gastroenterit nedeni ile yapılan hastane yatışlarının %10-20'sinin norovirüs enfeksiyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir (69).

Norovirüs enfeksiyonları genellikle hafif seyirli olmasına rağmen DSÖ'nün yaptığı büyük kapsamlı çalışmada gıda kaynaklı bakteriyel, protozoal ve viral hastalıklara ait veriler değerlendirilmiş ve ishalleri hastalıklar içerisinde en çok ölüme neden olan etkenin norovirüs olduğu bildirilmiştir (10). Norovirüse bağlı ölümler de en çok immünsüprese ve yaşlı hastalarda gerçekleşmektedir (70). Allojenik kök hücre nakli yapılan, kemoterapi alan hastalarda norovirüs enfeksiyonuna bağlı ölümler görülmüş (71,62), yaşlı hastalarda ise *Clostridium difficile* dışındaki enfeksiyöz bağırsak hastalıklarına bağlı ölümlerin %20'sinin nedeninin norovirüs enfeksiyonu olduğu ve yine bu enfeksiyona bağlı ölümlerin 5 yaş altı çocuklara göre yaklaşık %200 daha fazla olduğu bildirilmiştir (72,69).

3.4. PATOGENEZ

Norovirüs enfeksiyonlarının patogenezinde iyi aydınlatılmış kısımlar olmakla birlikte henüz yeterince bilgi sahibi olunmayan bölümler de mevcuttur.

Yapılan çalışmalarda norovirüs enfeksiyöz dozunun ID₅₀=18-2800 virüs partikülü olduğu tahmin edilmektedir (73,74). Zarfsız bir virüs olan norovirüs primer olarak fekal-oral yolla bulaşmakta olup hem immün hücreleri hem de enterositleri enfekte etmekte ve özelleşmiş enterositler olan M hücrelerinin hedef immün hücrelere ulaşmada aracı olduğu bildirilmiştir (75). Norovirüs patogenezinde iyi aydınlatılan kısımlardan biri norovirüsün H ve diğer kan

grubu antijenleri aracılığıyla hücrelere tutunmasıdır. Norovirüsün ilk olarak AB0 kan gruplarıyla olan ilişkisi ardından da norovirüse ait virüs benzeri partiküllerin H antijenleriyle çökelme gösterdiği ortaya konmuştur (76,77). Bu durum moleküler olarak da kanıtlanarak norovirüs, kan grubu antijenleriyle ilişkisi moleküler düzeyde gösterilmiş ilk insan patojeni olmuştur (78). Bağlanmanın kan grubu antijenleri bulunan farklı gastrointestinal sistem bölümlerinde gerçekleşebildiği (79) ayrıca norovirüsle kan grubu antijenleri arasındaki bağlanmanın türe özgü olduğu (farklı norovirüs türlerinin farklı kan grubu antijenlerine tutunması şeklinde) gösterilmiştir (80). Kan grubu antijenlerinin yanında farklı moleküllerin de hücrelere tutunma işleminde görev aldığına dair önemli kanıtlar mevcuttur (81).

Hücreye giriş mekanizması insan norovirüsü için henüz aydınlatılmasa da hücre kültüründe üretilmesi insan norovirüsüne göre daha önce başarılmış olan fare norovirüsünün (murine norovirüs) kolesterol ve dinamin aracılığıyla hücreye girişinin gerçekleştiği bildirilmiştir (82,83).

Girdiği hücreye ait bazı proteinleri kullanarak kompleks bir translasyonel ve genomik replikasyon aşamaları gösteren norovirüsün hücreden çıkış mekanizması ise tam olarak aydınlatılamamıştır (29).

Birçok diğer virüs enfeksiyonunda olduğu gibi norovirüs enfeksiyonlarının gelişmesinde de kommensal bakterilerin rolü olduğu gösterilmiştir (75,84). Bakteri ve virüslerin bu etkileşiminin hem direkt hem de indirekt mekanizmalarla gerçekleşebileceği bildirilmiş ve bu etkileşimin örnekleri norovirüs enfeksiyonları için de gösterilmiştir (84). Kommensal bakterilerin kan grubu antijenleri salınımıyla virüsün tutunmasını sağlayarak direkt olarak (85), immünregülasyon yoluyla antiviral aktivitenin azalmasını sağlayarak indirekt olarak norovirüs enfeksiyonlarının gerçekleşmesine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (86).

Norovirüs enfeksiyonlarında semptomatik hastalarda bağırsak villüslerinde genişleme ve küntleşme, kript hücre hiperplazisi, sitoplazmik vaküolizasyon, lamina propriaya polimorfonükleer ve mononükleer hücre infiltrasyonu gibi histolojik değişikliklerin gerçekleştiği ancak mukoza bütünlüğünün korunduğu bildirilmiştir (87). Belirtilerin gelişimi ile ilgili olarak hastalarda adenilat siklaz aktivitesinin artmadığı dolayısıyla ishalin bu yolla gelişmediği (88), kusma ve bulantının ise geciken gastrik boşalma veya intestinal villüslerdeki geçici hasar nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (87). Ayrıca norovirüs enfeksiyonlarında

belirtilerin indüklenen sitokin yanıtı ile immün aracılı olarak gelişebileceği de öne sürülmüştür (89).

Sonuç olarak norovirüs patogeneğinde kaydedilmiş ilerlemenin yanında aydınlatılmayı bekleyen çok sayıda soru mevcuttur; hücre kültüründe yaşanan gelişmelerin bu alanda da büyük ilerleme sağlayacağı düşünülmektedir.

3.5. EPİDEMİYOLOJİ

Norovirüsün tanımlanmasının ardından norovirüs enfeksiyonlarının epidemiyolojisi de ilgi çeken bir konu olmuş ve bu alanda giderek artan oranda çalışma bildirimi yapılmıştır.

3.5.1. Seropozitiflik

Dünyanın farklı yerlerinde bireylerin hayat boyu norovirüsle karşılaşma durumunu belirlemek amacıyla seroprevalans çalışmaları yapılmış ve çok yüksek oranlarla karşılaşmıştır. Sadece çocuklarda (90,91) veya tüm yaş grupları dâhil edilerek (92-96) yapılmış bu çalışmaların bazıları Tablo 1’de gösterilmiştir. Hayatın ilk yıllarından itibaren görülen yüksek seropozitiflik oranlarından anlaşılacağı üzere bireyler norovirüsle erken yaşta karşılaşmaktadırlar ve yaşla birlikte seropozitiflik oranı daha da artmaktadır. Az gelişmiş ülkelerde seropozitiflik gelişmiş ülkelere göre daha hızlı gerçekleşse de (97,98) birçok toplumda bireylerin büyük bölümü yaşam süreleri içerisinde norovirüsle en az bir kere karşılaşmaktadır.

Tablo 1 Farklı bölgelerde çocukluk ve erişkin yaş gruplarında norovirüs seropozitifliği.

Coğrafi bölge	Yaş grubu	Seropozitiflik oranı (%)	Kaynak
Güney Afrika	1 yaşına kadar	37.1	92
	40 yaşına kadar	62.1	
Finlandiya	2 yaşına kadar	49	91
Venezuela	5 yaşına kadar	50	93
Kuveyt	Tüm yaşlar	98	94
İngiltere	Tüm yaşlar	73.3	95
Çin	Tüm yaşlar	~ 90	96
Brezilya	4 yaşına kadar	71	90

3.5.2. Prevalans

Norovirüs hem epidemik hem de sporadik akut gastroenterit vakalarında ilk sırada yer alan etkenlerden biridir. Salgınlarda ve sporadik vakalarda norovirüs prevalansı ile ilgili çok sayıda çalışma bildirilmiştir.

3.5.2.1. Salgınlarda norovirüs prevalansı ve gerçekleşme yerleri açısından salgınlara incelenmesi:

İlk tanımlanması da bir salgın sonrası yapılan Norovirüs'ün kısa bir süre içinde salgınlara olan ilişkisi dikkatleri çekmiştir (15).

Norovirüs kaynaklı salgınlara sıklığı ile ilgili Dünya'nın farklı bölgelerinde büyük çaplı sörveyans çalışmaları yapılmıştır. Örneğin Japonya'dan bildirilen bir çalışmada 60 salgının %77'sinin (99), CDC (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri)'nin Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2000-2004 yılları arasında gerçekleşen 226 akut gastroenterit salgınına incelediği çalışmada ise salgınlara %80'inin norovirüs kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (100). Avrupa'da 1995-2000 yılları arasında gerçekleşen 3714 salgının %85'inden fazlasının (101), yine ABD'de yapılan bir ulusal sörveyans çalışmasında tek etiyolojik ajanla gerçekleşmiş salgınlara %68'inin norovirüs kaynaklı olduğu bildirilmiştir (102). Benzer şekilde ABD ve Japonya'da 1996-2004 yılları arasında bakteriyel olmayan akut gastroenterit salgınlara norovirüs sıklığının %90'lara varabildiği (%73-96) bildirilmiştir (17).

Sonuç olarak norovirüsün tanımlanmasının ve tanıya yönelik testlerin kullanılmasının ardından geçmişten günümüze epidemik gastroenteritlerin en sık nedeni olduğu görülmektedir (17,103).

Norovirüs salgınlara ortaya çıktığı yerler incelendiğinde bazı ülkelerde ilk sırada olmak üzere büyük bir payı hastaneler, bakımevleri gibi sağlık bakımı ile ilişkili kuruluşlar oluşturmaktadır (104,102,14). Aynı zamanda bu merkezlerde gelişen gastroenterit salgınlara içerisindeki en büyük payı norovirüs enfeksiyonları oluşturmaktadır (105). 1970'li yıllardan bu yana dünyanın çok farklı yerlerinden bu tip merkezlerde gerçekleşen salgınlara bildirilmiştir (Tablo 2). Dönemin tanı yöntemleri kullanılarak etkenin belirlendiği bu salgınlara etkilenen bireylerin sayısı salgının gerçekleştiği merkeze göre değişmektedir. Örneğin bir pediatrik onkoloji ünitesinde gerçekleşen salgında 13 kişi etkilenirken, üçüncü basamak bir hastanede gerçekleşen salgında 400'ü aşkın kişinin etkilendiği bildirilmiştir. Bildirilen salgınlarda sağlık

bakımı alan kişilerle birlikte sağlık bakımı veren personellerin de etkilenebildiği görülmektedir. Sağlık bakımı veren kuruluşlarda uzun süreli salgınlarda görülebilmektedir. Örneğin Finlandiya’da üçüncü basamak bir hastanede gerçekleşen salgın 8 ay sürmüş ve salgını sonlandırmak için agresif kontrol önlemlerinin alınması gerekmiştir (106).

Hastane salgınları için risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada, salgınların hastane odalarını paylaşan hasta sayısı, yaş, hastaneye başvuru sayısı, komorbidite, kusmanın belirtisinin görülmesi gibi parametrelerden bağımsız olduğu ancak GII.4 genotipi ile gerçekleşen norovirüs enfeksiyonları ile salgınların güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir (107).

Tablo-2: Farklı ülkelerde sağlık bakımı ile ilişkili kuruluşlarda gelişen bazı norovirüs salgınları.

Bildirildiği Ünite / Ülke	Etkilenen Kişi Sayısı	Salgın Süresi	Yıl	Yöntem	Kaynak
Hastane / Kuzey Kaliforniya	114 (95 Hasta, 21 personel)	3 ay	1978	İmmün Elektron Mikroskopi	108
Hastane / Toronto	126 (57 hasta, 69 çalışan)	26 gün	1983	İmmün Elektron Mikroskopi, Serokonversiyon	109
Hastane /Dublin	95 (47 hasta,48 çalışan)	15 gün	1993	İmmün Elektron Mikroskopi	110
Rehabilitasyon Merkezi / Finlandiya	>300	~2 ay	1999-2000	RT-PCR	111
Geriatrik Rehabilitasyon Merkezi / Yeni Zelanda	41	14 gün	2000	RT-PCR	112
Üniversite Hastanesi / İsviçre	63	31 gün	2001	RT-PCR	113
Hastane / Belçika	33	12 gün	2002	RT-PCR	114
Pediyatrik Onkoloji Ünitesi / Almanya	13	36 gün	2006	RT-PCR	115
Üçüncü Basamak Hastane /Finlandiya	445	8 ay	2006-2007	RT-PCR	106
Pediyatrik Onkoloji Ünitesi / New York	14	22 gün	2014	RT-PCR	116

Sağlık bakımı veren kuruluşlara göre daha az olmakla birlikte norovirüs salgınları çok farklı yerlerde meydana gelebilmektedir (104). Gemilerde, askeri birliklerde, okullarda, yaz kamplarında, otellerde, yürüyerek uzun seyahat eden topluluklarda, göçmen kamplarında hatta konser salonları dâhil olmak üzere birçok yerde norovirüs salgınları bildirilmiştir (117-127). Örneğin Türkiye’de bulunan Amerika Birleşik Devletleri İncirlik Askeri Üssü’nde bir ay boyunca süregelen, Türkiye’de daha önce bildirilmeyen genotiplerin de izole edildiği ve 187 kişinin etkilendiği bir Norovirüs salgını gerçekleşmiştir (118).

Dominik Cumhuriyetinde bir otelde 2007 yılında 15 günlük bir sürede 800 kişinin etkilendiği bir salgın gerçekleşmiş salgın uygulanan hijyen önlemleri ile kontrol altına alınamamış ve otele misafir alımı durdurularak salgının devam etmesi engellenmiştir (124).

Çin’de 2004 yılında bir okulda su kaynaklı bir norovirüs salgını gerçekleşmiş ve 100 kadar birey bu salgından etkilenmiştir. İngiltere’de bir okulda meydana gelen salgında ise salgını sonlandırmak için okul 4 gün kapatılmak durumunda kalmıştır. (120,121).

Sık olmamakla birlikte salgınların ortaya çıktığı farklı yerler de bildirilmiştir. Örneğin konser salonunda çevre kontaminasyonu nedeniyle gerçekleştiği düşünülen bir salgında beş gün gibi bir sürede 300’den fazla insan salgından etkilenmiştir (127). Bir diğer ilgi çekici salgın da ABD’nin Virginia eyaletinde uzun mesafe yürüyücülerinin yaptığı bir yolculukta meydana gelen norovirüs salgını olup salgının yayılmasında olasılıkla insandan insana bulaşın rol oynadığı düşünülmüştür (125).

3.5.2.2. Norovirüsün sporadik gastroenteritlerdeki prevalansı:

Norovirüsün salgınlardaki tartışmasız yerinin yanında sporadik vakalarda da norovirüs varlığı göz ardı edilemeyecek seviyededir (3). Norovirüs prevalansı ile ilgili yapılan kapsamlı derlemelerde birbirine yakın oranlar bildirilmiştir. 1990-2008 yılları arasındaki sporadik gastroenterit bildirimlerinin derlendiği bir çalışmada hastaneye yatış gerektirmeyen vakalarda norovirüs prevalansı %12 (%5-36), hastaneye yatış gerektiren vakalarda %11 olarak bildirilmiştir (128). Benzer şekilde 2008-2014 yılları arasındaki 175 çalışmanın derlendiği bir meta-analizde akut gastroenterit vakalarında norovirüs sıklığı %18 (%17-29) olarak bildirilmiş, bu oranın toplumda (%24) ve poliklinik hastalarında (%20) yatan hastalara göre (%17) daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (8). Bölgesel düzeyde bildirilen çalışmalarda sporadik vakalarda norovirüs sıklığına ait veriler bu oranın gelişmekte olan ülkelerde %17, Orta Doğu ve Kuzey

Afrika bölgesinde %0.82-%36.4 aralığında, Latin Amerika'da %15, Japonya'da %20,6 olduğunu göstermektedir (129-132).

3.5.3. Bulaş yolları ve Kaynakları

3.5.3.1. Bulaş yolları

Norovirüs enfeksiyonları için bulaş yolu ön planda fekal-oral yol olup (3), hava yolu ile bulaş da tariflenmiştir (133).

3.5.3.2. Bulaş kaynakları

Norovirüs enfeksiyonları için kontamine gıdalar, su ve çevre bulaş kaynakları olabilmektedir. Enfeksiyonun doğal seyri dolayısıyla enfeksiyon kaynaklarının fekal kontaminasyonu ön planda olsa da kusmanın da özellikle çevre kontaminasyonu ve hava yolu ile bulaşa rol aldığı bildirilmiştir (61). Norovirüsle enfekte olmuş kişilerin asemptomatik dahi olsalar dışkı ve kusmuklarının bir gramında 10^5 - 10^{11} viral partikül bulunduğu bildirilmiştir (134).

3.5.3.2.1. Gıda kaynaklı enfeksiyonlar

Tüm viral etkenlerin rolü 1973-1987 yılları arasında salgın şeklinde olan gıda kaynaklı hastalıkların derlendiği bir çalışmada %5 olarak bildirilmesine karşın (135) günümüzde gıda kaynaklı salgınların en sık nedeninin norovirüs olduğu bildirilmektedir. Bazı ülkelerin ulusal surveyans çalışmalarında norovirüs salgınlarının en sık insandan insana bulaşla gerçekleştiği bildirilse de (104,100), literatürün norovirüs enfeksiyonunun bulaş yolu açısından değerlendirildiği kapsamlı derlemelerde en sık bulaşın gıda kaynaklı olduğu bildirilmiştir (14). Çeşitli gıdalar norovirüs enfeksiyonları için kaynak olabilmekte ve büyük çaplı salgınlara neden olabilmektedir. Almanya'da 2012 yılında yaklaşık 11000 kişinin etkilendiği bir salgın meydana gelmiş ve bu salgının Çin'den ithal edilen bir donmuş çilekten kaynaklandığı bildirilmiştir (136). Benzer bir örnek 2010 yılı sonu ve 2011 yılı başında gerçekleşmiş olup genetik analizlerle de birbirleriyle olan ilişkisi kanıtlanan donmuş frambuaz kaynaklı 8 salgın bildirilmiştir (137). Yeşil yapraklı sebzeler, fabrika üretimi dondurma, nori gibi japon kültürüne özgü gıdalarla bildirilen salgınların yanında norovirüs enfeksiyonuna neden olduğu bildirilen gıda kaynakları içinde başı deniz ürünleri çekmektedir (138-141). Bu deniz ürünleri içerisinde de istiridye gibi kabuklu deniz ürünleri ilk sırada yer almaktadır (141). Bu sıklığın nedeni, kontamine deniz suyunu filtre eden kabuklu deniz canlılarının norovirüs partiküllerini dokularında konsantre

etmesi (142), araştırmacıların geçmişten gelen sık bildirilerden etkilenecek bu nedenle gerçekleşen salgınları bildirmeye daha yatkın olması, diğer kaynaklara göre enfeksiyonun etkenin aydınlatılması için daha kolay bir örnek olması gibi çeşitli iddialara dayandırılrsa da kesin olarak ortaya konulmamıştır (141).

Gıda kontaminasyonunun muhtemel gerçekleşme yolunun ise gıdaların kontamine su ya da çevre ile temas ya da norovirüs ile enfekte kişilerin gıdayı hazırlarken kontamine etmesi olabileceği bildirilmiştir (141-143).

3.5.3.2.2. Su kaynaklı enfeksiyonlar

Norovirüs enfeksiyonları için önemli bir bulaş yolu da sudur. Su kaynaklı norovirüs enfeksiyonu salgınları ilk olarak 1982 yılında bildirilmiştir. Bildirilen salgınlardan biri 1500 kişinin etkilendiği düşünülen ve şehir suyunun kaynak olduğu, diğeri ise bir yaz kampında ortaya çıkan salgınlardır. Bu salgınların suyla bulaşan norovirüs enfeksiyonu olduğu klinik bulgular ve serokonversiyonla gösterilmiştir (144,145). Takip eden yıllarda da suyun kaynak olduğu salgınlar bildirilmeye devam etmiştir. 1998 yılında Finlandiya’da gerçekleşen 1700-3000 kişinin etkilendiği bir salgında hastaların dışkılarından izole edilen amplifikasyon ürünü şehir suyunda da tespit edilmiş ve ilk kez bir şehir suyunda Norovirüs genomunun varlığı gösterilmiştir (146). Otellerde, tatil yörelerinde de su kaynaklı salgınlar bildirilmiş (147,148), kimi zaman bu salgınlar İsveç’in yerel nüfusunun 13000 olduğu bir bölgesinde yaklaşık 2400 kişinin etkilendiği salgın gibi büyük çaplı olabilmiştir (149). Yer altı suları da norovirüs enfeksiyonları için kaynak olabilmektedir. Yer altı suyundan kaynaklanan bir salgında, yer altı su kaynağına karışan arıtılmış atık suyun kontaminasyona neden olduğu tespit edilmiş, atık su içerisinde bulunan yüksek viral yükün arıtma sırasında ve arıtma sonrası yer altı su kaynağına topraktan geçerek ulaşması sırasında azalmış olduğu ancak yine de bunun yeterli olmayarak salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (150). Su kaynaklı salgınlar yakın geçmişe kadar devam etmektedir, 2016 yılında bir otelden bildirilen salgında enfeksiyona neden olan su ve hastalardan aynı kapsid genotipine sahip amplikon varlığı gösterilmiş ve su kaynağının enfeksiyonla ilişkisi bu sayede ortaya konulmuştur (151).

3.5.3.2.3. Diğer kaynaklar

Norovirüs enfeksiyonları için gıda ve su dışında enfekte birey, çevre, yüzme havuzu veya göl gibi eğlence-yüzme merkezleri de kaynak olabilmektedir (152-155)

Bulaş için enfekte birey de önemli bir kaynak olup insandan-insana bulaş bazı ülkelerde norovirüs enfeksiyonları için en sık bulaş şekli olarak tariflenmiştir (101). İnsandan insana bulaşla gerçekleşen enfeksiyonun ilginç bir örneği bir futbol karşılaşması sonrasında tariflenmiştir: kusma ve ishal şikayetleri olan bir takımla ortak yemek ve içecek hikayesi olmayan diğer takımı üyelerinde futbol maçı sonrası kusma, ishal semptomları gelişmiş ve her iki takım üyelerinde de aynı sekansa sahip norovirüs genogrup I varlığı gösterilmiştir (156).

Çevre kontaminasyonu doğrudan bir bulaş kaynağı olabileceği gibi diğer bulaş kaynaklarını da etkileyebilecek bir durumdur, örneğin kontamine olmuş çevrede hazırlanan bir gıda kaynağı bulaşa neden olabilir (157,158). Kontamine olmuş çevre ile doğrudan temasla da salgınlar bildirilmiştir. İngiltere’de Ocak-Mayıs ayları arasında devam etmiş bir otel salgınınında 850 otel misafiri salgından etkilenmiş ve alınan çevre örneklerinin moleküler incelemesinde norovirüs varlığı gösterilmiştir (159). Yine benzer şekilde bir uzun dönem bakım evinde çevre kontaminasyonu nedeniyle gerçekleşen salgında hastalardan ve çevreden alınan örneklerdeki norovirüs sekanslarının aynı olduğu gösterilmiştir (160).

3.5.4. Yaş

Gastroenterit salgınlarıyla ilgili çalışmalar incelendiğinde norovirüs enfeksiyonlarının diğer virüslerden farklı olarak her yaşta görülebildiği bildirilmiş ve bu durum norovirüs enfeksiyonlarına karşı kalıcı immünite oluşmamasına bağlanmıştır (161). Prospektif bir kohort çalışmada norovirüsün yine her yaş grubunda sıklıkla tespit edilebildiğini ancak norovirüs ile ilişkili gastroenteritlerin en sık çocuk ve yaşlı hastalarda görüldüğü (56) belirtilse de Norovirüs’ün global prevalansı ile ilgili yapılan kapsamlı bir çalışmada beş yaş üstü ve altı yaş gruplarında norovirüs enfeksiyonlarının görülme sıklığı eşit olarak bildirilmiştir (8). Literatür taramasında norovirüs enfeksiyonlarında yaşla ilgili dikkat çekici bir durum da yaşamın ilk 6 ayında norovirüs enfeksiyon oranlarının düşük olmasıdır. Beş yaş altı çocuklarda norovirüs enfeksiyonlarının yaşlara göre dağılımını inceleyen bir çalışmada bu enfeksiyonların % 70’inin 6-23 ay arasında gerçekleşirken, %15’ten daha azının ilk 6 ayda gerçekleştiği bildirilmiştir (162).

3.5.5. Sezon

Sporadik veya salgın şeklinde seyreden norovirüs vakalarının ayrımının yapılmadığı bir çalışmada norovirüs enfeksiyonlarının yıl boyunca görülebildiği bununla birlikte soğuk havalarda pik yaptığı bildirilmiştir (163). Yine benzer şekilde norovirüs enfeksiyonlarının yıl boyunca görülebildiğini bildiren bir derlemede ise salgınların daha çok soğuk havalarda gerçekleştiği belirtilmiştir (3). Norovirüs sezonu ile ilgili yapılan bir meta-analiz çalışmasında sporadik norovirüs vakalarının %50'den fazlasının, norovirüs salgınlarının %40'tan fazlasının kış aylarında, hem salgın hem de sporadik vakaların ise %70'ten fazlasının serin aylarda (Kuzey Yarımküre için Kasım- Mart, Güney Yarımküre için Nisan-Eylül) görüldüğü bildirilmiştir (164). Aynı çalışmada sürpriz bir şekilde salgınların sezonla olan ilişkisinin vakalara göre daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Çalışma Avrupa ve Asya için dâhil edilen veri açısından iyi bir gösterge olmakla birlikte, bazı bölgelerden (Güney Amerika, tropikal bölgeler, Afrika gibi veri kısıtlılığı nedeniyle) az sayıda çalışma incelenebilmiş olup sezon hakkında daha net çıkarımda bulunabilmek için Güney Yarımküre ve gelişmekte olan ülkelerden daha fazla veri sağlanması gerektiği vurgulanmıştır. Bu genel görüşün yanında Norovirüs enfeksiyonlarının yaz aylarında pik yapabileceğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Bildirilen bir süveyans çalışmasında İngiltere'de 2002 yılında Norovirüs enfeksiyonlarının yaz ortasında pik yaptığı, İspanya'da bir yıl süresince yapılan bir çalışmada da kış aylarında hiç norovirüs enfeksiyonu görülmediği ve enfeksiyonların yaz aylarında pik yaptığı bildirilmiştir (165,166).

3.5.6. Moleküler epidemiyoloji

Bu gruptaki çalışmaları daha iyi değerlendirebilmek için öncelikle Norovirüs'ün genetik klasifikasyonu için yapılan çalışmaların genel akışından kısaca bahsetmek yararlı olacaktır. Norovirüsün kabul edilebilir genetik klasifikasyonu için hem genetik hem de antijenik yapı açısından tutarlılık göstermesi gerektiği bu yüzden amplifikasyonu RNA bağımlı RNA polimeraz genine göre daha zor da olsa majör kapsit proteininden sorumlu ORF-2 bölgesi kullanılarak genetik klasifikasyonunun yapılması önerilmiştir (39). Ayrıca yapılan tüm genom analizleri doğrultusunda RNA polimeraz geninin genogruplar içindeki genetik kümelenmeleri ayıramadığı bu yüzden genotipleme için kullanıma uygun bölge olmadığı bildirilmiştir (167). Sonuç olarak norovirüs majör kapsit proteini olan VP1 proteini baz alınarak genogrupsa ayrılmıştır (30). Ancak ilerleyen çalışmalarla rekombinant formların varlığı da gösterilmiş ve bu tanımlanan rekombinant formların rekombinasyonun ORF1 ve ORF2 bölgelerinin üst üste gelen kısmında olduğu gösterilmiştir (168,169). Bunun sonucunda genotipler ve güncel

isimlendirme norovirüs genomunun hem polimeraz (ORF-1) hem de kapsit bölgesi (ORF-2) baz alınarak yapılmakta ve web bazlı bir veritabanına global bilgi akışı sağlanarak oluşturulmaktadır (170,171). Bu bilgiler ışığında geçmişten günümüze dolaşımda olan genotiplere göz atacak olursak uzun yıllar boyunca GII.4 genotipinin (kapsit genotipi) tartışmasız üstünlüğü dünyanın farklı yerlerinden bildirilen çalışmalarla kanıtlanmıştır (16,172,173,174). Ancak 2014 yılında ilk kez Asya'dan bildirilen GII.P17-GII.17 genotipinin (Kawasaki 2014) (175,176), 2015-2016 yıllarında Tayland gibi yakın coğrafik bir bölgede GII.4 'ün önüne geçtiği (177), Avrupa gibi uzak coğrafi bölgede de yaygın olarak dolaşımda olduğu bildirilmiştir (178). İlk olarak Asya'dan bildirilen bu virüsün genom analizi yapılarak ABD'de de tespit edilmesiyle global yayılım gösterdiğine kanıt oluşturulmuştur (179). 2016 yılının sonları ve 2017 yılının ilk aylarında ise İtalya'dan GII.p16-GII.2, GII.p16-GII.4 ve yine Tayland'dan GII.p16-GII.2 rekombinant formlarının dolaşımda olan baskın genotipler olduğu bildirilmiştir (180,177).

3.5.7. Türkiye'de norovirüs

Ülkemize ait bir norovirüs sürveyans sistemi bulunmamaktadır. Konuyla ilgili az sayıda çalışma yapılmış olup tabloda sporadik vakalarda yapılan çalışmalara bazı özellikleriyle beraber yer verilmiştir. Bu çalışmalarda pozitiflik oranı %8 -%25.8 aralığında değişmekle birlikte çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklı oluşu, çalışmaya dahil edilen hastaların genelde çocuk yaş gurubunda olmaları yine çalışmaya dahil edilen hasta grubunun semptomları arasındaki farklılık dikkat çekmektedir (Tablo 3). Bir diğer farklılık da bazı çalışmalara diğer enfeksiyöz etkenlerin varlığının dışlandığı örneklerin dâhil edilmesidir. Genel bir bakış açısıyla değerlendirildiğinde moleküler yöntemlerin kullanıldığı ve bazı enfeksiyon etkenlerin dışlandıktan sonra norovirüs varlığının araştırıldığı çalışmalarda daha yüksek pozitiflik oranları bildirilmiştir (181-184). IKG ya da EIA yöntemlerinin tercih edildiği çalışmalarda ise daha düşük oranlar bildirilmiştir (185-187).

Bu çalışmaların dışında literatür taramasında biri 2008 diğeri 2014 yılında olmak üzere iki norovirüs salgını bildirilmiştir. Salgınlarda norovirüsün varlığı moleküler yöntemlerle doğrulanmıştır (188,189). Son olarak 2009 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarına akut gastroenterit ön tanısıyla gönderilen 147 örnekten 65'inde viral bir etken varlığı bildirilmiş ve bu viral etkenlerden %75'inin norovirüs olduğu tespit edilmiştir (190). Tüm çalışmalara göre en yüksek oranın bildirilmesinin muhtemel nedeni çalışmaya dâhil edilen hasta grubudur. Makale içerisinde bu

durumla ilgili bir açıklama mevcut olmasa da viroloji referans laboratuvarına gönderilen örneklerin bakteri, parazit ve rota/adenovirüs gibi virüslerin varlığı açısından araştırılmış ve saptanamamış örnekler olması yüksek olasıdır.

Tablo-3: Türkiye’de yapılan bazı norovirüs çalışmaları.

Yıl	Şehir	Yöntem	Yaş	Hasta Sayısı / Pozitiflik (%)	Şikayet Tanı /	Kaynak
2004-2011	Ankara	ELISA	0-5 yaş	1000/14.1	Akut gastroenterit	185
2006-2007	Afyon	Moleküler	<10 yaş	88/17	İshal	181
2008-2009	İstanbul	Moleküler	6 ay-14 yaş	238/5.1	İshal	182
2009	İstanbul	İmmunokromatografi	3ay-16 yaş	520/9.6	Akut gastroenterit	186
2011-2012	İstanbul	İmmunokromatografi	Tüm yaş grubu	173/8.1	Akut viral gastroenterit	187
2012	Ankara	Moleküler	<5 yaş	31/25.8	İshal	183
2012-2013	Çanakkale	ELISA+PCR	1-85 yaş	92/17.4	İshal	184

3.6. TANI

Geçmişten günümüze norovirüs enfeksiyonlarının klinik ve epidemiyolojik özelliklerinden faydalanarak, elektron mikroskopisiyle, antijen antikor ilişkisine dayalı ve moleküler yöntemlerle tanısı konulmaya çalışılmıştır.

3.6.1. Klinik ve Epidemiyolojik Özelliklere Dayanan Tanı Kriterleri

Kaplan ve ark. 1982 yılında norovirüs salgınlarının klinik ve epidemiyolojik profili temelinde dört kriter belirlemişlerdir (191):

1. Dışkı örnekleri bakteriyel ve yapıyorsa parazitik yönden incelenme sonucu negatif olmalı
2. Vakaların %50 veya fazlasında kusma görülmeli
3. Ortalama hastalık süresi 12-60 saat arasında olmalı
4. Ortalama inkübasyon süresi 24-48 saat olmalı

2006 yılında bu kriterlerin tekrar değerlendirildiği bir çalışmada kriterlerin yüksek özgüllükte (%99), orta düzey duyarlılıkta (%68) olduğu ve tanı testleri yaygın olarak kullanılabilecek kadar norovirüs etkenli gıda kaynaklı salgınların tespitinde geçerli bir yöntem olduğu bildirilmiştir (192). Sonuç olarak laboratuvar testlerine ulaşımın sınırlı olduğu veya örnek elde etmenin mümkün olmadığı durumlarda bu kriterlerin kullanımının tanıda yol gösterici olacağı bildirilmektedir (30).

3.6.2. Elektron Mikroskopisi

Norovirüsün ilk tanımlanması elektron mikroskopisiyle gerçekleşmiş (4) ve bu yöntem norovirüs genomunun sekans analizi yapılabilecek virüs tespitinde temel metot olmuştur. Alternatif metotların yokluğunda salgınların etiyolojisini aydınlatmak için kullanılan bu yöntemin (33) diğer viral partiküllerin görülmesine imkan sağlaması gibi kısmi avantajları mevcut olsa da donanım gerekliliği, maliyetinin yüksek ve duyarlılığının düşük oluşu gibi yaygın kullanımını etkileyen dezavantajları vardır (30).

3.6.3. Norovirüs Antijen Tespiti

Antijen tespitine dayalı tanı yöntemleri kullanım kolaylığı açısından büyük avantaj sağlamaktadır (30). Bu prensibe dayalı tanı yöntemleri geçmiş yıllardan itibaren farklı işaretleme metotları geliştirilerek norovirüs tanısında kullanılmıştır (193-195).

3.6.3.1. Enzim immunoassay

Ticari olarak geliştirilmiş olan birçok enzim immunoassay yöntemi dışkıda Norovirüs GI ve GII antijenlerinin tespiti için kullanılmaktadır (13). Bu yöntemin geliştirilmesinde karşılaşılan güçlüklerden biri çok sayıda norovirüs genotipini kapsama durumu olup bir diğeri de bazı suşlarda görülen antijenik değişikliklerdir (30). Genogruplara spesifik monoklonal antikorlar tanımlanmış olsa da ticari kitlerde genellikle bir kaç çapraz reaktif monoklonal ve poliklonal antikor kombinasyonları kullanılmıştır. Kitlerin duyarlılık ve özgüllükleri; salgın veya sporadik vakalarda kullanımı, alınan örnek sayısı, belirtilerin başlangıcından örnek toplanmasına kadar geçen süre gibi durumlara bağlı olarak değişkenlik gösterse de genellikle özgüllükleri %90'ın üzerinde, duyarlılıkları ise %70'in altındadır (30). Farklı ticari kitlerin referans moleküler yöntemle kıyaslandığı çok sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmaların topluca incelendiği bir derlemede yöntemin duyarlılığının %31.6-%92, özgüllüğünün ise %65.3-%100 aralığında olduğu bildirilmiştir (13). Bu geniş duyarlılık aralığına dışkıdaki viral

yük, kullanılan antikorun farklı genotiplerle gerçekleşen enfeksiyonlarda gösterdiği affinite farklılığı, örneklerin alınma zamanı, çalışmaya dâhil edilen hasta grubu (pediatrik, erişkin gibi), hasta grubunun salgın veya sporadik vakalardan oluşması gibi çeşitli faktörlerin neden olabileceği belirtilmiştir (13).

Avrupa’da yapılan çok merkezli bir çalışmada bu yöntemlerin duyarlılıkların salgınlarda ve çok sayıda örnek alınması durumunda arttığı bildirilmiştir (196). Yine benzer sonuçlar elde edilen bir diğer çalışmada bu tanı metodunun salgınlarda çok sayıda örnek olarak tarama yöntemi olarak kullanılabileceği ancak sporadik vakaların moleküler yöntem kullanılarak tespit edilmesi gerektiği bildirilmiştir (197).

Sonuç olarak enzim immunoassay yöntemi kolay uygulanabilir, özel laboratuvar koşulları gerektirmeyen, kısa sürede sonuç veren ancak duyarlılıkta yaşanan sıkıntılar nedeniyle daha çok salgınlarda kullanılması önerilen bir yöntemdir (13).

3.6.3.2. İmmunokromatografi

İmmunokromatografi; enzim immunoassay yöntemine benzer prensiple çalışmakta olan ve yine yüksek özgüllük gösteren, çok kolay uygulanabilen, 15 dakika gibi kısa bir süre içerisinde sonuç verebilen bir tanı yöntemidir (30). Bu yöntemle çalışan, GI ve GII genogrup antijenlerinin tespit etmeye yönelik birçok ticari kit mevcuttur. EIA yöntemi ile benzer şekilde moleküler yöntemle yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda geniş aralıklı duyarlılık yüzdeleri (%17-%90.2) bildirilmiştir (13). Dört ayrı ticari kitin moleküler yöntemler ile karşılaştırıldığı bir çalışmada grup spesifik duyarlılık yüzdeleri verilmiştir. Özellikle GI için daha düşük duyarlılık yüzdeleri tespit edilirken, GII için bildirilen en yüksek duyarlılık yüzde %64’tür (198). Sonuç olarak immunokromatografi yönteminin pozitif sonuçlar için kabul edilebilir ancak negatif sonuçlar için nükleik asit amplifikasyon testleri ile doğrulanması gereken bir yöntem olduğu kanısı oluşmuştur (13,198).

Bu tanı metodlarının yanında immunolojik yöntemlerle ilgili gelişmeler halen devam etmektedir, örneğin 2018 yılında yayınlanan bir çalışmayla floresan partiküllerle işaretlenmiş şerit test (strip test) ile kullanılan referans yöntemine göre daha düşük viral yüklerin tespit edildiği bildirilmiştir (199).

3.6.3.3. Moleküler tanı yöntemleri

Norovirüsün genomik yapısının aydınlatılmasının ardından gelişen moleküler yöntemlerin norovirüs tanısında kullanılması da gecikmemiştir (200-203). Birinci nesil çalışmalarda kullanılan primerler ilk tanımlanan norovirüs genomu temel alınarak hazırlandığından norovirüsün genetik çeşitliliğine yeterince yanıt verememiş ayrıca klinik örneklerle uygulandığında istenen performansı gösterememiştir (13). İkinci nesil çalışmalarda norovirüse ait artan sekans bilgilerinden yararlanılmış olsa da (14,204) norovirüs çeşitliliğini kapsayacak primer seçimindeki güçlük beş farklı ikinci nesil konvansiyonel PCR'ın karşılaştırıldığı çalışmada da ortaya konulmuştur (205). Karşılaşılan bu problem çok sayıda ideal primer seçimine yönelik çalışmayı da beraberinde getirmiştir (206-210). 2002 yılında ORF1-ORF2 birleşim bölümünün norovirüs genomunda iyi korunmuş bölge olduğunun gösterilmesinin ardından (167) tanı için de iyi bir hedef bölge olabileceği gösterilmiş (211,212) böylece primer seçiminde önemli bir yol kat edilmiştir. Konvansiyonel PCR yöntemlerinde yaşanan bir diğer sorun da posthibridizasyon aşamasında yaşanan problemlerdir; bu problemin aşılması için agaroz jele ihtiyaç duyulmayan gerçek zamanlı PCR yöntemine yönelim başlamış (213-215) ve gerçek zamanlı RT-PCR'ın uygun bir rutin tanı yöntemi olduğu bildirilmiştir (216). Tüm bu gelişmelerin doğal sonucu olarak farklı menşeli RT-PCR temelli ticari kitler de norovirüs tanısında yerini almıştır (13). Literatürde bu ticari kitlerle yapılmış karşılaştırmalı çok sayıda çalışma mevcut olup genellikle %90'ın üzerinde özgüllük ve duyarlılık bildirilmiştir (217,218).

Tanı yöntemlerinde ki gelişmeler devam ettikçe norovirüsün tanısında da gelişmeler devam etmektedir; multipleks PCR panelleri (219,220), izotermal amplifikasyon (221,222), üç boyutlu dijital PCR yöntemleri (223-226) bu gelişmeler ışığında doğan yöntemlerden bazılarıdır.

3.7. TEDAVİ

Norovirüs ilişkili gastroenteritlerin tedavisi diğer birçok gastroenteritte olduğu gibi elektrolit dengesini sağlamak ve dehidratasyonu engellemek amaçlı yapılacak destek tedavisidir.

Literatür taramasında norovirüse özgü kesin kabul görmüş bir tedaviye rastlanılmamıştır. Bu konudaki çalışmaların bir kısmı klinik olarak yanıt alınan tedavi yöntemlerine ait olup bir kısmı

da virüse veya konağa özgü hedef bölgelere yönelik moleküllerle yapılan potansiyel tedavi çalışmalarıdır.

İlk olarak antiprotozoal bir ilaç olarak geliştirilen ve piyasada bulunan ancak daha sonra antiviral etkinliği olduğu anlaşılan nitazoksanid'in (227) hastalığın semptomlarının gerilemesinde başarılı olduğu görülmüştür. Kronik norovirüs enfeksiyonu ve transplantlı hastada vaka bildirimi şeklinde olan çalışmalarda başarılı sonuç alındığı gösterilmiş (228,229) ayrıca pediatrik yaş gurubunda yapılan, küçük çaplı, randomize çift kör plasebo kontrollü bir çalışmada da nitazoksanid ile tedavi edilen hastalarda belirtilerin gerileme süresinin kısaldığı bildirilmiştir (230).

Klinik olarak yanıt alındığı bildirilen bir diğer tedavi de immunglobulin tedavisidir. Vaka bildirimi veya vaka serileri şeklinde olan bu çalışmalar transplantlı ve/veya immün sistemi baskılanmış hastaları içermektedir. Bu çalışmalarla ilgili dikkat çeken bir diğer ayrıntı da immunglobulin tedavisinin oral/enteral yolla gerçekleşmiş olmasıdır (231-234).

In vitro veya hayvan deneylerinde yüz güldüren sonuçlar elde edilen potansiyel moleküllerle ilgili çalışmalarda virüse ve konağa ait farklı bölgeler hedef alınmıştır (235,236). Potansiyel tedavilere yönelik 2CMC gibi viral polimerazı (237-240), rupintrivir gibi viral proteazı (241), konakta reseptör görevi gören molekülleri hedef alan (242,243) veya konakta antiviral aktiviteyi artırdığı bildirilen IFN-λ ile tedaviye yönelik (244,245) çalışmalar mevcuttur.

3.8. KORUNMA

3.8.1. Virüsün Çevre Koşullarına Dayanıklılığı ve İnaktivasyonu

Norovirüs'ün çevre koşullarına ve kimyasallara dayanıklılığı ile ilgili 90'lı yıllardan itibaren bilgi sahibi olunmaya başlanılmışsa da (246) hücre kültüründe üretilmeyişi nedeniyle takip eden yıllarda çalışmalar insan norovirüsüne genetik yakınlığı olan virüsler kullanılarak yapılmıştır (247-250). Örneğin *Caliciviridae* ailesinin üyelerinden biri olan feline calicivirüs, hepatit a virüsü, poliovirüs tip 1 ve iki kolifajın UV ile inaktivasyonu incelenmiş ve aralarında en dayanıklı olanın feline calicivirüs olduğu bulunmuştur (247). Benzer şekilde virüs inaktivasyonu için gereken iyonize ve iyonize olmayan radyasyon dozunun tespiti için feline ve canine calicivirüsü kullanılmış ve tespit edilen dozların insan norovirüs inaktivasyonu için doğrudan kullanılamasa da fikir verici olduğu bildirilmiştir (248). Yine feline calicivirüsün kuru

ortamda 37°C de bir gün aktif kalamadığı bildirilmiş olup (250) norovirüsün çevresel koşullara dayanıklılığını belirlemek amaçla rekombinan yolla oluşturulan viral partiküller de kullanılmıştır. Bu viral partiküllerin ph 3-7 aralığına ve 55°C sıcaklığa kadar dayanıklı oldukları ancak 60°C üstünde sekonder, tersiyer ve kuartener protein yapılarının değişikliğe uğradıkları saptanmıştır (251).

Dezenfektanlarla yapılan çalışmalarda da benzer şekilde *Caliciviridae* ailesine ait üyeler kullanılmıştır (249,250). Feline calicivirüs ve canine calicivirüs ile yapılan bir çalışmada %70'lik etanolün virüs inaktivasyonunda yetersiz olduğu, bildirilmiş, sodyum hipokloritle inaktivasyonda ise canine calicivirüs için 300 ppm, total inaktivasyon için 3000 ppm konsantrasyona ihtiyaç duyulmuştur (249). Feline calicivirüs ile yapılan bir diğer çalışmada anyonik deterjan solüsyonunun, etanolün, kuartener amonyum yapıda dezenfektanların virüs inaktivasyonunda başarısız olduğu, belirli konsantrasyonda hazırlanmış sodyum hipoklorit, gluteralehit ve iyot bazlı deterjanların ise virüs inaktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir (250). Benzer şekilde bezle yapılan anyonik deterjanlı gözle görülebilir kiri ortadan kaldırdan temizlemenin insan norovirüsü ile kontamine olmuş çevrenin dekontaminasyonunda yeterli olmadığı gösterilmiştir (252).

Norovirüs enfeksiyonları için önemli bir kaynak da suyla bulaş olduğundan virüsün klorla olan dayanıklılığı da araştırılmıştır. Norovirüsün klorlamaya oldukça dirençli olduğu bildirilmişse de (253) uygun miktarlarda yapılacak klorlamanın suların dezenfeksiyonunda kullanılabileceği de ileri sürülmüştür (254).

Su gibi kontamine gıdalarda da virüs inaktivasyonu için çalışmalar yapılmıştır, örneğin kontamine taze sebzelerin sodyum metasilikat ve sodyum hipoklorit kombinasyonu kullanılarak (255), ıstiridyelerde ise yüksek hidrostatik basınç uygulaması ile virüs inaktivasyonun sağlanabileceği bildirilmiştir (256).

3.8.2. Enfeksiyon Yönetimi ve Salgın Kontrolü

Norovirüs salgınlarını önleme ve salgınların kontrol altına alınmasında el hijyeni, izolasyon prosedürlerinin uygulanması ve çevre dezenfeksiyonu önemli alt başlıklardır (257,258). Norovirüs enfeksiyonlarını önleme ve salgın kontrolünde muhtemel en önemli metot uygun bir el yıkamadır (258). Yapılan çalışmalarda sabunla yapılan el yıkama işleminin norovirüs yükünde anlamlı bir azalma gerçekleştirdiği gösterilmiş ve norovirüs enfeksiyonlarının kontrolüne yönelik hazırlanan rehberlerde de bu duruma dikkat çekilmiştir

(257-259). Bununla birlikte yaygın kullanımına rağmen alkol bazlı solüsyonların kullanımı konusunda yeterli kanıt olmadığı bildirilmiştir (257,258). Enfeksiyon kontrolünde önemli bir basamak da izolasyon ve kohortlama prosedürlerinin uygulanmasıdır (257,258). Bu uygulamalar hem bulaşın engellenmesi hem de çevre kontaminasyonunun sınırlandırılması açısından önemlidir (258). Birçok kılavuzda semptomatik, maruz kalmış asemptomatik ve maruz kalmayan asemptomatik hastaların ayrımının gerçekleştirilmesi bunun mümkün olmadığı durumlarda ise en azından semptomatik hastalara izolasyon uygulanması önerildiği bildirilmiştir (257). Son olarak kontamine çevrenin temizlenmesi ve dezenfeksiyonu enfeksiyonun kontrolünde önemli bir rol oynamakta olup, uygun konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit gibi etkinliği bilinen maddelerle dezenfeksiyon işlemi yapılmalıdır (257,258).

3.8.3. Aşı

Norovirüs için devam eden pre-klinik, faz 1 ve faz 2 aşı çalışmaları mevcut olup henüz klinik kullanıma girmiş olan bir aşı bulunmamaktadır (12). Norovirüs enfeksiyonlarından korunmak için yapılan aşı geliştirme çalışmaları geçmişten günümüze devam etmektedir. Bu çalışmaların odağında başta majör kapsid proteininden oluşan virüs benzeri partikül (VLP) olmak üzere, P partikülü ve rekombinant adenovirüs yer almaktadır (12). Virüs benzeri partiküllerin ekspresyonu; rekombinant bakulovirüsler yoluyla böcek hücreleri, memeli hücreleri, transformant mayalar ve transgenik bitkiler gibi ökaryotik hücrelerde gerçekleştirilmiştir (260-264).

Bu partiküller için farklı uygulama yolları denenmiş (265-267) hayvanlarda ve insanlarda sistemik ve lokal immüniteyi uyardığı gösterilmiştir (261-263,268,269). Hem doğal yolla gelişen immünitinin hem de humoral ve hücrel immünite aracılı yanıt gelişimine neden olan bu partikülün ancak homolog virüsle gerçekleşen enfeksiyonlara karşı koruyuculuk sağladığı bildirilmiştir (275-271). Dolayısıyla sıklıkla genotipler içinde ve arasında yeni formlar oluşturduğu bilinen norovirüsün bu özelliği aşı geliştirme çalışmalarında karşılaşılan en büyük engel olmuştur (272). Virüsün uzun yıllar hücre kültüründe üretilmemiş olması da ölü ve canlı-attenüe aşı gelişimine ayrıca bir engel oluşturmuştur (12). Norovirüs aşısının klinik kullanıma girmesi hastalığın klinik seyri, bulaş riski, hastaneye yatış ve ölüm açısından risk grubunda olan kişiler için büyük önem arz etmektedir.

4. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

4.1. HASTA GRUBU

Çalışmamıza Ocak 2018 itibariyle akut gastroenterit tanısıyla rutin bakteriyolojik dışkı kültürü için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına yönlendirilen, kabın şeklini alan yumuşak vasıflı dışkı örneği veren ve kültürü negatif sonuçlanan 184 hastaya ait dışkı örneği dâhil edilmiştir. Hastalara gönüllü bilgilendirme formu (Ek-1) ile ve sözel olarak bilgi verilmiş, katılmayı kabul eden hastalar araştırmaya dâhil edilmiştir. Çalışmaya her bir hastaya ait tek örnek dâhil edilmiş olup aynı veya farklı günlerde tekrar gelen örnekler çalışmaya alınmamıştır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından (Dosya no:2018/112 Tarih:26/02/2018 02 sayılı toplantı) onaylanmıştır.

4.2. GEREÇLER

4.2.1. Örneklerin Toplanması

Gereçler:

- Ependorf
- Pasteur pipeti
- -80°C derin dondurucu

4.2.2. Gerçek Zamanlı Múltipleks RT-PCR Kiti

Çalışmada BD MAX Enterik Viral Panel, Kanada) kiti kullanılmıştır.

4.2.2.1. Kit içeriğinde sağlanan reaktif ve materyaller

- BD MAX Enterik Viral Panel Birimlere Ayrılmış Reaksiyon Kartuşu: Örneği işleme ve DNA/RNA ekstraksiyonu için gereken tüm sıvı reaktifler (yıkama çözeltisi, ayırma çözeltisi, nötralizasyon çözeltisi), tek kullanımlık pipetler, parçalama ve karıştırma tüpleri içerir.
- BD MAX Enteric Viral Panel Ekstraksiyon Tüpü (D4): DNA/RNA manyetik afinite boncukları içeren kuru halde bulunan ekstraksiyon reaktifi, Proteinaz K, örnek işlem kontrolünü (internal kontrol) içerir.

- BD Max Enterik Viral Panel Master Miks (D5): RT polimeraz, nükleotidler, spesifik moleküler prob ve primerler ile birlikte örnek işlem kontrolüne spesifik Taqman prob ve primerler içeren kuru halde bulunan karışım
- BD Max Enterik Viral Panel Master Miks (D6): RT polimeraz, nükleotidler, spesifik moleküler prob ve primerler ile birlikte örnek işlem kontrolüne spesifik Taqman prob ve primerler içeren kuru halde bulunan karışım
- BD Max Enterik Viral Panel Örnek Tampon Tüpleri (ayırıcı kapaklarıyla birlikte)
- 5 mikrolitrelik inokülasyon özeleri

4.2.2.2. Kit içeriği dışında gerekli ekipman ve gereçler

- BD MAX PCR kartuşları
- BD MAX Sistemi
- Vorteks

4.2.3. Enzim İmmünoassay (EIA) Kiti

Çalışmada RIDASCREEN Norovirüs 3rd Generation (C1401), R-BIOPHARM, Almanya) kiti kullanılmıştır.

4.2.3.1. Kit içeriğinde sağlanan reaktif ve materyaller

1. Norovirüs monoklonal antikorları ile kaplı 96 kuyucuk (8 kuyucuk/şerit; 12 şerit)
2. 100 ml Diluent 1: Koruyucu olarak % 0.1 Kathon CG içeren protein-tamponlu NaCl solüsyonu (Diluent 1 aynı zamanda negatif kontrol solüsyonudur.)
3. 100 ml konsantre (x10) yıkama solüsyonu: Koruyucu olarak % 0.1 tiyomersal içeren fosfat tamponlu NaCl solüsyonu
4. 1,8 ml Pozitif Kontrol: İnfeksiyöz olmayan rekombinant norovirüs antijeni
5. 10 ml Konjugat 1: Stabilize protein solüsyonu içinde biotinle konjuge edilmiş norovirüs antikorları
6. 10 ml Konjugat 2: Stabilize protein solüsyonunu içinde streptavidin peroksidaz konjugatı
7. 10 ml Substrat: Hidrojen peroksit/TMB içeren solüsyon
8. 6 ml Stop reaktifi: 1 N sülfürik asit

4.2.3.2. Kit içeriği dışında gerekli ekipman ve gereçler

1. 1,5-2 ml'lik tüpler
2. Distile su

3. Tek kullanımlık pasteur pipetleri (inokülasyon için)
4. Tek kullanımlık özeler (inokülasyon için)
5. Vorteks
6. Ayarlanabilir 50 -100 µl ve 1000 µl'lik pipetler ve pipet uçları
7. Mezür (1000 ml)
9. 450nm dalga boyunda okumaya uygun mikrokuyucuklu plaklar
10. Emici kâğıt

4.2.4. İmmünokromatografi (İKG) Kiti

Çalışmada RIDAQUICK Norovirüs Test (N1402), R-BIOPHARM, Almanya) kiti kullanılmıştır.

4.2.4.1. Kit içeriğinde sağlanan reaktif ve materyaller

1. Test kasetleri
2. Reaktif A: Reaktif A: % 0.05 azit içeren spesifik anti-nörovirüs antikorları; mavi renkli solüsyon
3. Reaktif B: % 0.05 azit içeren spesifik anti-nörovirüs antikorları; sarı renkli solüsyon
4. Pasteur pipetleri
5. Reaksiyon tüpleri
6. Pipet uçları
7. 150 µl'lik mikropipet

4.2.4.2. Kit içeriği dışında gerekli ekipman ve gereçler

1. Vorteks

4.3. YÖNTEMLER

4.3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmaya katılan hastaların sulu dışkı örnekleri rutin bakteriyolojik kültür için kullanıldıktan sonra yeterli miktarda örnek olması koşuluyla biri polimeraz zincir reaksiyonu diğeri EIA ve immünokromatografi teknikleriyle çalışılmak amacıyla iki ayrı ependorfa aktarılaraq -80°C saklanmıştır.

4.3.2. Gerçek Zamanlı Múltipleks RT-PCR

- 80°C saklanan örnekler oda sıcaklığında çözülerek dışkıda Norovirüs varlığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu prensibi ile tespiti için kullanılan kitin prosedürüne uygun olarak aşağıda basamaklar halinde belirtilen şekilde değerlendirmeye alınmıştır (Resim1, 2, 3, 4).



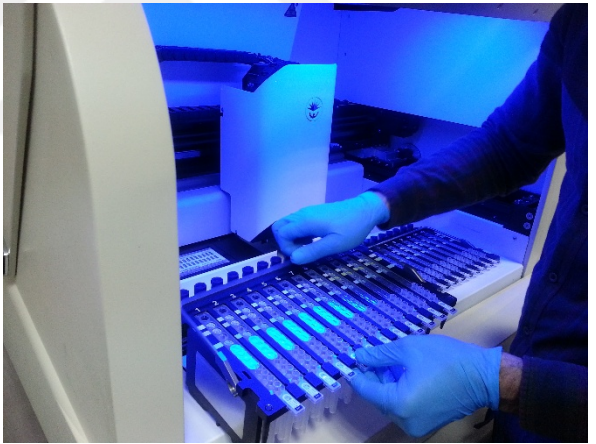
Resim 1: Örnek tampon tüpleri



Resim 2: Rafa yerleştirilmiş birimlere ayrılmış reaksiyon kartuşları ve örnek tampon tüpleri



Resim-3: Barkodların okutulması



Resim-4: BD Max Sistemine yerleştirme

4.3.2.1. Örneğin hazırlanışı

1. Oda sıcaklığından çözülen örnekler 15 sn vortekslendi.
2. 5 µl'lik tek kullanımlık özelerle alınan dışkı örnekleri tampon çözeltiye aktarıldı.
3. Tampon çözeltinin kapağı yerine ayırıcı kapak takıldı.
4. Hazırlanan örnekler topluca çoklu vorteksle 1dk maksimum hızda vortekslendi.
5. Çalışılacak örnek sayısı kadar Birimlere Ayrılmış Reaksiyon Kartuşu BD MAX Sistemine ait raflara yerleştirildi.

6. Ekstraksiyon tüpü (D4), birinci Master Miks (D5) ve ikinci Master Miks (D6) sırasıyla raflar üzerinde beyaz, yeşil ve mavi renklerle işaretlenmiş olan bölümlere denk gelecek şekilde Birimlere Ayrılmış Reaksiyon Kartuşundaki boşluklara yerleştirildi.

7. Hazırlanan her bir örnek tampon tüpünün barkodları BD MAX Sistemine okutularak çalışma listesi oluşturuldu.

8. Hazırlanan raflar BD MAX Sistemine yerleştirilerek çalışma başlatıldı.

4.3.2.2. Çalışma prensibi

BD MAX Sistemi virüsün parçalanması ve DNA/RNA ekstraksiyonu için lizis ve ekstraksiyon reaktiflerini kullanan bir sistemdir. Yükselen ısıda enzimatik viral parçalanmayı takiben açığa çıkan nükleik asitler manyetik afinite boncukları tarafından yakalanır. Nükleik asitlerin bağlanmış olduğu boncuklar yıkanır ve nükleik asitler artan ısıyla ayırma çözeltisi içinde ayrılırlar. Ayrılmış olan DNA/RNA nötralizasyon çözeltisinde nötralize olur ve PCR reaktiflerini rehidrate etmek üzere Master miks tüplerine aktarılır. Oluşturulan amplifikasyon reaktifleri BD MAX PCR Kartuşuna aktarılır. Revers transkriptaz enzimiyle RNA'nın cDNA'ya dönüşümünün ve devam eden PCR işlemlerinin başlamasından önce PCR kartuşundaki mikrokapakçıklar sistem tarafından kapatılarak buharlaşma ve ampikon kontaminasyonu önlenir.

Amplifiye olmuş DNA hedefleri bir ucunda florofofor (floresan verici boya) diğer ucunda susturucu parça ile işaretlenmiş hidrolize edici probalar (TaqMan®) tarafından tespit edilir. Farklı florofoforlar ile işaretlenmiş probalar Norovirüs GI ve GII, Rotavirüs A, Adenovirüs F40/41, Astrovirüs ve Sapovirüs (genogrup I, II, IV ve V) ve her iki master miksteki SPC (sample positive control) ampikonlarının tespiti için kullanılır. Başlangıç durumunda florofoforlar söndürücü parçaya olan yakınlıkları nedeniyle söndürülür. Ancak hedef DNA varlığında probalar tamamlayıcı dizi ile hibridize olur ve kalıp cDNA zinciri boyunca yeni zinciri sentezleyen DNAPolimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile hidrolize olurlar. Sonuç olarak florofoforlar susturucu moleküllerden ayrılır ve floresans tespit edilir. Farklı optik kanallar tarafından tespit edilen floresan miktarı hidrolize olan probun direkt oransal miktarıdır. BD MAX Sistemi her amplifikasyon siklusunda gelen sinyalleri monitörize eder ve sonuç raporunu oluşturmak üzere yorumlar.

4.3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlar BD MAX Sistemi tarafından otomatik olarak hesaplanır. Sistem her bir testin analitik bilgileri ve “ Örnek İşlem Kontrolü” için ayrı ayrı sonuç bildirir. Sonuçlar sonuç

ekranında amplifikasyon durumuna göre her bir virüs için “POS”, “NEG” veya “UNR” şeklinde veya “IND” ya da “INC” şeklinde görülmektedir. “POS” bahsi geçen virüsün varlığını, “NEG” bahsi geçen virüsün olmadığını, UNR ise örnekte inhibitör varlığını veya reaktif başarısızlığını göstermektedir. “IND” veya “INC” şeklinde görülen sonuçlar ise BD MAX Sistemi hatasını göstermektedir. Eğer sonuçlar bahsi geçen virüslerin bir veya birden fazlası UNR diğer virüs veya virüsler için POS şeklinde çıkarsa UNR çıkan virüsler için negatif sonuç verilemez ve bu virüsler için uygun master mikslar kullanılarak testin tekrarlanması gerekir. “IND” veya “INC” şeklinde görülen sonuçlar için de örneklerin tekrar çalışılması uygundur. Tekrarlanacak örnekler için hazırlanmış örnek tampon çözeltisi bir kez daha kullanılabileceği gibi tüm işlemler baştan uygulanarak yeni çözelti de hazırlanabilir. Bu çalışmada tekrar gereken örnekler için yeni örnek tampon çözeltileri hazırlanarak çalışmalar tekrarlanmıştır.

4.3.3. Enzim İmmunoassay (EIA)

Saklanan örnekler oda sıcaklığında çözülerek dışkıda Norovirüs varlığı enzim immunoassay prensibi ile çalışan kitin prosedürüne uygun olarak aşağıda basamaklar halinde belirtilen şekilde değerlendirilmeye alınmıştır.

4.3.3.1. Örneğin hazırlanışı

1. Tüm reaktifler ve kuyucuklar kullanılmadan önce oda sıcaklığına çıkartıldı.
2. Yıkama solüsyonu toplam hacim 10 katına çıkacak şekilde (1 birim yıkama solüsyonuna karşılık 9 birim distile su kullanılarak) distile suyla dilue edildi. Solüsyon içinde kristaller kalması durumunda 37 °C su banyosunda bekletilerek kristallerin çözülmesi sağlandı.
3. Kuyucuklar kullanımlarından kısa süre önce ambalajlarından çıkartıldı.
4. Tüp içerisine Diluent 1’den 1 ml alındı.
5. Sıvı dışkı örneklerinden 100 µl, yarı-katı dışkı örneklerinden 100 mg alınarak Diluent 1’in konulduğu tüpe eklendi, homojenizasyonu sağlama amacıyla pipetleme işlemi birkaç kez tekrarlandı ve oluşan karışımlar vortekslendi.
6. Homojenizasyonu sağlanan süspansiyon en az 10 dk çöktürmeye bırakıldı.
7. Oluşan süpernatant test için kullanıldı.
8. Her bir örnek için hazırlanan süspansiyondan, pozitif kontrolden ve negatif kontrolden (Diluent 1) 100 µl kuyucuklara dağıtıldı.
9. Her kuyucuğa 100 µl Konjugat 1 eklenip plak hafifçe sallanarak karışması sağlandı.
10. Plak 60 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvı döküldü.
12. 300 µl dilue edilmiş yıkama solüsyonu ile toplam 5 kere yıkama yapıldı.

13. Kuyucuklara 100 µl Konjugat 2 eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı.
14. Kuyucuklardaki sıvı dökülerek yıkama işlemi 5 kez tekrar yapıldı.
15. Kuyucuklara 100 µl Substrat eklendi.
16. Karanlık ortamda 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
17. Kuyucuklara 50 µl Stop solüsyonu eklendi.
18. Stop solüsyonu eklendikten sonraki 10 dk içerisinde 450 nm dalga boyuna sahip spektrofotometre ile okuma işlemi yapıldı.

4.3.3.2. Çalışma prensibi

Kullanılan kit Norovirüs GI ve GII genotiplerinin dışkıda tespiti için kullanılan bir katı faz sandviç tip EIA yöntemi ile çalışmaktadır. Kuyucuklar Norovirüs GI ve GII monoklonal antikorları ile kaplıdır. Kuyucuklara dışkı süspansiyonları ve biotinle konjuge edilmiş norovirüs antikorları eş zamanlı eklenip yıkamayla artıklar uzaklaştırılır. Yıkama işlemi sonrası streptovidin peroksidaz konjugatı eklenir. Dışkıda norovirüs antijeninin varlığında kuyucuklarda kaplı olan antikorlarla, dışkıyla birlikte eklenen antikorların arasında antijen sandviç şeklinde kompleks oluşturur ve oluşan bu kompleks streptovidin peroksidaz konjugatı tarafından tanınarak bağlanma gerçekleşir. Bağlanması gerçekleşmeyen streptovidin peroksidaz konjugatları yıkama işlemi sonrası uzaklaştırılır. Eklenen renksiz kromojenik substrat (hidrojen peroksit/TMB) bağlı olan peroksidaz tarafından hidrolize edilir ve kromojen rengi maviye dönüşür. Reaksiyon asit ile durdurulur ve dışkıda norovirüs antijeni varlığında mavi renk sarıya dönüşür. Test sonuçları fotometrik olarak okunup bazal düzeyin üzerindeki anlamlı yoğunluk norovirüs antijeni varlığını gösterir. Test norovirüs suşları arasında ayırım yapmamaktadır.

4.3.3.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Her test işlemi için pozitif ve negatif kontrol kullanılmıştır. Negatif kontrolün 450 nm dalga boyunda okunduğunda 0.200'ün altında ve renksiz olması gerekir. Pozitif kontrolün ise aynı dalga boyunda 0.500'ün üstünde ve sarı olması gerekir.

Sınır değerin (cut-off) hesaplanması: Negatif kontrolün ölçülen absorbans değerine 0.150 eklenerek sınır değeri hesaplanmıştır.

Test sonuçları:

Pozitif sonuç: Hesaplanan sınır değerin %10 üstü pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Negatif sonuç: Hesaplanan sınır değerin %10 altı negatif olarak değerlendirilmiştir.

Belirsiz sonuç: Sınır değerin %10 altı ve %10 üstü arasındaki değerler belirsiz olarak değerlendirilmiştir.

Belirsiz örnekler: Sınır değerin %10 altı ve %10 üstü arasındaki değerler

Belirsiz sonuç alındığında üretici firmanın önerileri doğrultusunda hastadan tekrar yeni örnek alınarak veya çalışılan dışkı örneğinin saklanmış başka bir örneğinin tekrar çalışılarak ikinci çalışılan örneğin sonucunun verilmesi, yine belirsiz olarak sonuçlanması durumunda ise sonucun belirsiz olarak değerlendirilmesi planlanmıştır.

4.3.4. İmmünokromatografi

- 80°C saklanan örnekler oda sıcaklığında çözülerek dışkıda Norovirüs varlığı immünokromatografi prensibi ile çalışan kitin prosedürüne uygun olarak aşağıda basamaklar halinde belirtilen şekilde değerlendirilmeye alınmıştır.

4.3.4.1. Örneğin hazırlanışı

1. Dondurulan dışkı örnekleri tamamen çözünüp oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
2. Reaksiyon tüpüne Reaktif A ve Reaktif B'den eşit olacak şekilde 50şer µl eklendi.
3. Sıvı dışkı örneklerinden 50 µl, yarı katı dışkı örneklerinde 50 mg olacak şekilde reaksiyon tüpüne eklendi.
4. Oluşan süspansiyon homojonize edilmesi amacıyla vortekslendi.
5. Büyük parçacıkların olmadığı süpernatant kısmın oluşması amacıyla 5dk bekletildi ve 2000g de 2 dk santrifüj edildi.
6. 150 µl'lik pipet ile her seferinde pipet ucu değiştirilerek, süpernatant kısım kasetteki reaksiyon kuyucuğuna aktarıldı.
7. Bu işlemten sonra 3 dk içinde kontrol çizgisi oluşması koşuluyla 15 dk sonra testler değerlendirmeye alındı.

4.3.4.2. Çalışma prensibi

Tek aşamalı lateral akış testi biotin ve altınla işaretlenmiş antinorovirüs antikorlarını kullanan bir testtir. Norovirüs antijeninin varlığında altınla işaretlenmiş norovirüs antikorlarıyla immünkompleks oluşur. Bu immünkompleks reaksiyon şeridi boyunca ilerler. "T" harfi ile işaretlenmiş test çizgisinde biotinle de işaretlenmiş olan immünkompleksler streptavidin aracılığıyla yakalanır ve kırmızı-mor bir çizgi oluşturur. İmmünkompleks oluşturmayan altın kaplı antikorlar şerit boyunca ilerleyerek "C" ile işaretli kontrol çizgisinde bağlanma gerçekleştirir. Örneklerin norovirüs antijenini içermediği durumlarda altın kaplı antikorlarla immünkompleks oluşumu gerçekleşmeyecektir. Dolayısıyla test çizgisinde bağlanma olmayıp

sadece kontrol çizgisinde bağlanma gerçekleşecektir. Kontrol çizgisinde kırmızı çizgi oluşumu testin geçerli olduğunun göstergesidir.

4.3.4.3 Sonuçların değerlendirilmesi

Kasetlerde iki adet çizgi oluşum bölgesi mevcuttur, bunlardan biri kontrol çizgisi olup diğeri test sonucunun değerlendirileceği çizgidir. Çizgiler kırmızı-mor renkte oluşmalıdır.

Pozitif sonuç: İki kırmızı-mor renkli çizgi oluşması durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Negatif sonuç: Sadece kontrol çizgisinin oluşması durumunda sonuçlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

Geçersiz sonuç: Kontrol çizgisinin oluşmadığı durumlar geçersiz sonuç olarak kabul edilmiştir.

4.3.5. İstatistiksel Analiz

4.3.5.1. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması

Örneklem büyüklüğü $n=184$ hastadan oluşmaktadır. Örneklem hesaplaması, Çalışmanın Gücü: %80; Güven Aralığı: %95 olacak şekilde $n= t^2pq / d^2$ formülü (p:18 d:8) ile hesaplanmıştır.

4.3.5.2. Verilerin istatistiksel analizi

Tanımlayıcı istatistikler sayımla belirlenen veriler için yüzde oranlarla birlikte sunulmuştur. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında, kategorik veriler için Ki-Kare testi kullanılmıştır. Sürekli verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için %95 Güven Aralığında (GA) 0.05'in altında bulunan p değerleri anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için İstanbul Üniversitesi tarafından lisanslı olan “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) programı, 21.0 sürümü kullanılmıştır.

5. BULGULAR

5.1 HASTALARA AİT DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER

Araştırmaya ishal şikâyetiyle başvuran 184 hasta dâhil edilmiştir. Hastaların 93'ü erkek, 91'i kadındır. Hastaların 74'ü çocuk, 110'u erişkin olup yaş dağılımlarına bakıldığında 38 hastanın 5 yaş altında, 36 hastanın 5-18 yaş arasında, 95 hastanın 19-65 yaş arasında olduğu, 65 yaş üstü hasta sayısının ise 15 olduğu görülmüştür (Tablo 4).

Tablo-4: Çalışmaya dâhil edilen hastaların yaş ve cinsiyet özellikleri.

Hasta sayısı (n)	Yaş				Cinsiyet	
	0-5	6-18	19-65	>65	Erkek	Kadın
184	38	36	95	15	93	91

5.2. DIŞKI ÖRNEKLERİNE AİT ÖZELLİKLER

Örnekler Ocak-Temmuz 2018 tarihleri arasında toplanmış ve bu dışkı örneklerinde laboratuvarımızda yapılan rutin bakteriyolojik kültür sonucunda araştırılan etkenler (selektif yöntemlerle *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* ve rutin yöntemlerle *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Yersinia*) saptanamamıştır. Çalışmaya dâhil edilen hastaların dışkı örneklerinin makroskopik görüntülerine bakıldığında 133 (%72.3) sulu dışkı örneği bulunduğu geriye kalan 51 (%27.7) hastanın dışkılarının kabın şeklini alan yumuşak vasıflı dışkı örneği (yarı katı) olduğu görülmüştür.

5.3. ENZİM İMMÜNOASSAY SONUÇLARI

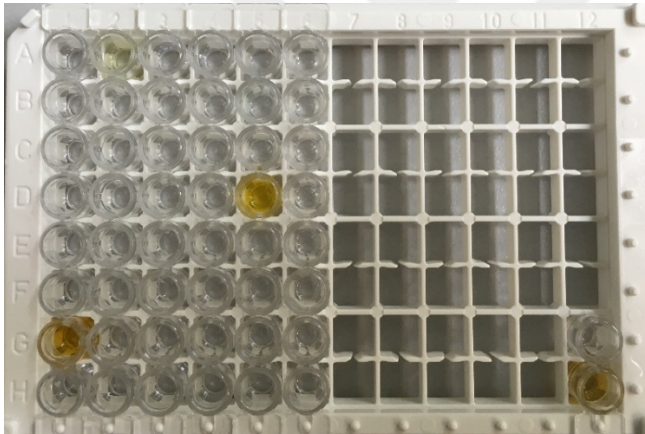
Enzim immünoassay (EIA) yöntemiyle 184 hastadan yedisi norovirüs antijeni açısından pozitif sonuç vermiştir (Resim 5).

Pozitif saptanan hastaların dördünün erkek, üçünün kadın hastalar olduğu görülmüştür. Pozitif saptanan hastalar 0 (10 ay), 3, 5, 8, 12, 37 ve 57 yaşlarındadır. Hastalardan üçü yatan hasta olup, dördü ayaktan başvuru yapmıştır.

Hasta dışkılarının makroskopik özellikleri incelendiğinde dört dışkının sulu, üç dışkının yarı katı oldukları tespit edilmiştir.

EIA yöntemi ile pozitif sonuç vermiş hastaların hepsinde çalışmanın planlanmasının gereği olarak ishal belirtisi görülürken, beşinde kusma, iki hastada karın ağrısı, bir hastada ise ateş görülmüştür. Pozitif bulunan 7 hastanın 6'sı belirtilerin 2-3 gün içinde bir hasta ise 3-4 gün içinde sonlandığını bildirmiştir. Hastalardan dördünde altta yatan bir hastalık belirtilmemiş olup, bir hastada malignite, bir hastada nöbet, bir hastada da epilepsi, hipotonisite tanıları mevcuttur.

EIA yöntemi ile pozitif sonuç alınan yedi hasta kullanılan diğer yöntemlerle (immunokromatografi ve gerçek zamanlı RT-PCR) de norovirüs varlığı açısından pozitif sonuç vermiştir. EIA yöntemine ait duyarlılık ve özgüllük gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi referans kabul edilerek sırasıyla %50 ve %100 olarak hesaplanmıştır.



Resim-5: EIA plağı (pozitif (sarı) ve negatif (renksiz) hasta örnekleri, plağın sağ alt köşesinde pozitif ve negatif kontroller).

5.4. İMMUNOKROMATOĞRAFİ SONUÇLARI

İmmunokromatografik yöntemle 184 hastaya yapılan inceleme sonucunda sekiz hasta norovirüs varlığı açısından pozitif sonuç vermiştir (Resim 6, Resim 7).

Sekiz hastanın dördü erkek dördü kadın olup yaş dağılımlarına hastaların 0 (10 ay), 3, 5, 8, 12, 27, 37 ve 57 yaşlarında olduğu tespit edilmiştir. Sekiz hastanın üçünün yatan hasta oldukları beşinin ise ayaktan başvuru yaptıkları tespit edilmiştir.

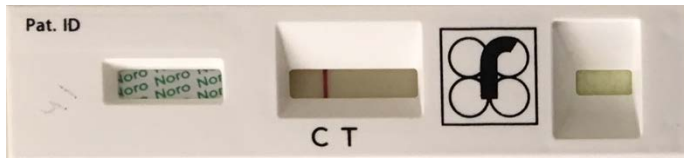
Hasta dışkılarının makroskopik incelemesinde dışkı örneklerinin beşinin sulu, üçünün yarı katı oldukları tespit edilmiştir.

İmmunokromatografik yöntemle norovirüs açısından pozitif saptanan sekiz hastada da yine çalışmanın planlaması gereği ishal belirtisi mevcuttur. Bu hastaların beşinde kusma, üçünde karın ağrısı ve birinde ateş belirtileri görülmüş olup, yedi hastada belirtiler 2-3 gün içerisinde bir hastada ise 3-4 gün içerisinde sonlanmıştır. Hastalardan beşinde altta yatan bir hastalık belirtilmemiştir. Bunun dışında bir hastada malignite, bir hastada nöbet, bir hastada da epilepsi, hipotonisite tanıları mevcuttur.

İmmunokromatografik yöntemle pozitif sonuç veren hastalardan yedisi norovirüs varlığı açısından EIA yöntemi ile pozitif, bir hasta ise negatif olarak sonuçlanmıştır. Gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle ise sekiz hastanın tamamı norovirüs varlığı açısından pozitif bulunmuştur. IKG yöntemine ait duyarlılık ve özgüllük gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi referans kabul edilerek sırasıyla %57 ve %100 olarak hesaplanmıştır.



Resim-6: İmmunokromatografi kaset test ile pozitif saptanan (çift çizgi) örnek.



Resim-7: İmmunokromatografi kaset test ile negatif saptanan (tek çizgi) örnek.

5.5. GERÇEK ZAMANLI RT-PCR SONUÇLARI

PCR ile 184 hastadan 14'ü norovirüs açısından pozitif olarak saptanmıştır (Resim 8, Resim 9). Bu hastalardan yedisi hem immünokromatografi hem de EIA yöntemi ile bir tanesi ise EIA yöntemi ile negatif, immünokromatografi yöntemi ile pozitif olarak bulunmuştur. Geriye kalan altı örnek ise sadece PCR ile pozitif olarak sonuçlanmıştır.

Norovirüs pozitifliği saptanan 14 hastanın yedisi kadın yedisi erkek olup, hastaların 0 (10 ay), 1, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 26, 27, 37, 40, 52 ve 57 yaşlarında oldukları tespit edilmiştir.

Hastalardan dokuzu ayaktan başvuru yapmışken, beş hastanın yatan hasta oldukları tespit edilmiştir.

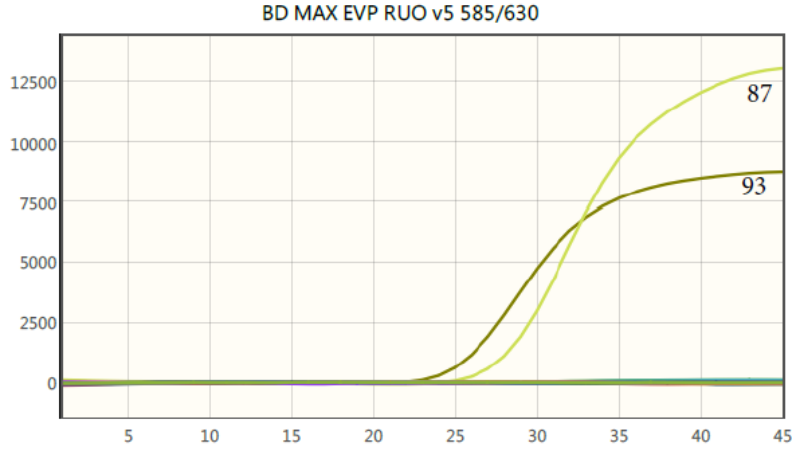
PCR ile pozitif saptanan hastaların dışkı örneklerinin makroskopik özellikleri incelendiğinde sekiz hastanın sulu dışkı örneği verdiği, geriye kalan altı hastanın yarı katı dışkı örneği verdiği tespit edilmiştir.

Pozitif olarak tespit edilen hastaların yine tümünde ishal belirtisi bulunmaktadır; hastaların sekizinde kusma, beşinde karın ağrısı, üçünde ateş belirtileri görülmüştür. Ateş belirtisi görülen hastalardan birinde sepsis tanısı mevcuttur. Hastaların sekizinde belirtiler 4 gün ve daha kısa sürmüş olup (yedi hastada 2-3 gün, bir hastada 3-4 gün), iki hastada yaklaşık birer hafta, bir hastada 1-2 ay, iki hastada ise 5 ay boyunca devam etmiştir. Hastaların beşinde altta yatan hastalık belirtilmemiş olup bu hastalardan biri gebedir. İki hastada ise böbrek transplantasyon öyküsü bulunmakta olup diğer hastalar altta yatan hastalıklar açısından sorgulandığında adrenal yetmezlik, Crohn hastalığı, malignite, nöbet öyküsü, epilepsi/hipotonisite, Parkinson, sepsis gibi tanıların mevcut olduğu görülmüştür.

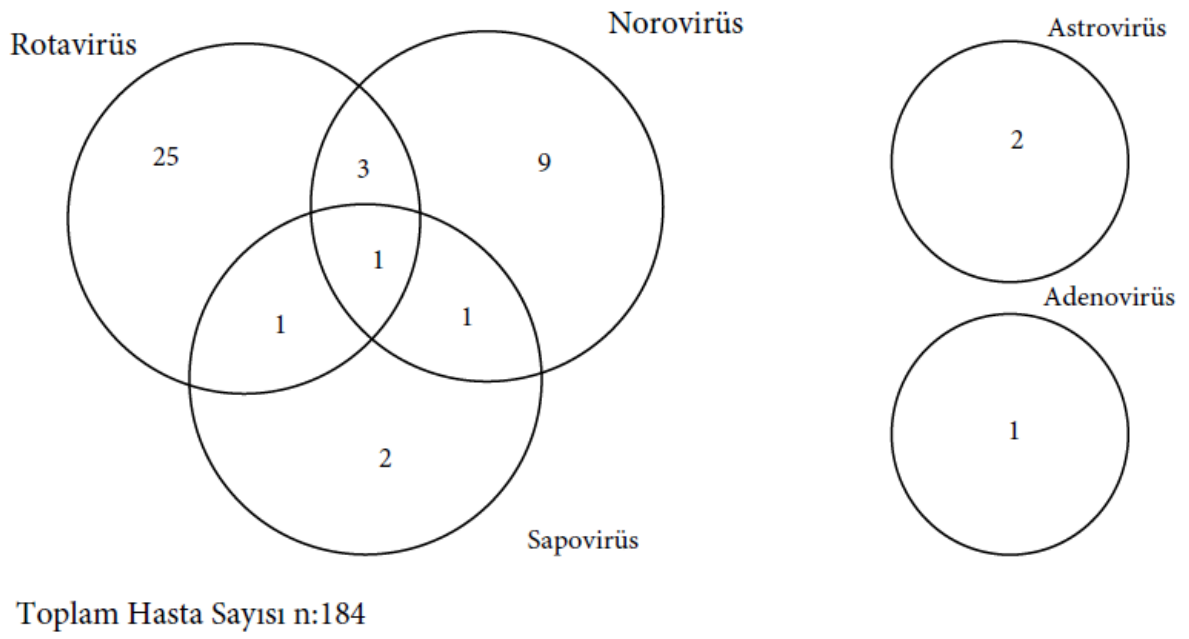
Gerçek zamanlı RT-PCR ile norovirüs saptanan hastaların üçünde eş zamanlı olarak rotavirüs, bir hastada sapovirüs, bir hastada ise hem sapovirüs hem de rotavirüs varlığı tespit edilmiştir. Kullanılan viral PCR panelinde araştırılan ve pozitif olarak tespit edilen diğer virüsler Şekil 1’de gösterilmiş olup iki hastada rotavirüs ve sapovirüs birlikte olmak üzere toplam 30 hastada rotavirüs, beş hastada sapovirüs, iki hastada astrovirüs ve bir hastada adenovirüs tespit edilmiştir.

Position	Test Name	Sample Tube	Patient ID	Result
SP Status		PCR Status	Accession	
Kit Lot			Master Mix Lot	
A11	BD MAX EVP RUO v5	B23725488620180331AE56	--	+ NoV POS - RoV NEG - AdV NEG - SaV NEG - hAstV NEG
Success		Success	87	
--			--	
A8	BD MAX EVP RUO v5	B23725488620180331AE53	--	+ NoV POS - RoV NEG - AdV NEG - SaV NEG - hAstV NEG
Success		Success	93	
--			--	

Resim-8: Gerçek zamanlı múltipleks RT-PCR ile norovirüs saptanan örneklere ait sonuçlar.



Resim 9: Gerçek zamanlı mütipleks RT-PCR ile norovirüs saptanan örneklerle ait eğriler.



Şekil-1: Gerçek zamanlı mütipleks RT-PCR sonuçları.

6. TARTIŞMA

Norovirüs enfeksiyonlarının epidemik gastroenteritlerde bilinen üstünlüğü bir tarafa literatürde sporadik gastroenteritlerde norovirüs prevalansını belirlemek amacıyla yapılmış çok sayıda çalışma ve bu çalışmaların topluca incelendiği sistematik derleme ve meta-analizler bulunmaktadır. Bu sistematik çalışmaların bazılarında hastalığın şiddeti, ülkelerin gelişmişlik durumu gibi farklı parametreler odak noktası olarak kabul edilerek bu gruplarda norovirüs prevalansının belirlenmesi hedeflenmiştir. Norovirüsün global prevalansını belirlemek amaçlı yapılan bir meta-analiz çalışmasında yöntem olarak PCR'ın kullanıldığını bildiren 175 çalışma incelenmiş ve ortalama norovirüs prevalansı %18 olarak bulunmuştur (8). Hastalığın şiddetine göre gruplandırılmış ve yine PCR ile tanı koyulmuş çalışmaların incelendiği bir sistematik derlemede ise orta-hafif şiddetli ishal şeklinde seyreden ve tüm yaş gruplarının dâhil edildiği grupta norovirüs prevalansı %12 olarak bulunmuştur (128). Gelişmekte olan ülkelerdeki gastroenterit vakalarında norovirüs prevalansını belirlemeye yönelik bir çalışmada da bu oran %17 olarak bildirilmiştir (129). Bölgesel düzeyde yapılan incelemelere bakıldığında ülkemize nispeten yakın olan Orta Asya ve Kuzey Afrika bölgesinden yapılan çalışmalarda prevalans %0.82 ile %36.84 ile değişmekle birlikte ortalama %15.3 olarak bildirilmiştir (131), Latin Amerika, Japonya gibi daha uzak bölgelerden bildirilen ortalama prevalans oranları ise sırasıyla %15 ve %20.6'dır (130,132). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise bu oran %8-%25.8 aralığında değişmektedir (181-187). Bununla beraber ülkemizde norovirüs enfeksiyonlarına yönelik çalışmalar sınırlı sayıda olup bu çalışmaların bir kısmında da moleküler bir yöntemin kullanılmadığı görülmektedir (185-187). Ayrıca ülkemizde moleküler yöntemin kullanıldığı çalışmalarda genellikle hasta sayılarının nispeten düşük oldukları görülmüştür (181,183,184). Bu sebeple bu çalışmada öncelikle örneklem sayısı belirlenmiştir. Örneklem sayısı çalışmanın gücü:%80, güven aralığı:%95 olacak şekilde $n = t^2pq / d^2$ formülü (p:18 d:8) ile hesaplanmıştır. Formülde kullanılan p ve d değerleri, bildirilen çalışmalar baz alınarak belirlenmiş ve hasta sayısı n:182 (en az) olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmaya dâhil edilen 184 ishalleri hastada norovirüs varlığı araştırılmış ve moleküler yöntemle yapılan araştırma sonucunda %7.6 pozitiflik tespit edilmiştir.

Görüldüğü üzere bu çalışma da dâhil olmak üzere norovirüs sıklığına dair birbirine çok da uzak olmayan yüzdeler bildirilmiştir. Ancak dâhil edilen hastaların belirtileri, yaşı, örneklerin diğer etkenler açısından incelendikten sonra çalışmaya dâhil edilmesi, kullanılan tanı yöntemi gibi bu oranları etkileyen çok sayıda faktör olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Global prevalansı belirlemeye yönelik yapılan meta-analiz çalışmasında da özellikle üzerinde durulduğu gibi yapılan çalışmalarda kullanılan akut gastroenterit terimi her zaman net olarak tanımlanmamıştır. Kusma ve ishal belirtilerinin bir arada veya tek başına bulunmasının akut gastroenterit olarak kabul edildiği çalışmalar olduğu gibi tek başına kusma belirtisi gösteren vakaların akut gastroenterit tanısı içerisinde yer almadığı ve bir kısım çalışmaya sadece ishalleri hastaların dâhil edildiği belirtilmiştir (8). Aynı durum ülkemizde yapılan çalışmalarda da dikkati çekmektedir. Bazı çalışmalarda sadece ishalleri başvuran hastalar (181-183) bazı çalışmalarda ise akut gastroenterit tanısı aldığı belirtilen hastalarda norovirüs varlığı araştırılmıştır ancak bu çalışmalarda akut gastroenterit tanımlaması yapılmamıştır (185-187). Bizim çalışmamızda da bu karışıklığa neden olunmaması amacıyla ve sadece kusma belirtisi ile seyreden hastalardan örnek alımının güçlüğü nedeniyle akut gastroenterit tanımından kaçınılmış ve ishalleri hastalarda norovirüs varlığı araştırılmıştır. Tanımlama konusundaki bu avantajla birlikte sadece kusmayla seyreden norovirüs enfeksiyonları tespit edilememiştir.

Norovirüs sıklığı ile ilgili üzerinde durulması gereken bir diğer durum seçilen hastaların yaş gruplarıdır. Rockx ve ark. tarafından bildirilmiş prospektif kohort bir çalışmada norovirüsün her yaş grubunda sıklıkla tespit edilebildiği ancak norovirüs ile ilişkili gastroenteritlerin en sık çocuk ve yaşlı hastalarda görüldüğü bildirilmiştir (56). Buna karşın norovirüsün global prevalansına yönelik çalışmada ise yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (8). Bu durum ilk bakışta çelişkili olarak görülse de aslında yapılan çalışmalara dâhil edilen çocukluk yaş grubundaki hastaların sayıca fazla olması veya çalışmaların sadece çocukluk yaş grubu hastalarla sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da bu durum dikkat çekmekte olup çalışmaların genellikle çocukluk yaş grubunda yapıldığı tespit edilmiştir (18.1,2,3,4,6). Muhtemelen çocukluk çağında görülen akut gastroenterit tablolarında hastaneye yatış ve mortalitenin daha yüksek olması bu yaş grubunda etiyolojiyi aydınlatmaya yönelik talebin artışına dolayısıyla çalışılacak örnek sayısına daha kolay ulaşılmasına zemin hazırlamaktadır. Açıklanan nedenlerle bu çalışmada, ülkemizde ve dünyada erişkinlerde norovirüs pozitifliğine dair veriye katkıda bulunmak amacıyla herhangi bir seçime uğramadan tüm yaş gruplarından hasta örnekleri incelemeye alınmıştır. Değerlendirilen 184 hastanın 113'ü (%61.4) erişkin, 71'i (%38.6) çocukluk yaş grubundadır. Norovirüs açısından pozitif ve negatif bulunan hastaların yaşlarının normal dağılım gösterdikleri görülmüş olup norovirüs pozitif saptanma oranları erişkin yaş grubunda %6,2, çocukluk yaş grubunda (0-18) %9.9, beş yaş altında ise %6.7 olarak hesaplanmıştır. Literatürle uyumlu olarak ne beş yaş altı ve üstü hasta grupları (p:0.982), ne de çocukluk yaş grubu ve erişkin hastalar arasında

(p:0.138) norovirüs pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).

Çalışmaya dâhil edilecek örneklerin diğer etkenler açısından araştırıldıktan sonra incelenmesi de prevalansı etkileyen durumlardan biridir. Norovirüs enfeksiyonlarının sıklığı araştırılırken kimi çalışmalarda dışkı örnekleri diğer etkenler açısından araştırıldıktan ve negatif sonuç alındıktan sonra çalışmaya dâhil edilmiştir (128,217). Ülkemizde yapılan çalışmaların bir kısmının planlaması da bu şekilde gerçekleştirilmiştir (181,183,186). Çalışmaların bu şekilde planlanması muhtemelen norovirüsün tespit edilme oranını artırmaktır. Ancak bu durumun norovirüsle gerçekleşen koenfeksiyonların atlanmasına neden olacağı açıktır. Ayrıca akut gastroenteritlerde koenfeksiyon nadir görülen bir durum değildir. Murphy ve ark.'nın film array gastrointestinal panel kullanarak 2257 örneği incelediği bir çalışmada 911 pozitif örneğin %7.8'inde koenfeksiyon varlığı bildirmiş ve bu koenfeksiyonların üçte birinde norovirüs tespit edilmiştir (273). Bizim çalışmamızda da laboratuvarımızda araştırılan rutin bakteriyel kültür incelemelerinde etken saptanmayan örnekler norovirüs varlığı açısından incelenmiştir. Bu durumun asıl nedeni tespit edilen örneklem sayısının belirlenmesinde referans alınan çalışmaların planlanışlarında benzer şekilde bazı diğer etkenler dışlandıktan sonra norovirüs varlığının araştırılmasıdır. Ancak bu durumun bizim çalışmamızda norovirüsün tespit edilme sıklığını büyük oranda değiştirmedeği düşünülmüştür. Çünkü laboratuvarımızda rutin olarak araştırılan etkenlerle gerçekleştiği bildirilen norovirüs koenfeksiyonlarının oranı çok düşüktür (185,273). Yine de bu konuda net yorum yapılabilmek için örneklerin çalışmaya diğer etkenler dışlanmadan dâhil edilmesi yararlı olacaktır. Çalışmamızda kullanılan multipleks RT-PCR kiti belirtildiği gibi norovirüsle beraber rotavirüs, adenovirüs, astrovirüs ve sapovirüs varlığını da araştırmaktadır. Bu durum çalışmamızın avantajlarından biri olup daha önce de bildirilmiş olan viral koenfeksiyonlar konusunda da bilgi sağlamaktadır (274-276). Norovirüs pozitif tespit edilen 14 hastanın 5'inde diğer viral etkenlerle koenfeksiyon varlığı belirlenmiştir. Bu hastaların üçünde norovirüsle beraber rotavirüs, birinde sapovirüs birinde ise hem rotavirüs hem de sapovirüs pozitif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu viral etkenlerin içerisinde norovirüs pozitif hastalarda görülen koenfeksiyonlar dışında sadece bir hastada rotavirüs ve sapovirüs birlikte tespit edilmiştir.

Bu virüslere ait toplam hasta grubundaki (n=184) pozitiflik oranları ise şu şekildedir: rotavirüs %16.30, sapovirüs %2.71, astrovirüs %1.08, adenovirüs %0.71. Araştırılan viral etkenler içerisindeki en büyük pay rotavirüse aittir. Bu durum norovirüsün koenfeksiyonlarda

daha çok rol aldığını akla getirmektedir. Özellikle çocuklarda rotavirüs sıklığına ait çalışmalar çok sayıda olup Patel ve ark. 2013 yılında dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden yayınlanan çok sayıda araştırmayı incelediği çalışmalarında rotavirüs pozitifliğini Asya için %35, Avrupa için %8 olarak bildirmiştir (277). Ülkemizde yürütülen çalışmalarda Tüzüner ve ark. çocuklarda rotavirüs pozitifliğini %14.8 (278), Iraz ve ark. ise %12.2 olarak bildirmiştir (279). Hastanemizden de çocuklarda rotavirüs pozitifliği ile ilgili veriler paylaşılmış olup 2006-2010 yılları arasında bu oran %15.5 olarak bildirilmiştir (280). Bu sonuç ulusal aşı politikasında rotavirüs aşısı bulunmayan ülkemiz için beklenen bir sonuç olup, çalışmamızda saptanan pozitiflik oranının ülkemizden ve hastanemizden bildirilen çalışmalara yakın bir oran olduğu görülmüştür.

Literatür taramasında norovirüs enfeksiyonlarının sıklığının cinsiyetler arasındaki farkına yönelik spesifik bir bulguya rastlanmamıştır. Bununla birlikte Almanya'dan bildirilen bir çalışmada norovirüs enfeksiyonlarının kadınlarda daha sık görüldüğü bildirilmişse de (281) hem dünyada (282,53,93) hem de ülkemizde cinsiyetler arasındaki farkın değerlendirildiği çalışmalarda (184,185,187) genellikle anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada değerlendirilen 184 hastanın 93'ü erkek, 91'i kadın olup, norovirüs pozitif saptanan 14 hastanın 7'si erkek 7'si kadındır. Norovirüs pozitif hastalarda cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p:0.966).

Yapılan çalışmalarda çok sayıda veriye rastlanmayan bir diğer durum da dışkı makroskopileridir. Bu çalışmada bu bulguya ait vurgu yapılması da planlandığından tüm örnekler saklama işlemlerinden önce makroskopik olarak değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen 184 örnekten 133'ünün (%72.2) sulu dışkı, geriye kalan 71 (%28.8) örneğin ise yarı katı dışkı örnekleri olduğu belirlenmiştir. Norovirüs açısından pozitif olan bulunan 14 örnekten ise sekizinin sulu, altısının yarı-katı dışkı örnekleri oldukları tespit edilmiştir. Yarı-katı ve sulu dışkı örnekleri arasında norovirüs pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p:0.188).

Norovirüs pozitifliği saptanan hastalar, hastalığın belirtileri ve belirtilerin devam etme süreleri açısından da araştırılmıştır. Norovirüs enfeksiyonlarının en belirgin belirtileri ishal ve kusmadır (13,6). Bu iki belirti bir arada veya ayrı ayrı görülebilmektedir (55,61). Belirti olarak kusmanın incelendiği bir çalışmada semptomatik norovirüs enfeksiyonlarında hastaların %40-

100'ünde kusmanın görüldüğü bildirilmiştir (61). Bunun yanında ishal belirtisinin erişkinlerde, kusmanın ise çocuklarda daha sık görüldüğü bildiren bir çalışma da mevcuttur. İshal ve kusma dışında daha az sıklıkla olmakla birlikte karın ağrısı, ateş gibi belirti ve bulgular da norovirüs enfeksiyonlarında görülmektedir (19,20,56). Ülkemizde belirtilerin sıklığının incelendiği çalışmalarda norovirüs pozitifliği saptanan akut gastroenterit tanılı çocuklarda ishal belirtisinin hastaların %100'ünde görüldüğü, kusma belirtisinin ise bir çalışmada hastaların %51,2'sinde bir diğer çalışmada da %95.5'inde görüldüğü bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın planlanışı gereği çalışmaya alınan tüm hastalarda ishal belirtisi bulunmaktadır. Dolayısıyla norovirüs pozitifliği saptanan 14 hastanın tümünde ishal görülmekte olup bu hastaların sekizinde (%57.1) kusma, beşinde (%35.7) karın ağrısı belirtileri, ikisinde de ateş bulgusu görülmüştür (Ateş görülen hastalardan birinin sepsis diğerinin ise Crohn hastalığı tanıları mevcuttur). Kusma belirtisinin görüldüğü sekiz hastanın yedisi çocukluk yaş grubunda olup, norovirüs pozitif saptanan sekiz çocuk hastanın ise sadece birinde kusma belirtisi görülmemiştir. Norovirüs pozitifliği saptanan altı erişkin hastanın ise sadece birinde kusma belirtisi görülmüştür. Görülen belirtiler ve sıklıkları açısından çalışmamızda literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Yine literatürde daha önce bildirildiği gibi kusma belirtisi çocuk hastalarda daha sık görülmüşse de bu genellemenin yapılabilmesi için daha büyük hasta gruplarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Norovirüsün tanımlandığı ilk vakadan bu yana bildirilen salgınlarda hastalığın belirtileri genellikle kısa sürede sonlanmıştır (4,7,57,58) . Sağlık kuruluşlarında gerçekleşen norovirüs enfeksiyonlarının klinik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ayaktan hastaların %75'inin tam iyileşme süresinin 3 gün olduğu yatan hastalarda ise bu sürenin 5 gün olduğu bildirilmiştir (7). Norovirüse bağlı kronik enfeksiyon için önemli bir risk faktörü immünsüpresyondur (64). Literatürde bu durum vaka bildirimleri (65,66) ve daha kapsamlı çalışmalarda ortaya konulmuştur (9). Örneğin kronik enfeksiyon açısından risk grubu içinde bulunan renal transplantlı hastalarda norovirüs enfeksiyonların kronikleşme oranı %15,4 olarak bildirilmiştir (9). Ülkemizde yapılan çalışmalarda norovirüs pozitifliği saptanan hastalarda belirtilerin devam etme süresine ait verilere rastlanmamıştır. Bu çalışmada da pozitif bulunan hastaların büyük bölümünde belirtiler kısa sürede sonlanmıştır. Moleküler yöntemle norovirüs pozitif tespit edilen 14 hastanın dokuzunda belirtiler 4 günden kısa sürede sonlanmıştır. İki hastada belirtiler bir hafta boyunca devam etmiş, bir hastada 1-2 ay, kalan 2 hastada ise beşer ay boyunca devam

etmiştir. Belirtileri dört günden uzun süren hastaların altta yatan hastalığına ve belirtilerinin devam etme süresine ait veriler Tablo-5’te verilmiştir.

Tablo-5 Belirtileri dört günden uzun süren hastaların altta yatan hastalıkları ve belirtilerinin devam etme süreleri.

Belirtilerin Devam Etme Süresi	Bilinen Hastalık
7 gün	Konjenital adrenal yetmezlik
7 gün	Sepsis
1-2 ay	Böbrek transplantasyonu
5 ay	Crohn hastalığı
5 ay	Parkinson hastalığı

Belirtileri norovirüs enfeksiyonlarına göre kısmen uzun süren (7 gün) iki hastadan biri sepsis tanısı olan ve yoğun bakımda yatan bir hastadır. Bu hastada belirtilerin gerileme süresi literatürde yatan hastalarda bildirilen süreyle uyumludur. Konjenital adrenal yetmezliği bulunan diğer hastada ise altta yatan hastalık nedeniyle durum klinik açıdan nispeten komplike bir hal almıştır. Muhtemelen adrenal yetmezlik tablosunun halsizlik, karın ağrısı, bulantı, kusma gibi belirtileri (283) ile norovirüs enfeksiyonuna ait belirtiler iç içe geçmiş, hastanın başvuru döneminde rutin olarak araştırılan gastroenterit etkenlerinden bir sonuç elde edilememiş ve bu sebeple ilaç düzeyi artırılarak hastanın kontrole gelmesi planlanmıştır. Belirtilerin kronik enfeksiyonla uyumlu süre boyunca devam ettiği hastalardan biri böbrek transplantasyonu yapılan bir hastadır (Norovirüs saptanan hastaların içinde böbrek transplantasyonu yapılmış iki hasta olup diğer hastanın belirtileri 2-3 gün içinde sonlanmıştır). Belirtildiği gibi böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda kronik norovirüs enfeksiyonu gelişimi literatürde de dikkat çekilmiş bir durumdur. Bunların dışında 5 ay kadar uzun süre boyunca belirtilerin gerilemediğini belirten iki hasta mevcut olup bu hastalardan birinin Crohn hastalığı olduğu belirlenmiştir. Literatürde Crohn hastalığı ve norovirüs enfeksiyonları ile ilgili çalışmalar genellikle norovirüs enfeksiyonlarının Crohn hastalığının alevlenmesi üzerine etkileriyle ilişkilidir (284). Bu hastadan alınan bilgiler doğrultusunda böyle bir durumun varlığından bahsetmek mümkün değildir. Ancak bilindiği gibi Crohn hastalığının tedavisinde kullanılan neredeyse tüm ilaçlar immünsüpresyona neden olan ve bu hastalarda enfeksiyon riskini artıran ilaçlardır (285). Bu nedenle kronik enfeksiyon için bir risk faktörü olan immünsüpresyonun Crohn hastaları için de geçerli olduğunun göz önünde bulundurulması ve bu hastaların kronik enfeksiyona yatkınlık açısından değerlendirmeye alınmasının önemli olabileceği düşünülmüştür. Son olarak belirtileri

5 ay boyunca devam eden bir diğer hastada Parkinson hastalığı tanısı mevcuttur. Literatür taramasında norovirüs ve Parkinson hastalığı ile ilgili doğrudan bir ilişkiye rastlanmamıştır ancak Parkinson hastalığında enterik sinir hücrelerinde biriktiği bildirilen alfa-sinükleinin norovirüs enfeksiyonlarında da eksprese edildiği ve bu proteinin barsak inflamasyonu ve immünitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (292,287).

Uzun yıllar hücre kültüründe üretilemediği bilinen norovirüsün tanısında günümüzde kabul edilen altın standart tanı yöntemi revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)'dur (13). Yapılan çalışmalarda bu yöntemin rutin tanıda kullanılabileceği bildirilmiştir (216). Bu prensiple çalışan ticari kitler de günümüzde kullanıma girmiştir (13). Ticari kitler kendi içlerinde ve referans yöntemlerle karşılaştırılarak duyarlılık, özgüllük ve uyumları araştırılmış %90'ın üzerinde duyarlılık, özgüllük ve uyum bildirilmiştir (217,218,288).

Bu çalışmada da ticari bir gerçek zamanlı mütipleks RT-PCR kiti kullanılmıştır. Norovirüs tanısında moleküler yöntemler dışında daha hızlı ve kolay uygulanabilir olan antijen tespiti prensibine dayalı enzim immunoassay ve immunokromatografik yöntemler gibi tanı yöntemleri mevcuttur. Ancak her iki tanı yönteminin de başlıca sorunu özellikle sporadik vakalardaki duyarlılık sorunudur (13). Literatürde, bu çalışmada da kullanılmış olan RIDAQuick norovirus immunokromatografi (IKG), salgınlarda kullanımı FDA tarafından onaylanmış Ridascree® Norovirus 3rd Generation enzim immunoassay (EIA) ve diğer ticari kitlerin değerlendirilmesine yönelik çok sayıda duyarlılık ve özgüllük çalışması bulunmaktadır.

Avrupa'da iki farklı ticari EIA kitinin değerlendirildiği ve 2,254 dışkı örneğinin dâhil edildiği çok merkezli bir çalışmada her iki kit için de yakın duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmiş olup kitlere ait duyarlılık oranları %43.8 ve %58.9, özgüllük oranları ise %93.9 ve %96.3 olarak tespit edilmiştir (196). EIA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün salgınlarda tek örnek alınarak araştırıldığı bir çalışmada %47 özgüllüğünün ise %71 olduğu bildirilmiştir (289). Bizim çalışmamızda olduğu gibi yöntemin sporadik vakalarda da duyarlılık ve özgüllüğü araştırılmış olup Wilhelmi de Cal ve ark.'nın yaptığı çalışmada yöntemine ait duyarlılık %59, özgüllüğü %73.1 (290), Morillo ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise duyarlılık %49.5 özgüllük ise %93.5 olarak hesaplanmıştır (291). Benzer çalışmalarda nispeten %40 (292) gibi daha düşük kimi zaman da %80 (293) gibi daha yüksek duyarlılık ve %97'nin üzerinde özgüllük oranları (292,293) da bildirilmiştir. Türkiye'den EIA ve referans olarak moleküler yöntemin kabul edildiği karşılaştırmalı bir çalışmada da EIA yöntemine ait duyarlılık %60 özgüllük %98 olarak bulunmuştur (184).

Literatürde yine antijen tespiti prensibi ile çalışan bir diğer yöntem olan immunokromatografik yöntemle yönelik birçok duyarlılık ve özgüllük çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda referans yöntem olarak RT-PCR kullanılmış olup 771 örnekle yapılan çok merkezli bir çalışmada yöntemin duyarlılığı %72.8 özgüllüğü ise %99.5 olarak bildirilmiştir (294). Farklı ticari kitlerin duyarlılık ve özgüllüklerini belirlemeye yönelik çalışmalar da yapılmış olup Vyas ve ark. tarafından beş farklı ticari kitin değerlendirildiği çalışmada en yüksek duyarlılık (%59) ve özgüllük oranı (%100) RIDAQuick immunokromatografik kit için bildirilmiştir (295). Benzer şekilde Ambert-Balay ve ark. tarafından IKG yöntemini kullanan RIDAQUICK, ImmunoCardSTAT!, NOROTOP, SD BIOLINE ticari kitleri değerlendirilmiş ve kitlere ait duyarlılıklar sırasıyla 52%, 35%, 51% 41%, dört kite ait özgüllük ise %100 olarak bildirilmiştir (198). Battaglioli ve ark.'nın yaptığı çalışmada da IKG yöntemi için yakın duyarlılık (%61,4) ve özgüllük (%100) oranları bildirilmiş (296), Bruggink ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise %87 gibi kısmen daha yüksek duyarlılık ve diğer çalışmalara yakın olarak %97 özgüllük bildirilmiştir (297). Ülkemizde yapılan çalışmalarda immunokromatografik yöntemle prevalans belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmış ancak duyarlılık ve özgüllük hesaplamasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ülkemiz dışında yapılan ve bizim çalışmamızla çok benzer şekilde aynı çalışmada EIA, IKG ve referans metot olarak RT-PCR'ın kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (298-300). IKG testinin ticari olarak satışa çıktığı yıl Derrington ve ark. RIDAQuick IKG, Ridascreen III Norovirus, IDEIA II Norovirus EIA kitlerine ait duyarlılıkları sırasıyla %82, %76.6 ve %66.6 özgüllükleri ise %100, %97,5 ve %95 olarak bildirilmiştir (298). Ancak bu çalışmada IKG yöntemi 159 örnekte, EIA kitleri ise 100'er örnekte test edilmiş ve çalışmaya dâhil edilen örneklerin her iki yöntemle incelenip incelenmediğine ait bir veri sunulmamıştır. Kirby ve ark. ise 96 dışkı örneğini Ridascreen EIA, IDEIA EIA, RIDAQuick IKG ve RT-PCR yöntemleri ile incelemiş, Ridascreen EIA için %63, IDEIA EIA için %45, IKG yöntem için EIA yöntemine göre nispeten yüksek olmak üzere %69 duyarlılık oranları bildirmişlerdir (299). Son olarak Geginat ve ark. yaptığı çalışmada 410 dışkı örneği incelenmiş EIA ve IKG yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %77 ve %69, özgüllükleri ise %96 ve %97 olarak bildirilmiştir (300).

Sonuç olarak görülmektedir ki EIA ve immunokromatografik yöntemleri özgüllükleri yüksek ancak duyarlılıkları özellikle sporadik vakalarda daha belirgin olmak üzere sınırlı olan yöntemlerdir. Bu çalışmada da RT-PCR referans yöntem kabul edilerek EIA ve IKG kitlerinin duyarlılıkları sırasıyla %50 ve %57, her iki kitin özgüllükleri ise %100 olarak hesaplanmıştır.

Bulunan bu oranların literatürle uyumlu oldukları, negatif olarak bulunan sonuçların moleküler yöntemle doğrulanması gerektiği ancak pozitif bulunan sonuçların güvenilir oldukları düşünülmüştür.

Bunun yanında üzerinde durulması gereken bir konuda kitlerin uyumudur. EIA ile pozitif sonuç veren tüm hastalar IKG ile de pozitif sonuç vermiş olup EIA ile negatif sonuçlanan örneklerden sadece biri IKG ile pozitif sonuç vermiştir. Yapılan çalışmalarda bu konuyla ilgili veriler ayrıntılı olarak paylaşılmamış olsa da antijen tespiti prensibine dayalı iki yöntemin bu denli uyum göstermesi mantıksal açıdan yüksek olasıdır. Ancak buradan yola çıkılarak bu iki yöntemden herhangi birinin diğer testi doğrulama amaçlı kullanımının yararlı olmayacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmanın avantajlarından biri norovirüs pozitif saptanan hastalara ait ayrıntılı bilgi toplama şansının olmasıdır. EIA ve IKG yöntemlerine ait sonuçların hastaların cinsiyet, yaş, belirti ve başvuru şekillerine göre incelenmesine ait veriler Tablo-6’da verilmiştir. Pozitif hasta sayısı yüksek olmamakla birlikte hastalara ait söz konusu özellikler açısından EIA pozitif-RT-PCR pozitif, EIA negatif-RT-PCR pozitif, IKG pozitif- RT-PCR pozitif, IKG negatif-RT-PCR pozitif ve RT-PCR ile pozitif saptanan toplam hasta grubu arasında dikkati çeken belirgin bir fark yoktur.

Tablo-6:Moleküler yöntemle pozitif saptana hastaların diğer yöntemler ve bazı özellikler açısından incelenmesi.

Yöntem (n)	RT-PCR Pozitif	Cinsiyet		Yaş Grubu		Kusma		Karın Ağrısı		Başvuru Şekli	
		Erkek	Kadın	Çocuk	Erişkin	Var	Yok	Var	Yok	Yatan	Ayaktan
EIA Pozitif	7	4	3	5	2	4	3	2	5	3	4
EIA Negatif	7	3	4	3	4	3	4	3	4	2	5
IKG pozitif	8	4	4	5	3	4	4	3	5	3	5
IKG Negatif	6	3	3	3	3	3	3	2	4	2	4
Toplam	14	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Ancak bu çalışmada elde edilen en dikkat çekici verilerden biri tanı yöntemlerinin belirtilerin devam etme süreleriyle olan ilişkisi olmuştur. EIA ve IKG yöntemleriyle norovirüs varlığı açısından pozitif olarak tespit edilen hastaların tamamında belirtilerin iyileşme süresi 4 günden kısadır. EIA ve IKG yöntemlerinden herhangi biri ile tespit edilemeyen ancak RT-PCR ile pozitif sonuç alınan altı hastadan sadece birinin belirtilerinin 2-3 gün içerisinde sonlandığı geriye kalan beş hastanın belirtilerinin gerileme sürelerinin 1 hafta-5 ay arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu durumun daha önce de bildirildiği gibi viral yükün azalması durumunda antijen tespitine dayalı yöntemlerin duyarlılıklarının düşmesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (41,301-304). Her ne kadar bu hastalardan alınan bilgilerden belirtilerin başlama ve örnek verme arasında geçen süreye dair kesin bilgiler öğrenilememişse de (iki hastanın semptomların başlangıcından en az 1 hafta sonra başvuruda bulundukları belirlenmiştir) neredeyse tüm hastalarda uzun süren enfeksiyon belirtilerinin olması dikkat çekicidir. Genellikle kısa süreli ve hafif seyreden norovirüs enfeksiyonlarına ait belirtiler altta yatan faktörlerin varlığında uzun süreli olabilmektedir. Kolay uygulanabilir ve ucuz yöntemler olan EIA ve IKG yöntemlerinin bu hastalarda tanı koymada yeterli olmayışı moleküler yöntemlere olan ihtiyacı bir kez daha göstermektedir. Ancak belirtildiği gibi azalan viral yükün bu duruma neden olabileceği göz önünde bulundurularak semptomların başlangıcından kısa süre sonra örneklerin incelemeye gönderilmesi bu olasılığı azaltmada yardımcı olacaktır. Ayrıca yine belirtileri kısa süre içinde sonlanan bir hastada da antijen tespiti prensibine dayalı yöntemler tanı koymakta yetersiz kalmıştır. Bu sebeple belirtileri kısa süren hastalarda da bu yöntemlerin yeterliliği konusunda kuşku oluşmuştur.

Antijen tespitine dayalı yöntemlerin duyarlılıklarının düşük olmasının bir diğer nedeninin de kullanılan antikorların genotiplere olan farklı afinitesi olduğu düşünülmektedir (13). Bu yöntemlerin hem genogruplar (198,296,291) hem de genotipler (303, 305) açısından farklı duyarlılık özelliklerine sahip oldukları ortaya konmuştur. Olasılıkla GI prevelansının düşük olmasından kaynaklansa da bu yöntemlerin GI ile olan enfeksiyonlarda GII'ye göre daha düşük duyarlılık oranları gösterdikleri bildirilmiştir (198). Çalışmamızda da referans yöntem olarak kabul edilen gerçek zamanlı RT-PCR kiti GI ve GII'yi saptamakta ancak genogruplar ve genotipler arasında ayırım yapamamaktadır. Ülkemizde norovirüsün filogenetik analizinin yapıldığı tek bir çalışmaya rastlanmış ve bu çalışmada GII baskın olarak tespit edilmiştir (182). Bu durum genogruplar arasındaki farkın çalışmamızda kullanılan EIA ve IKG kitlerinin duyarlılıklarını çok fazla etkilemeyeceğini akla getirmektedir. Bununla beraber çalışmamızda gerçek zamanlı RT-PCR ile pozitif tespit edilip diğer iki yöntemle negatif olarak tespit edilen

norovirüs enfeksiyonlarının GI veya GII içerisinde tespit şansı daha düşük genotiplerden kaynaklı olma olasılıkları da mevcuttur. Ancak kullanılan gerçek zamanlı RT-PCR kitinin özellikleri dolayısıyla bu çalışma ile bahsedilen duruma dair bilgi vermek mümkün değildir.

Her ne kadar üretici firmanın kullanım talimatında yer almış olsa da saklanıp çözülerek çalışılan örneklerde antijen tespitine dayalı yöntemlerin duyarlılıklarının düştüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır (306). Ancak bu durumun aksini bildirilen çalışmalar da mevcut olup (301) bizim çalışmamızın planlanışı gereği taze ve dondurulmuş dışkı örneklerinin herhangi bir yöntemle karşılaştırmalı değerlendirmesi yapılmamıştır. Bu durumun da antijen tespitine dayalı yöntemlerin duyarlılıklarını etkileyebileceği de göz ardı edilmemelidir.

Son olarak çalışmaya dâhil edilen örneklerin salgın veya sporadik vakalardan alınmış olması veya çalışmaya dâhil edilen hasta grubuna ait özelliklerin (çocuk-erişkin gibi) bu yöntemlere ait duyarlılıkları etkileyebileceği bildirilmişse de bizim çalışmamızın gerek planlanışı gerekse elde edilen sonuçları açısından bu durumların bu çalışmadaki duyarlılık oranları için etkileyici oldukları düşünülmemiştir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın iki ana amacı olup ilki ishaller hastalarda norovirüs sıklığının tespit edilmesidir. Çalışma sonucunda moleküler yöntemle hastaların %7.6'sında norovirüs varlığı gösterilmiştir. Salgınlardaki önemi iyi tanımlanmış olan norovirüsün, sporadik vakalarda da azımsanmayacak bir oranda etken olabileceği görülmektedir. Bunun yanında erişkin veya çocukluk yaş gruplarında, cinsiyetler arasında ve hasta dışkımasının sulu veya yarı katı olması arasında norovirüs pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Norovirüs açısından pozitiflik saptanan hastalarda kusmanın sık bir belirti olduğu görülmüştür. Tüm bu veriler ülkemizde norovirüs epidemiyolojisine katkı sağlayacak laboratuvar ve klinik değerlendirmelerde de yol gösterici olacaktır.

Çalışmanın ikinci amacı ise norovirüs tanısında ucuz ve kolay uygulanabilir olan enzim immunoassay ve immunokromatografi yöntemlerinin sporadik vakalarda duyarlılıklarını ve özgüllüklerini belirlemektir. Elde edilen sonuçlardan bu iki yöntemin yüksek özgüllüğe (%100) sahip oldukları ancak EIA için %50, IKG için %57 olmak üzere duyarlılıklarının sınırlı oldukları tespit edilmiştir.

Bununla birlikte norovirüs pozitifliği saptanan hastaların bilgileri ayrıntılı olarak incelendiğinde belirtileri kısa süren hastalarda bu iki yöntemin norovirüs tespit etme şansları artmakta, tam aksine belirtilerin uzun sürdüğü hastalarda azalmaktadır. Moleküler testleri uygulama şansı olmayan laboratuvarların bu yöntemleri kullanmaları durumunda alınan sonucun değerlendirilmesi aşamasında hastaya ait verilerin göz önünde bulundurulmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Hastalara ait ayrıntılı bilgi toplama şansı bu çalışmanın avantajlarından olmuştur. Genellikle hafif seyirli ve kısa süreli seyreden norovirüs enfeksiyonlarının yanında özellikle immünsüpre hastalar olmak üzere bazı hasta gruplarında uzun süreli enfeksiyonlar tanımlanmıştır. Bu durum çalışmamızda da mevcut olup bu hasta grubunda antijen tespitine dayalı yöntemlerin yetersizliği ve moleküler yöntemle olan ihtiyaç açıkça görülmüştür.

Çalışmanın örneklem büyüklüğü istatistiksel olarak hesaplanmış olup ülkemizde yapılan çalışmalarla kıyaslandığında en yüksek hasta sayısına ait çalışmalardan biridir ancak yine de norovirüs açısından pozitif olan hasta sayısının azlığı bu hastalar arasında istatistiksel veri sunmayı kısıtlı hale getirmiştir. Bu nedenle ülkemizde daha çok sayıda pozitif hasta sayısının

elde edilebileceği farklı bölge, hasta ve yaş gruplarının dâhil edildiği geniş kapsamlı ve çok merkezli moleküler çalışmaların planlanması önem taşımaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma ülkemizde konuyla ilgili az sayıda veriye katkı sağlamış, norovirüse yönelik tanı yöntemlerinin seçimi için de yol gösterici olmuştur.



8. KAYNAKLAR

1. Global Health Estimates 2016 Summary Tables: Global Deaths By Cause, Age And Sex, 2000-2016 April 2018 World Health Organization Geneva, Switzerland http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/ (erişim tarihi:01.02.2019)
2. LaRocque RC, Calderwood SB. Syndromes of Enteric Infection, In: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious diseases, 8th ed. Elsevier, Philadelphia; 2015.p.238-9.
3. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. N Engl J Med 2009;361(18):1776-85
4. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 1972;10:1075-81.
5. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. Virology 1993;195(1):51-61.
6. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. J Clin Virol 2009;44(1):1-8.
7. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. Clin Infect Dis 2004;39(3):318-24.
8. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2014 ;14(8):725-30.
9. Swartling L, Ljungman P, Remberger M, Sundin M, Tiveljung A, Mattsson J, et al. Norovirus causing severe gastrointestinal disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective analysis. Transpl Infect Dis 2018;20(2):e12847.
10. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. PLoS Med. 2015;12(12):e1001921.
11. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. Science 2016;353(6306):1387-93.
12. Mattison CP, Cardemil CV, Hall AJ. Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions. Expert Rev Vaccines 2018;17(9):773-784
13. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. Clin Microbiol Rev 2015;28(1):134-64.
14. Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. Epidemiol Infect 2012;140(7):1161-72.
15. Greenberg HB, Valdesuso J, Yolken RH, Gangarosa E, Gary W, Wyatt RG, et al. Role of Norwalk virus in outbreaks of nonbacterial gastroenteritis. J Infect Dis;139(5):564-8.

16. Kumthip K, Khamrin P, Maneekarn N. Molecular epidemiology and genotype distributions of noroviruses and sapoviruses in Thailand 2000-2016: A review. *J Med Virol* 2018;90(4):617-24
17. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35(2):275-90, viii.
18. Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Uygulama Tebliği (SUT) Ek-2/B
19. Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969;119(6):668-73.
20. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, et al. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971;123(3):307-12.
21. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 1):79-87.
22. Papafragkou E1, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinjé J. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models. *PLoS One* 2013;8(6):e63485.
23. Takanashi S, Saif LJ, Hughes JH, Meulia T, Jung K, Scheuer KA, et al. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Arch Virol* 2013;159(2):257-66.
24. Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ, et al. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981;37(3):994-9.
25. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*. 1990;250(4987):1580-3.
26. Matsui SM, Kim JP, Greenberg HB, Su W, Sun Q, Johnson PC, et al. The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA. *J Clin Invest*. 1991;87(4):1456-61
27. Lefkowitz EJ. Taxonomy and Classification of Viruses. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology* 11th ed. Washington DC: ASM Press; 2015.p.1400
28. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (Erişim tarihi:01.02.2019)
29. Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* 2014;95(Pt 2):278-91.
30. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015;53(2):373-81.
31. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparç-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000;74(14):6581-91.
32. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis*. 1974;129(6):709-14
33. Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982;146(2):184-9.
34. Green SM, Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol* 1994;75 (Pt 8):1883-8.

35. Lew JF, Kapikian AZ, Valdesuso J, Green KY. Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J Infect Dis* 1994;170(3):535-42.
36. Widdowson MA1, Rockx B, Schepp R, van der Poel WH, Vinje J, van Duynhoven YT, et al. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol* 2005;76(1):119-28.
37. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J* 2016;10(3):609-20
38. Green J, Vinje J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DW, et al. Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* 2000;20(3):227-36. Erratum in: *Virus Genes* 2001;23(2):241.
39. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S336-48.
40. Vinjé J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DW, Koopmans MP. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol* 2000;145(2):223-41.
41. Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG, et al. Failure to detect norovirus in a large group of asymptomatic individuals. *Public Health* 2004;118(3):230-3.
42. Kaarme J, Hickman RA, Nevés T, Blomberg J, Öhrmalm C. Reassuringly low carriage of enteropathogens among healthy Swedish children in day care centres. *Public Health* 2016;140:221-7.
43. Mans J, Armah GE, Steele AD, Taylor MB. Norovirus Epidemiology in Africa: A Review. *PLoS One* 2016;11(4):e0146280.
44. García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JJ, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):2997-3000.
45. Marques Mendanha de Oliveira D, Souza M, Souza Fiaccadori F, César Pereira Santos H, das Dôres de Paula Cardoso D. Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol* 2014;86(9):1569-75.
46. Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LG, Boreux R, Thiry E, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol* 2013;58(3):515-21
47. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol Infect* 2010;138(10):1454-8.
48. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994;170(1):34-43.
49. Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2271-4.
50. Miura F, Matsuyama R, Nishiura H. Estimating the Asymptomatic Ratio of Norovirus Infection During Foodborne Outbreaks With Laboratory Testing in Japan. *J Epidemiol* 20185;28(9):382-7.

51. Frange P, Touzot F, Debré M, Héritier S, Leruez-Ville M, Cros G, et al. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis* 2012;206(8):1269-74.
52. Loury P, Le Guyader FS, Le Saux JC, Ambert-Balay K, Parrot P, Hubert B. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. *Epidemiol Infect* 2015;143(12):2486-93
53. Götz H, Ekdahl K, Lindbäck J, de Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden. *Clin Infect Dis* 2001;33(5):622-8.
54. Lee RM, Lessler J, Lee RA, Rudolph KE, Reich NG, Perl TM, et al. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2013;13:446.
55. Devasia T, Lopman B, Leon J, Handel A. Association of host, agent and environment characteristics and the duration of incubation and symptomatic periods of norovirus gastroenteritis. *Epidemiol Infect.* 2015;143(11):2308-14.
56. Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002;35(3):246-53.
57. Kilgore PE, Belay ED, Hamlin DM, Noel JS, Humphrey CD, Gary HE Jr, et al. A university outbreak of gastroenteritis due to a small round-structured virus. Application of molecular diagnostics to identify the etiologic agent and patterns of transmission. *J Infect Dis* 1996;173(4):787-93.
58. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norwalk-like virus outbreaks at two summer camps--Wisconsin, June 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50(30):642-3.
59. Love SS, Jiang X, Barrett E, Farkas T, Kelly S. A large hotel outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis among three groups of guests and hotel employees in Virginia. *Epidemiol Infect* 2002;129(1):127-32.
60. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel--Afghanistan, May 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51(22):477-9.
61. Kirby AE, Streby A, Moe CL. Vomiting as a Symptom and Transmission Risk in Norovirus Illness: Evidence from Human Challenge Studies *PLoS One* 2016;11(4):e0143759
62. Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, et al. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011;117(22):5850-6.
63. Pawa N, Vanezis AP, Tutton MG. Spontaneous bowel perforation due to norovirus: a case report. *Cases J* 2009;2:9101
64. Petrignani M, Verhoef L, de Graaf M, Richardus JH, Koopmans M. Chronic sequelae and severe complications of norovirus infection: A systematic review of literature. *J Clin Virol* 2018;105:1-10.
65. Lambregts MM, Alleman MA, Ruys GJ, Groeneveld PH. Chronic norovirus infection in an immunocompromised patient. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010;154:A1067

66. Capizzi T1, Makari-Judson G, Steingart R, Mertens WC. Chronic diarrhea associated with persistent norovirus excretion in patients with chronic lymphocytic leukemia: report of two cases. *BMC Infect Dis*. 2011;11:131.
67. Sacco KA, Pongdee T, Binnicker MJ, Espy M, Pardi D, Khanna S, et al. Presence of immune deficiency increases the risk of hospitalization in patients with norovirus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90(4):300-306.
68. Burke RM, Shih SM, Yen C, Huang YC, Parashar UD, Lopman BA, et al. Burden of Severe Norovirus Disease in Taiwan, 2003-2013. *Clin Infect Dis* 2018;67(9):1373-1378.
69. Lindsay L, Wolter J, De Coster I, Van Damme P, Verstraeten T. A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2015;15:425.
70. Trivedi TK, Desai R, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: a systematic literature review. *Am J Infect Control* 2013;41(7):654-7.
71. Roddie C1, Paul JP, Benjamin R, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis* 2009;49(7):1061-8.
72. Harris JP1, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, Lopman BA. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg Infect Dis* 2008;14(10):1546-52.
73. Teunis PF1, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 2008;80(8):1468-76
74. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008;14(10):1553-7.
75. Karst SM, Tibbetts SA. Recent advances in understanding norovirus pathogenesis. *J Med Virol* 2016;88(11):1837-43.
76. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002;185(9):1335-7.
77. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol* 2003;77(1):405-15.
78. Heggelund JE, Varrot A, Imberty A, Krenzel U Histo-blood group antigens as mediators of infections.. *Curr Opin Struct Biol* 2017;44:190-200.
79. Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals *Gastroenterology* 2002 ;122(7):1967-77.
80. Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoën-Clouet N, Morrow AL, et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* 2003;188(1):19-31.
81. Almand EA, Moore MD, Jaykus LA. Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens. *Front Microbiol* 2017;8:2549.

82. Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, Doyle N, Roberts LO. Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J Gen Virol* 2010;91(Pt 6):1428-38.
83. Perry JW, Wobus CE. Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J Virol*. 2010;84(12):6163-76
84. Karst SM. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(4):197-204.
85. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 2014;346(6210):755-9.
86. Baldridge MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, et al. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science* 2015;347(6219):266-9.
87. Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet* 2018;392(10142):175-186
88. Levy AG, Widerlite L, Schwartz CJ, Dolin R, Blacklow NR, Gardner JD, et al. Jejunal adenylate cyclase activity in human subjects during viral gastroenteritis. *Gastroenterology* 1976;70(3):321-5.
89. Newman KL, Moe CL, Kirby AE, Flanders WD, Parkos CA, Leon JS. Norovirus in symptomatic and asymptomatic individuals: cytokines and viral shedding. *Clin Exp Immunol*. 2016;184(3):347-57.
90. Talal AH, Moe CL, Lima AA, Weigle KA, Barrett L, Bangdiwala SI, et al. Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. *J Med Virol* 2000;61(1):117-24
91. Lew JF, Valdesuso J, Vesikari T, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, et al. Detection of Norwalk virus or Norwalk-like virus infections in Finnish infants and young children. *J Infect Dis* 1994;169(6):1364-7.
92. Taylor MB1, Parker S, Grabow WO, Cubitt WD. An epidemiological investigation of Norwalk virus infection in South Africa. *Epidemiol Infect* 1996;116(2):203-6.
93. Pujol FH, Vásquez G, Rojas AM, Fuenmayor ME, Loureiro CL, Pérez-Schael I, et al. Norwalk virus infection in Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92(2):205-11
94. Dimitrov DH, Dashti SA, Ball JM, Bishbishi E, Alsaeid K, Jiang X, et al. Prevalence of antibodies to human caliciviruses (HuCVs) in Kuwait established by ELISA using baculovirus-expressed capsid antigens representing two genogroups of HuCVs. *J Med Virol* 1997;51(2):115-8.
95. Gray JJ, Jiang X, Morgan-Capner P, Desselberger U, Estes MK. Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J Clin Microbiol* 1993;31(4):1022-5
96. Jing Y, Qian Y, Huo Y, Wang LP, Jiang X. Seroprevalence against Norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China. *J Med Virol* 2000;60(1):97-101
97. Cukor G, Blacklow NR, Echeverria P, Bedigian MK, Puruggan H, Basaca-Sevilla V. Comparative study of the acquisition of antibody to Norwalk virus in pediatric populations. *Infect Immun* 1980;29(2):822-3

98. Greenberg HB, Valdesuso J, Kapikian AZ, Chanock RM, Wyatt RG, Szmuness W, et al. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. *Infect Immun* 1979;26(1):270-3.
99. Hamano M1, Kuzuya M, Fujii R, Ogura H, Yamada M. Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan *J Med Virol* 2005;77(2):282-9.
100. Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* 2006;193(3):413-21
101. Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):90-6.
102. Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, Gould LH. Acute gastroenteritis surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States *Emerg Infect Dis* 2013;19(8):1305-9.
103. Blacklow NR, Cukor G. Norwalk virus: a major cause of epidemic gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72(12):1321-3.
104. Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):71-7.
105. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, et al. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1827-34.
106. Kanerva M, Maunula L, Lappalainen M, Mannonen L, von Bonsdorff CH, Anttila VJ. Prolonged norovirus outbreak in a Finnish tertiary care hospital caused by GII.4-2006b subvariants. *J Hosp Infect* 2009;71(3):206-13.
107. Fraenkel CJ, Inghammar M, Söderlund-Strand A, Johansson PJH, Böttiger B. Risk factors for hospital norovirus outbreaks: impact of vomiting, genotype, and multi-occupancy rooms. *J Hosp Infect* 2018;98(4):398-403.
108. Oshiro LS, Haley CE, Roberto RR, Riggs JL, Croughan M, Greenberg H, et al. A 27-nm virus isolated during an outbreak of acute infectious nonbacterial gastroenteritis in a convalescent hospital: a possible new serotype. *J Infect Dis* 1981;143(6):791-5.
109. Leers WD, Kasupski G, Fralick R, Wartman S, Garcia J, Gary W. Norwalk-like gastroenteritis epidemic in a Toronto hospital. *Am J Public Health* 1987;77(3):291-5.
110. Ahmed sCunney RJ, Costigan P, McNamara EB, Hayes B, Creamer E, LaFoy M, et al. Investigation of an outbreak of gastroenteritis caused by Norwalk-like virus, using solid phase immune electron microscopy. *J Hosp Infect* 2000;44(2):113-8.
111. Kuusi M, Nuorti JP, Maunula L, Minh Tran NN, Ratia M, Karlsson J, et al. A prolonged outbreak of Norwalk-like calicivirus (NLV) gastroenteritis in a rehabilitation centre due to environmental contamination. *Epidemiol Infect* 2002;129(1):133-8.
112. Lynn S, Toop J, Hanger C, Millar N. Norovirus outbreaks in a hospital setting: the role of infection control. *N Z Med J* 2004;117(1189):U771.

113. Khanna N, Goldenberger D, Graber P, Battegay M, Widmer AF. Gastroenteritis outbreak with norovirus in a Swiss university hospital with a newly identified virus strain. *J Hosp Infect* 2003;55(2):131-6.
114. Verbelen V, Bodéus M, Garrino MG, Scipioni A, Kabamba B, Daube G, et al. Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium. *Acta Clin Belg* 2004;59(1):30-3.
115. Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hübinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, et al. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(6):693-9.
116. Sheahan A, Copeland G, Richardson L, McKay S, Chou A, Babady NE, et al. Control of norovirus outbreak on a pediatric oncology unit. *Am J Infect Control* 2015;43(10):1066-9.
117. Thornton S, Davies D, Chapman F, Farkas T, Wilton N, Doggett D, et al. Detection of Norwalk-like virus infection aboard two U.S. Navy ships. *Mil Med* 2002;167(10):826-30.
118. Ahmed SF, Klena JD, Mostafa M, Dogantemur J, Middleton T, Hanson J, et al. Viral gastroenteritis associated with genogroup II norovirus among U.S. military personnel in Turkey, 2009. *PLoS One* 2012;7(5):e35791.
119. Grotto I, Huerta M, Balicer RD, Halperin T, Cohen D, Orr N, et al. An outbreak of norovirus gastroenteritis on an Israeli military base. *Infection* 2004;32(6):339-43.
120. Zhou N, Zhang H, Lin X, Hou P, Wang S, Tao Z, et al. A waterborne norovirus gastroenteritis outbreak in a school, eastern China. *Epidemiol Infect* 2016;144(6):1212-9.
121. Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 2003;131(1):727-36.
122. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norwalk-like virus outbreaks at two summer camps--Wisconsin, June 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50(30):642-3.
123. Sekla L, Stackiw W, Dzogan S, Sargeant D. Foodborne gastroenteritis due to Norwalk virus in a Winnipeg hotel. *CMAJ* 1989;140(12):1461-4.
124. Doménech-Sánchez A, Juan C, Pérez JL, Berrocal CI. Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(6):952-4.
125. Peipins LA, Highfill KA, Barrett E, Monti MM, Hackler R, Huang P, et al. A Norwalk-like virus outbreak on the Appalachian Trail. *J Environ Health* 2002;64(9):18-23.
126. Grote U, Schleenvoigt BT, Happle C, Dopfer C, Wetzke M, Ahrenstorf G, et al. Norovirus outbreaks in German refugee camps in 2015. *Z Gastroenterol* 2017;55(10):997-1003.
127. Evans MR, Meldrum R, Lane W, Gardner D, Ribeiro CD, Gallimore CI, et al. An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiol Infect* 2002;129(2):355-60.
128. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008;14(8):1224-31.

129. Nguyen GT, Phan K, Teng I, Pu J, Watanabe T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. *Medicine* 2017;96(40):e8139.
130. O'Ryan M, Riera-Montes M, Lopman B. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36(2):127-34.
131. Kreidieh K, Charide R, Dbaibo G, Melhem NM. The epidemiology of Norovirus in the Middle East and North Africa (MENA) region: a systematic review. *Virol J* 2017;14(1):220. doi: 10.1186/s12985-017-0877-3.
132. Thongprachum A, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak. *J Med Virol* 2016;88(4):551-70.
133. Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 2003;131(1):727-36.
134. Hall AJ. Noroviruses: the perfect human pathogens? *J Infect Dis* 2012;205(11):1622-4.
135. Bean NH, Griffin PM. Foodborne Disease Outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, Vehicles, and Trends. *J Food Protect* 1990;53(9): 804-17.
136. Bernard H, Faber M, Wilking H, Haller S, Höhle M, Schielke A, et al. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Euro Surveill* 2014;19(8):20719.
137. Müller L, Schultz AC, Fonager J, Jensen T, Lisby M, Hindsdal K, et al. Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010-2011. *Epidemiol Infect* 2015;143(11):2299-307.
138. Girish R, Broor S, Dar L, Ghosh D. Foodborne outbreak caused by a Norwalk-like virus in India. *J Med Virol* 2002;67(4):603-7.
139. Cannon RO, Poliner JR, Hirschhorn RB, Rodeheaver DC, Silverman PR, Brown EA, et al. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J Infect Dis* 1991;164(5):860-3.
140. Sakon N, Sadamasu K, Shinkai T, Hamajima Y, Yoshitomi H, Matsushima Y, et al. Foodborne Outbreaks Caused by Human Norovirus GII.P17-GII.17-Contaminated Nori, Japan, 2017. *Emerg Infect Dis* 2018;24(5):920-3.
141. Hardstaff JL, Clough HE, Lutje V, McIntyre KM, Harris JP, Garner P, et al. Foodborne and Food-Handler Norovirus Outbreaks: A Systematic Review. *Foodborne Pathog Dis* 2018;15(10):589-97.
142. Yeargin T, Gibson KE. Key characteristics of foods with an elevated risk for viral enteropathogen contamination. *J Appl Microbiol* 2018; Sep 23. doi: 10.1111/jam.14113.
143. Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ* 2018;67(10):1-11.
144. Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis* 1982;146(2):190-7.

145. Wilson R, Anderson LJ, Holman RC, Gary GW, Greenberg HB. Waterborne gastroenteritis due to the Norwalk agent: clinical and epidemiologic investigation. *Am J Public Health* 1982;72(1):72-4.
146. Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 1999;180(6):1771-6.
147. Boccia D, Tozzi AE, Cotter B, Rizzo C, Russo T, Buttinelli G, et al. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis* 2002;8(6):563-8.
148. Carrique-Mas J, Andersson Y, Petersén B, Hedlund KO, Sjögren N, Giesecke J. A norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. *Epidemiol Infect* 2003;131(1):737-44.
149. Larsson C, Andersson Y, Allestam G, Lindqvist A, Nenonen N, Bergstedt O. Epidemiology and estimated costs of a large waterborne outbreak of norovirus infection in Sweden. *Epidemiol Infect* 2014;142(3):592-600.
150. Kauppinen A, Pitkänen T, Miettinen IT. Persistent Norovirus Contamination of Groundwater Supplies in Two Waterborne Outbreaks. *Food Environ Virol* 2018;10(1):39-50.
151. Giammanco GM, Bonura F, Urone N, Purpari G, Cuccia M, Pepe A, et al. Waterborne Norovirus outbreak at a seaside resort likely originating from municipal water distribution system failure. *Epidemiol Infect* 2018;146(7):879-87.
152. Wikswo ME, Kambhampati A, Shioda K, Walsh KA, Bowen A, Hall AJ; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of Acute Gastroenteritis Transmitted by Person-to-Person Contact, Environmental Contamination, and Unknown Modes of Transmission--United States, 2009-2013. *MMWR Surveill Summ* 2015;64(12):1-16.
153. Podewils LJ, Zanardi Blevins L, Hagenbuch M, Itani D, Burns A, Otto C, et al. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect* 2007;135(5):827-33.
154. Polkowska A, Räsänen S, Al-Hello H, Bojang M, Lyytikäinen O, Nuorti JP, et al. An outbreak of Norovirus infections associated with recreational lake water in Western Finland, 2014. *Epidemiol Infect* 2018;146(5):544-50.
155. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000;124(3):481-7.
156. Becker KM, Moe CL, Southwick KL, MacCormack JN. Transmission of Norwalk virus during a football game. *N Engl J Med* 2000;343(17):1223-7.
157. Escudero BI, Rawsthorne H, Gensel C, Jaykus LA. Persistence and transferability of noroviruses on and between common surfaces and foods. *J Food Prot* 2012;75(5):927-35.
158. D'Souza DH, Sair A, Williams K, Papafragkou E, Jean J, Moore C, et al. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol* 2006;108(1):84-91.
159. Cheesbrough JS, Green J, Gallimore CI, Wright PA, Brown DW. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol Infect* 2000;125(1):93-8.

160. Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, Chapin AR, Gibson K, Schwab E, et al. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26(10):802-10.
161. Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S254-61.
162. Shioda K, Kambhampati A, Hall AJ, Lopman BA. Global age distribution of pediatric norovirus cases. *Vaccine* 2015;33(33):4065-8.
163. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S284-7.
164. Ahmed SM, Lopman BA, Levy K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS One* 2013;8(10):e75922.
165. Lopman BA, Reacher M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DW. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health* 2003;3:13.
166. Boga JA, Melón S, Nicieza I, De Diego I, Villar M, Parra F, De Oña M. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2668-74.
167. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002;299(2):225-39.
168. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 12):3347-59.
169. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 2005;11(7):1079-85.
170. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 2013;158(10):2059-68.
171. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 2011;51(2):121-5.
172. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 2013;56(3):185-93.
173. Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4659-64.
174. Makhaola K, Moyo S, Lechiile K, Goldfarb DM, Kebaabetswe LP. Genetic and epidemiological analysis of norovirus from children with gastroenteritis in Botswana, 2013-2015. *BMC Infect Dis* 2018;18(1):246.

175. de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill* 2015;20(26). pii: 21178.
176. Chan MC, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Tin EK, et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun* 2015;6:10061.
177. Thanusuwannasak T, Puenpa J, Chuchaona W, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Emergence of multiple norovirus strains in Thailand, 2015-2017. *Infect Genet Evol* 2018;61:108-12.
178. van Beek J, de Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect Dis* 2018;18(5):545-53.
179. Parra GI, Green KY. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015;21(8):1477-9.
180. Medici MC, Tummo F, Martella V, De Conto F, Arcangeletti MC, Pinardi F, et al.. Emergence of novel recombinant GII.P16_GII.2 and GII. P16_GII.4 Sydney 2012 norovirus strains in Italy, winter 2016/2017. *New Microbiol* 2018;41(1):71-2.
181. Altindis M, Bányai K, Kalayci R, Gulamber C, Koken R, Yoldas Y, et al. Frequency of norovirus in stool samples from hospitalized children due to acute gastroenteritis in Anatolia, Turkey, 2006-2007. *Scand J Infect Dis* 2009;41(9):685-8.
182. Ozkul AA, Kocazeybek BS, Turan N, Reuter G, Bostan K, Yilmaz A, et al. Frequency and phylogeny of norovirus in diarrheic children in Istanbul, Turkey. *J Clin Virol* 2011;51(3):160-4.
183. Akhter S, Turegun B, Kiyan M, Gerceker D, Guriz H, Sahin F. Investigation of seven different RNA viruses associated with gastroenteritis in children under five years old. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(2):233-41.
184. Aksu A, Akçalı A. Detection of norovirus infections in Canakkale with ELISA and RT-PCR. *Cukurova Med J* 2016;41(3):533-8.
185. Altay A, Bozdayı G, Meral M, Dallar Bilge Y, Dalgıç B, Ozkan S, et al. Investigation of norovirus infection incidence among 0-5 years old children with acute gastroenteritis admitted to two different hospitals in Ankara, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2013;47(1):98-108.
186. Cöl D, Biçer S, Ciler Erdağ G, Giray T, Gürol Y, Yilmaz G, et al. Annual report on norovirus in children with acute gastroenteritis in 2009 and their genotypes in Turkey. *Infez Med* 2013;21(4):261-9.
187. İnan N, Kabakoğlu Ünsür E, Demirel A, Mamçu D, Sönmez E, Arısoy A. Akut viral gastroenterit öntanılı vakalarda rotavirus, adenovirus ve norovirus sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* 2014;28(1):14-9.
188. Uyar Y, Carhan A, Ozkaya E, Ertek M. Evaluation of laboratory diagnosis of the first norovirus outbreak in Turkey in 2008. *Mikrobiyol Bul* 2008;42(4):607-15.
189. Barlas G, Tozan E, Altuğ Y, Aktaş D, Temel F, Korukluoğlu G, et al. Kütahya İli Tavşanlı İlçesinde ishal salgını incelemesi, Temmuz 2014, bir olgu-kontrol çalışması. *Turk J Public Health* 2016;14(2):81-94.
190. Albayrak N, Yağcı-Çağlayık D, Başak Altaş A, Korukluoğlu G, Ertek M. Refik Saydam Hıfızissihha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma

- Laboratuvarı, 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011;68(1):9-15.
191. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72(12):1329-32.
 192. 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(7):964-9.
 193. Gary GW Jr, Kaplan JE, Stine SE, Anderson LJ. Detection of Norwalk virus antibodies and antigen with a biotin-avidin immunoassay. *J Clin Microbiol* 1985;22(2):274-8.
 194. Madore HP, Treanor JJ, Pray KA, Dolin R. Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 1986;24(3):456-9
 195. Herrmann JE, Kent GP, Nowak NA, Brondum J, Blacklow NR. Antigen detection in the diagnosis of Norwalk virus gastroenteritis. *J Infect Dis*. 1986;154(3):547-8.
 196. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sánchez-Fauquier A, Schreier E, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(10):1349-55.
 197. Costantini V, Grenz L, Fritzinger A, Lewis D, Biggs C, Hale A, et al. Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human norovirus. *J Clin Microbiol* 2010;48(8):2770-8.
 198. Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol* 2013;56(3):194-8
 199. Zhang L, Peng Y, Jiang N, Shi L, Lin J, Wu P, et al. Preparation and Evaluation of Combined Detection of Norovirus GI and GII: An Innovative Fluorescent Particles Test Strip. . *Biomed Res Int* 2018;2018:7862467.
 200. De Leon R, Matsui SM, Baric RS, Herrmann JE, Blacklow NR, Greenberg HB, et al. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3151-7.
 201. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(10):2529-34.
 202. Willcocks MM, Silcock JG, Carter MJ. Detection of Norwalk virus in the UK by the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1993;112(1):7-12.
 203. Moe CL, Gentsch J, Ando T, Grohmann G, Monroe SS, Jiang X, et al. Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 1994;32(3):642-8.
 204. Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995;33(1):64-71.
 205. Vinjé J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1423-33.

206. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. . Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999;83(1-2):145-54.
207. Kawamoto H, Yamazaki K, Utagawa E, Ohyama T. Nucleotide sequence analysis and development of consensus primers of RT-PCR for detection of Norwalk-like viruses prevailing in Japan. *J Med Virol* 2001;64(4):569-76.
208. Naitou H, Morita T. Selection of more appropriate PCR primer pairs for improved efficiency in detecting Norwalk-like virus (NLV) RNA. *J Gen Appl Microbiol* 2001;47(5):241-6.
209. Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002;25(2):233-5.
210. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100(1-2):107-14.
211. Naitou H, Morita T. Selection of more appropriate PCR primer pairs for improved efficiency in detecting Norwalk-like virus (NLV) RNA. *J Gen Appl Microbiol* 2001;47(5):241-246.
212. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1548-57.
213. Richards GP, Watson MA, Kingsley DH. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *J Virol Methods*. 2004;116(1):63-70.
214. Höhne M, Schreier E. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol* 2004;72(2):312-9.
215. Schmid M, Oehme R, Schallasta 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.
216. Vainio K, Myrmet M. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol* 2006;44(10):3695-702.
217. Kele B, Lengyel G, Deak J. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70(4):475-8.
218. Dunbar NL, Bruggink LD, Marshall JA. Evaluation of the RIDAGENE real-time PCR assay for the detection of GI and GII norovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(3):317-21.
219. Wessels E, Rusman LG, van Bussel MJ, Claas EC. Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG® GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(3):O182-7.
220. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol* 2014;52(10):3667-73.

221. Patterson SS, Smith MW, Casper ET, Huffman D, Stark L, Fries D, et al. A nucleic acid sequence-based amplification assay for real-time detection of norovirus genogroup II. *J Appl Microbiol* 2006;101(4):956-63.
222. Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, Shimazu Y, Miyazaki K. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1376-81.
223. Bartsch C, Höper D, Mäde D, Johne R. Analysis of frozen strawberries involved in a large norovirus gastroenteritis outbreak using next generation sequencing and digital PCR. *Food Microbiol* 2018;76:390-395.
224. Persson S, Eriksson R, Lowther J, Ellström P, Simonsson M. Comparison between RT droplet digital PCR and RT real-time PCR for quantification of noroviruses in oysters. *Int J Food Microbiol* 2018;284:73-83.
225. Polo D, Schaeffer J, Fournet N, Le Saux JC, Parnaudeau S, McLeod C, et al. Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. *Emerg Infect Dis* 2016;22(12):2189-2191.
226. Monteiro S, Santos R. Nanofluidic digital PCR for the quantification of Norovirus for water quality assessment. *PLoS One* 2017;12(7):e0179985
227. Rossignol JF. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res* 2014;110:94-103.
228. Siddiq DM, Koo HL, Adachi JA, Viola GM. Norovirus gastroenteritis successfully treated with nitazoxanide. *J Infect* 2011;63(5):394-7.
229. Haubrich K, Gantt S, Blydt-Hansen T. Successful treatment of chronic norovirus gastroenteritis with nitazoxanide in a pediatric kidney transplant recipient. *Pediatr Transplant* 2018;22(4):e13186.
230. Rossignol JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(10):1423-30.
231. Chagla Z, Quirt J, Woodward K, Neary J, Rutherford C. Chronic norovirus infection in a transplant patient successfully treated with enterally administered immune globulin. *J Clin Virol* 2013;58(1):306-8.
232. Gairard-Dory AC, Dégot T, Hirschi S, Schuller A, Leclercq A, Renaud-Picard B, et al. Clinical usefulness of oral immunoglobulins in lung transplant recipients with norovirus gastroenteritis: a case series. *Transplant Proc* 2014;46(10):3603-5.
233. Florescu DF, Hermsen ED, Kwon JY, Gumeel D, Grant WJ, Mercer DF, et al. Is there a role for oral human immunoglobulin in the treatment for norovirus enteritis in immunocompromised patients? *Pediatr Transplant* 2011;15(7):718-21
234. Florescu DF, Hill LA, McCartan MA, Grant W. Two cases of Norwalk virus enteritis following small bowel transplantation treated with oral human serum immunoglobulin. *Pediatr Transplant* 2008;12(3):372-5.
235. Thorne L, Arias A, Goodfellow I. Advances Toward a Norovirus Antiviral: From Classical Inhibitors to Lethal Mutagenesis. *J Infect Dis* 2016;213 Suppl 1:S27-31.
236. Galasiti Kankanamalage AC, Weerawarna PM, Kim Y, Chang KO, Groutas WC. Anti-norovirus therapeutics: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat* 2016;26(3):297-308.

237. Costantini VP, Whitaker T, Barclay L, Lee D, McBrayer TR, Schinazi RF, et al. Antiviral activity of nucleoside analogues against norovirus. *Antivir Ther* 2012;17(6):981-91.
238. Rocha-Pereira J, Jochmans D, Debing Y, Verbeken E, Nascimento MS, Neyts J. The viral polymerase inhibitor 2'-C-methylcytidine inhibits Norwalk virus replication and protects against norovirus-induced diarrhea and mortality in a mouse model. *J Virol* 2013;87(21):11798-805.
239. Rocha-Pereira J, Kolawole AO, Verbeken E, Wobus CE, Neyts J. Post-exposure antiviral treatment of norovirus infections effectively protects against diarrhea and reduces virus shedding in the stool in a mortality mouse model. *Antiviral Res* 2016;132:76-84
240. Rocha-Pereira J, Van Dycke J, Neyts J. Treatment with a Nucleoside Polymerase Inhibitor Reduces Shedding of Murine Norovirus in Stool to Undetectable Levels without Emergence of Drug-Resistant Variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(3):1907-11
241. Rocha-Pereira J, Nascimento MS, Ma Q, Hilgenfeld R, Neyts J, Jochmans D. The enterovirus protease inhibitor rupintrivir exerts cross-genotypic anti-norovirus activity and clears cells from the norovirus replicon. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(8):4675-81.
242. Ajami NJ, Kavanagh OV, Ramani S, Crawford SE, Atmar RL, Jiang ZD, et al. Seroepidemiology of norovirus-associated travelers' diarrhea. *J Travel Med* 2014;21(1):6-11.
243. Ali ES, Rajapaksha H, Carr JM, Petrovsky N. Norovirus drug candidates that inhibit viral capsid attachment to human histo-blood group antigens. *Antiviral Res* 2016;133:14-22.
244. Rocha-Pereira J, Jacobs S, Noppen S, Verbeken E, Michiels T, Neyts J. Interferon lambda (IFN- λ) efficiently blocks norovirus transmission in a mouse model. *Antiviral Res* 2018;149:7-15.
245. Lee S, Baldrige MT. Interferon-Lambda: A Potent Regulator of Intestinal Viral Infections. *Front Immunol* 2017;8:749.
246. Pirtle EC, Beran GW. Virus survival in the environment. *Rev Sci Tech* 1991;10(3):733-48.
247. Nuanualsuwan S, Mariam T, Himathongkham S, Cliver DO. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. *Photochem Photobiol* 2002;76(4):406-10.
248. De Roda Husman AM, Bijkerk P, Lodder W, Van Den Berg H, Pribil W, Cabaj A, et al. Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(9):5089-93.
249. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(8):4538-43.
250. Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect* 1999;41(1):51-7.
251. Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CR. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J Biol Chem* 2006;281(28):19478-88.

252. 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(1):42-9.
253. Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 1985;50(2):261-4.
254. Shin GA, Sobsey MD. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res* 2008;42(17):4562-8.
255. Ha JH, Kim SH, Lee HM, Kim SJ, Lee HW. Efficacy of Combination Treatment with Sodium Metasilicate and Sodium Hypochlorite for Inactivation of Norovirus on Fresh Vegetables. *Foodborne Pathog Dis* 2018;15(2):73-80.
256. Leon JS, Kingsley DH, Montes JS, Richards GP, Lyon GM, Abdulhafid GM, et al. Randomized, double-blinded clinical trial for human norovirus inactivation in oysters by high hydrostatic pressure processing. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(15):5476-82.
257. Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinjé J, et al. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(8):731-40.
258. Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep* 2011;60(RR-3):1-18.
259. Liu P, Yuen Y, Hsiao HM, Jaykus LA, Moe C. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(2):394-9.
260. Ball JM, Estes MK, Hardy ME, Conner ME, Opekun AR, Graham DY. Recombinant Norwalk virus-like particles as an oral vaccine. *Arch Virol Suppl* 1996;12:243-9.
261. Huo Y, Wan X, Ling T, Wu J, Wang W, Shen S. Expression and purification of norovirus virus like particles in *Escherichia coli* and their immunogenicity in mice. *Mol Immunol* 2018;93:278-84.
262. Xia M, Farkas T, Jiang X. Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *J Med Virol* 2007;79(1):74-83.
263. Ball JM, Hardy ME, Atmar RL, Conner ME, Estes MK. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol* 1998;72(2):1345-53.
264. Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Mason H. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnol Bioeng* 2009;103(4):706-14.
265. El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, Bernstein DI, Treanor JJ, et al. Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis* 2010;202(11):1649-58.
266. Ramirez K, Wahid R, Richardson C, Bargatze RF, El-Kamary SS, Sztein MB, et al. Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers. *Clin Immunol* 2012;144(2):98-108.

267. Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology* 1999;117(1):40-8.
268. Guerrero RA1, Ball JM, Krater SS, Pacheco SE, Clements JD, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *J Virol* 2001;75(20):9713-22.
269. Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003;108(3):241-7.
270. Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med* 2011;365(23):2178-87.
271. Bok K, Parra GI, Mitra T, Abente E, Shaver CK, Boon D, et al. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(1):325-30.
272. Cortes-Penfield NW, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. *Clin Ther* 2017;39(8):1537-1549
273. Murphy CN, Fowler RC, Iwen PC, Fey PD. Evaluation of the BioFire FilmArray® GastrointestinalPanel in a Midwestern Academic Hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36(4):747-54.
274. Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci* 2008;23(6):937-40.
275. Pongsuwanna Y1, Tacharoenmuang R, Prapanpoj M, Sakon N, Komoto S, Guntapong R, et al. Monthly Distribution of Norovirus and Sapovirus Causing Viral Gastroenteritis in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 2017;70(1):84-6.
276. Mousavi Nasab SD, Sabahi F, Makvandi M, Mirab Samiee S, Nadji SA, Ravanshad M. Epidemiology of Rotavirus-Norovirus Co-Infection and Determination of Norovirus Genogrouping among Children with Acute Gastroenteritis in Tehran, Iran. *Iran Biomed J* 2016;20(5):280-6.
277. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(4):e134-47.
278. Tüzüner U, Gülçen BS, Özdemir M, Feyzioğlu B. Gastroenteritli Çocukların Dışkılarında Adenovirus ve Rotavirus Sıklığı ve Mevsimsel Dağılımı, *Klimik Dergisi* 2016;29(3): 121-4.
279. Iraz M, Ceylan A. Akut Gastroenteritli 0-5 Yaş Arası Çocuklarda Rotavirus Sıklığı, *ANKEM Derg* 2013;27(1):2-6.
280. İlkaç M, Şahin A, Nazik H, Öngen B. Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus Sıklığının Araştırılması Ve Rotavirus Sezonunun Takibi: Beş Yıllık Sonuçların Değerlendirilmesi, *ANKEM Derg* 2012;26(1):25-29.
281. Walter F, Ott JJ, Claus H, Krause G. Sex- and age patterns in incidence of infectious diseases in Germany: analyses of surveillance records over a 13-year period (2001-2013). *Epidemiol Infect* 2018;146(3):372-8.
282. Mesquita JR, Nascimento MS. Norovirus GII.4 antibodies in the Portuguese population. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(9):1201-4.

283. Charmandari E, Nicolaides NC, Chrousos GP. Adrenal insufficiency. *Lancet* 2014;383(9935):2152-67
284. Kolho KL, Klemola P, Simonen-Tikka ML, Ollonen ML, Roivainen M. Enteric viral pathogens in children with inflammatory bowel disease. *J Med Virol* 2012;84(2):345-7.
285. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet* 2017;389(10080):1741-55.
286. Stolzenberg E, Berry D, Yang, Lee EY, Kroemer A, Kaufman S, Wong GCL, et al. A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. *J Innate Immun* 2017;9(5):456-63.
287. Labrie V, Brundin P. Alpha-Synuclein to the Rescue: Immune Cell Recruitment by Alpha-Synuclein during Gastrointestinal Infection. . *J Innate Immun* 2017;9(5):437-40.
288. Hyun J, Kim HS, Kim HS, Lee KM. Evaluation of a new real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of norovirus in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78(1):40-4.
289. Dimitriadis A, Marshall JA. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of norovirus in outbreak specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24(9):615-8.
290. Wilhelmi de Cal I, Revilla A, del Alamo JM, Román E, Moreno S, Sánchez-Fauquier A. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays for the detection of norovirus in faecal samples from hospitalised children with sporadic acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(3):341-3.
291. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona Rde C, et al. Norovirus 3rd Generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *J Virol Methods* 2011;173(1):13-6.
292. Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KM, Piralla A, Baldanti F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75(1):110-1
293. Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M, Lee C, Jang D, 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(2):216-9.
294. Jonckheere S, Botteldoorn N, Vandecandelaere P, Frans J, Laffut W, Coppens G, et al. Multicenter evaluation of the revised RIDA® QUICK test (N1402) for rapid detection of norovirus in a diagnostic laboratory setting. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 May;88(1):31-35.
295. Vyas K, Atkinson C, Clark DA, Irish D. Comparison of five commercially available immunochromatographic tests for the detection of norovirus in faecal specimens. *J Hosp Infect* 2015;91(2):176-8.
296. Battaglioli G, Nazarian EJ, Lamson D, Musser KA, St George K. Evaluation of the RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *J Clin Virol* 2012;53(3):262-4.

297. Bruggink LD, Dunbar NL, Marshall JA. Evaluation of the updated RIDA®QUICK (Version N1402) immunochromatographic assay for the detection of norovirus in clinical specimens. *J Virol Methods* 2015;223:82-7
298. Derrington P, Schreiber F, Day S, Curtis C, Lyon M. Norovirus Ridaquick: a new test for rapid diagnosis of norovirus. *Pathology* 2009;41(7):687-8.
299. Kirby A, Gurgel RQ, Dove W, Vieira SC, Cunliffe NA, Cuevas LE. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *J Clin Virol* 2010;49(4):254-7.
300. Geginat G, Kaiser D, Schrempp S. Evaluation of third-generation ELISA and a rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(5):733-7.
301. Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Tung PG, et al. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II. *J Virol Methods* 2008;148(1-2):1-8.
302. Ushijima H, Thongprachum A, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, et al. Evaluation of Immunochromatographic Tests and a New Enzyme Immunoassay for Detection of a Novel GII.17 Norovirus in Stool Samples. *Jpn J Infect Dis* 2017;70(3):326-8.
303. Théry L, Bidalot M, Pothier P, Ambert-Balay K. Evaluation of immunochromatographic tests for the rapid detection of the emerging GII.17 norovirus in stool samples, January 2016. *Euro Surveill* 2016;21(4)
304. Fumian TM, Leite JP, Rocha MS, de Andrade JS, Fioretti JM, de Assis RM, et al. Performance of a one-step quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and noroviruses GII during two periods of high viral circulation. *J Virol Methods* 2016;228:123-9.
305. Chan MCW, Kwok K, Hung TN, Chan PKS. Reduced Diagnostic Performance of Two Norovirus Antigen Enzyme Immunoassays for the Emergent Genogroup II Genotype 17 Kawasaki 2014 Variant. *J Clin Microbiol* 2016;54(6):1650-2.
306. Bon F, Kaplon J, Metzger MH, Pothier P. Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens. *Pathol Biol (Paris)* 2007;55(3-4):149-53.

EKLER



HASTA TAKİP FORMU

Ad-Soyad:

Protokol No:

Doğum Tarihi:

Cinsiyet:

Yaşadığı İl/İlçe:

Mail Adresi:

Telefon:

Sıra No:

1. Gönderilen Bölüm:

- ☐ Yatan Hasta
- ☐ Poliklinik hastası

2. Lütfen aşağıda size uygun olanları işaretleyiniz.

- ☐ İshal
Ne zamandan beri?
Günde kaç kez?.....
- ☐ Bulantı
- ☐ Kusma
Günde kaç kez?.....
- ☐ Karın ağrısı
- ☐ Ateş
- ☐ Diğer(açıklayınız):

3. Yakın çevrenizde(okul, ev, iş yeri) veya aynı yerden yemek yediğiniz kişilerde benzer şikâyetler var mı?

- ☐ Evet var
- ☐ Hayır yok

4. Bilinen bir hastalığınız var mı?

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Açıklama

Bu bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na başvuran kadın ve erkekleri “**İshalli Hasta Dışkılarında Norovirüs Varlığının Araştırılması**” araştırmasına davet etmek üzere hazırlanmıştır.

Sorumlu Araştırmacının adı, soyadı : Betigül Öngen

Yardımcı Araştırmacının adı, soyadı : Cihan Yeşiloğlu

Araştırmayı yürütecek kuruluşun adı : İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Destekleyici kuruluş : İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi ve Labormed Tıbbi Ürünler San. Ve Tic. Ltd. Şti

Bölüm I – Araştırma Hakkında Bilgi

“İshalli Hasta Dışkılarında Norovirüs Varlığının Araştırılması” başlıklı çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.”

1. Bu çalışma bir tıpta uzmanlık araştırma tezidir.
2. Bu çalışmanın adı “İSHALLİ HASTA DIŞIKILARINDA NOROVİRÜS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI”’dır.
3. Araştırmanın amacı, verdiğiniz dışkı örneğinde norovirüs varlığının araştırılması ve elde edilen istatistiksel sonuçların tanı ve tedavi protokollerine ayrıca ülkemizdeki epidemiyolojik verilere katkı sağlamasıdır.
4. Araştırmamız kapsamında ve araştırma sürecinde size aldığınız tedavi dışında herhangi bir tedavi uygulanmayacak ve herhangi (invaziv veya invaziv olmayan) bir işlem yapılmayacaktır.
5. Araştırmada verdiğiniz dışkı örneğinden istenilen testler çalışıldıktan sonra artan örnek laboratuvarımızda size bildirilen çalışma amacına uygun olarak incelenecektir.
6. Bu çalışmadan dolayı herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır.
7. Bu araştırmada verdiğiniz dışkı örneği immünekromatografi, ELISA ve moleküler tanı yöntemleri kullanılarak Norovirüs isimli virüsün varlığı açısından incelenecektir.
8. Araştırma ile ilgili yukarıda söz edilen ve başvurduğunuz hekim tarafından istenen testlerin yapılması için vereceğiniz dışkı örneğine uygulanacak işlemler laboratuvarımızda yapılacak olup sizin üzerinizde uygulanacak ve sizin için risk teşkil edecek herhangi bir durum bulunmamaktadır.
9. Araştırma sonucunda verdiğiniz dışkı örneğinde rutin olarak araştırılmayan bir mikroorganizmanın varlığı araştırılacak ve elde edilecek istatistiksel veriler sonucunda başvuran diğer hastaların şikâyetlerinin nedenleri hakkında öngörülecek bir bilgi sağlanacak olup diğer hastalara yarar sağlamış olacaksınız.
10. Araştırmaya katılmanız tamamen sizin isteğinize bağlıdır ve istediğiniz zaman herhangi bir cezaya ya da yaptırıma maruz kalmaksızın, tedavi dâhil hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz.
11. Araştırmaya katılmanız halinde İzleyiciler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer sağlık otoriteleri size ait orijinal tıbbi kayıtlara doğrudan erişebilecektir; araştırmaya katılıp bu formu imzalamanız durumunda siz ya da yasal temsilciniz söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız.

- 12.** İlgili mevzuat gereğince kimliğinizi ortaya çıkaracak tüm kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacak ve araştırma sonuçlarının yayınlanması durumunda dahi kimliğiniz gizli tutulacaktır.
- 13.** Araştırmaya katılmanız durumunda sizden bir ek süre talebimiz yoktur.
- 14.** Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı 182 kişi olarak belirlenmiştir.
- 15.** Sizden aldığımız dışkı örneğinin analizleri yukarıda belirtilen yöntemler kullanılarak Cihan Yeşiloğlu tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılacaktır.
- 16.** Araştırma sonrası veya olurunuzu geri çekmeniz durumunda örnekleriniz imha edilecektir.
- 17.** Araştırma için sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir. Size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumu'ndan (SGK'dan) herhangi bir ücret alınmayacaktır.
- 18.** Bu araştırma 12 ay içinde bitirilmesi planlanan bir araştırmadır. Fakat sizden sadece bir kez örnek alınacaktır.
- 19.** Araştırma hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir anlaşılmayan konu hakkında daha ayrıntılı bilgi edinebilmeniz için araştırmacılara; sorumlu araştırmacı Prof.Dr. Betigül Öngen'e ve yardımcı araştırmacı Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Cihan Yeşiloğlu'na ait (0506) 876 10 31 numaralı telefondan günün 24 saati erişebileceksiniz.

Bölüm II – Katılımcının Beyanı

Araştırmacı Cihan Yeşiloğlu tarafından İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda "İshalli Hasta Dışkılarında Norovirüs Varlığının Araştırılması" isimli bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilendirmeden sonra böyle bir araştırmaya "gönüllü" olarak katılmak üzere davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin, gizlilik içinde, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile korunacağı güvencesi verildi. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında da kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Tarafıma bir ücret ödenmeyecektir.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde gönüllü olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun bir örneğinin bana verileceğini de biliyorum.

‘İSHALLİ HASTA DIŞKILARINDA NOROVİRÜS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI’ isimli araştırmanızda kullanılacak biyolojik örneklerimin,

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıdaki bilgileri benden örnek alınmadan önce okudum (okundu). Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

- ☐ Evet
- ☐ Hayır
- ☐

Araştırmaya katılan kişinin

Adı-soyadı ve imzası:

Tarih:

Telefon numarası:

Gönüllünün yasal temsilcisinin

Adı-soyadı ve imzası:

Tarih:

Telefon numarası:

Araştırma ekibindeki yardımcı araştırmacının

Adı-soyadı ve imzası: **Cihan Yeşiloğlu**

Adres: İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tarih:

Telefon numarası: **0506 8761031**

Araştırma ekibindeki sorumlu araştırmacının

Adı-soyadı ve imzası: **Betigül Öngen**

Adres: İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: CİHAN YEŞİLOĞLU

1.GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	15.02.2019		
T.C. KİMLİK NO	33421597194		
DOĞUM YERİ VE YILI	SEYHAN / 18.08.1989		
GÖREV YERİ	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI		
GÖREV UNVANI	TIPTA UZMANLIK ÖĞRENCİSİ		
YAZIŞMA ADRESİ	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI		
TEL	05068761031	GSM	05068761031
E-POSTA	cihan.yesiloglu@istanbul.edu.tr	FAX	

2. EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM/ANABİLİM DALI
2003	İlköğretim-Başkent Üniversitesi Özel Başkent Okulları (Adana)
2006	Lise-Adana Fen Lisesi
2013	Lisans- Hacettepe Üniversitesi / Hacettepe Tıp Fakültesi / Tıp(İng.)
	Tıpta Uzmanlık- İstanbul Üniversitesi / İstanbul Tıp Fakültesi / Tıbbi Mikrobiyoloji