

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



AKUT GASTROENTERİTLİ OLGULARDA NOROVİRÜS
ARAŞTIRILMASINDA ELISA VE PCR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. ARİF AKSU

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ALPER AKÇALI

Çanakkale/2013

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT GASTROENTERİTLİ OLGULARDA NOROVİRÜS
ARAŞTIRILMASINDA ELISA VE PCR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. ARİF AKSU

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ALPER AKÇALI

Çanakkale/2013

Bu araştırma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Fonu tarafından 2012/031 sayı ile desteklenmiştir

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlık çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:...../...../.....

**AKUT GASTROENTERİTLİ OLGULARDA NOROVİRÜS
ARAŞTIRILMASINDA ELISA VE PCR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Alper AKÇALI

Tez Jürisi Üyeleri:

Adı Soyadı

İmzası

Doç. Dr. Ahmet ÜNVER

.....

Doç. Dr. Müşerref TATMAN-OTKUN

.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulunun...../...../..... tarih ve /...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.....

Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu tezin hazırlanmasında bana yol gösteren ve büyük emeği olan tez danışmanım, hocam Doç. Dr. Alper AKÇALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile her zaman desteğini gördüğüm değerli hocalarım Doç. Dr. Müşerref TATMAN-OTKUN'a, Doç. Dr. Ahmet ÜNVER'e ve Yrd. Doç. Ahmet VURAL'a teşekkür ederim.

Rotasyonum sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Metin OTKUN'a, Doç. Dr. Suzan SAÇAR'a ve Yrd. Doç. Dr. Alper ŞENER'e teşekkür ederim.

İstatistiksel konularda desteği için Dr. Merve ÇELİK'e teşekkür ederim.

Birlikte olmaktan sonsuz mutluluk duyduğum, yardım ve anlayışı ile daima yanımda olan değerli eşim Gökçe Çiçek AKSU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Arif AKSU

ÖZET

AKUT GASTROENTERİTLİ OLGULARDA NOROVİRÜS ARAŞTIRILMASINDA ELISA VE PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İshal her yıl dünyada yaklaşık 1.5 milyar insanı etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Akut gastroenteritler tüm dünyada yaygın olarak görülen enfeksiyon hastalıkları arasında yer almakta ve ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır; özellikle çocuklar hastalıktan etkilenen grupta yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde akut barsak enfeksiyonları, solunum yolları enfeksiyonlarından sonra çocuk morbititesinin ve sağlık harcamalarının önemli bir kısmını teşkil etmektedir. Dünya’da en sık akut diyare etkeni olarak rotavirüs görülmekte iken akut su kaynaklı gastroenterit salgınlarının etkeni olarak da norovirüs sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Norovirüs *Caliciviridae* ailesinde yer alan, zarfsız, 30-38 nm çapında, ikozahedral kapsidli, pozitif polariteli, tek sarmallı RNA virüsüdür. İnsanlarda norovirus enfeksiyonunun kuluçka süresi 12-48 saat olup, hastalık son 12-60 saat içerisinde oluşan kusma, ishal veya her ikisinin birlikte görülmesiyle karakterizedir. Norovirüsün insandan insana yayılımı için bilinen geçiş yolları; fekal-oral yol, kontamine yiyecekler ve sular, aerosol şeklinde kusma materyali ve kontamine olmuş çevresel yüzeylerdir

Amaç: Literatürde yaptığımız arama sonucu Çanakkale ilinden günümüze kadar hiç norovirüs vakası bildirilmediği tespit edilmiştir. İlimiz hem kara hem de su yolu olarak bir geçiş noktası olup, ulusal ve uluslararası olarak etkenin ilimize taşınması çok büyük bir olasılıktır. Bu çalışma ile norovirüs araştırılmasında ELISA ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması, Çanakkale ilinde akut gastroenteritli olgularda norovirüs sıklığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışma Çanakkale ilinden gastroenterit şikayeti ile ÇOMÜ Tıp Fakültesi hastanesine başvuran hastaların rutin tanı amacıyla verdiği dışkı örneklerinde gerçekleştirildi. 92 örnek toplanmış olup, bu örneklerin herbirinde ticari ELISA kiti ile antijen ve real-time RT-PCR yöntemi ile nükleik asit aranmıştır.

Bulgular: ELISA ile %10.9 (10/92) örnek norovirüs pozitif, %89.1 (82/92) örnek negatif bulunmuştur. Real-time RT-PCR ile 4 örnek internal kontrolü negatif olduğu için çalışmadan çıkarılmış değerlendirmeler 88 örnek üstünden yapılmıştır. PCR ile 15 örnek norovirüs pozitif bulunmuş bunlardan biri GI pozitif diğer 14'ü ise norovirüs GII pozitif tespit edilmiştir. ELISA ile norovirüs pozitif bulunan bir örnek PCR ile negatif bulunmuştur. ELISA testinin real-time RT-PCR temel alınarak yapılan değerlendirmede testin duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %98 bulunmuştur. Bölgemizde görülen vakaların yaş, cinsiyet ve mevsim gibi özelliklere göre dağılım farklılığı göstermediği saptanmıştır.

Sonuç: Çanakkale ilinde ilk defa norovirus varlığı saptanmış olup ayrıca, RT-PCR yöntemi referans alınarak ELISA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü hesaplanmıştır. Duyarlılığı yüksek olmadığından akut vakalarda tek tek etkenin tespitinde ELISA yöntemi kullanımı tartışmalı olacaktır. Ancak salgın durumlarında pek çok vakada birden analiz uygulanacağından, salgında etken tespitinde ucuz ve özgüllüğü yüksek olduğundan etkin bir yöntem olabilecektir. Çanakkale'de sınırlı sayıda örnekte oldukça önemli bir oranda norovirüs saptanmış olması, bölgemizde ve belki de ülkemizde norovirüsün tahmin edilenden daha önemli bir etken olduğunu düşünmek için şimdiye kadar yapılan çalışmalara ek veriler de sağlanmış oldu.

Anahtar kelimeler: Çanakkale, ishal, norovirüs

ABSTRACT

**COMPARISON OF ELISA AND PCR METHODS IN
NOROVIRUS RESEARCH OF CASES WITH ACUTE
GASTROENTERITIS**

Diarrhea is a global health problem that affects approximately 1.5 billion people all around the world every year. Acute gastroenteritis is considered one of the common infections in the whole world, and they cause a serious public health problem, especially among children. In developing countries, acute gastrointestinal infection is responsible for a considerable part of child morbidity and health spending, secondly than respiratory tract infection. Rotavirus is mostly considered as the cause of acute diarrhea, while Norovirus is generally perceived as a factor leading to waterborne outbreak of gastroenteritis. Norovirus is a member of the family *Caliciviridae*, without envelope, having a diameter of 30-38 nm, an icosahedral capsid, and has a positive polarity-single-strand RNA. Incubation period of norovirus is 12-48 hours. Furthermore, the disease is characterized with vomit or diarrhea, or both of them, undergone in last 16-20 hour. Also, the ways transmission of infection for norovirus include fecal-oral route, contaminated food or water, vomit material in aerosol form, and contaminated environmental surfaces.

Purpose : There has been no norovirus cases reported in Çanakkale so far. Our province, Canakkale, is a cross-point by both land and water, which makes it easy for the importation of the agent with national and international transportation. It is aimed with this study that ELISA and PCR methods in norovirus to be compared, and the importance of norovirus can be determined as a causing factor for acute gastroenteritis cases.

Method : The study has been performed with the stool samples of the subjects making application to COMU Faculty of Medicine in Çanakkale, suspecting with gastroenteritis. In detail, 92 samples have been collected and all of them have been examined with commercial ELISA kit to find antigen, and with real-time RT-PCR method to find nucleid acid.

Findings : With ELISA, it has been found 10.9% (10/92) positive sample, and 89.1% (82/92) negative sample. Four samples have been exempted due to negative result for internal control according to real-time RT-PCR, and the evaluation has been made with the samples of 88. With PCR, 15 samples has been found as norovirus-positive, one of which as GI-positive, and the fourteen as GII-positive. One sample found norovirus-positive with ELISA, has been determined as negative with real-time RT-PCR. Accordingly, the evaluation of ELISA based on real-time RT-PCR has been indicated that the sensitivity is 60%, and the specificity is 98%. We found that cases seen in our region doesn't show distribution differences for age, gender and season features.

Result : The existence of norovirus in Çanakkale has been detected for the first-time. Besides, the sensitivity and specificity of ELISA method has been calculated by using real-time RT-PCR method as reference. At acute cases, it would be arguable to use ELISA because of the low sensitivity of the method. ELISA could be an effective method during multiple analysis at outbreaks, while of its being cheap and high specificity. Since we detected remarkable norovirus positivity from limited number of samples in Çanakkale, our study makes us think that norovirus may be a more important pathogen than it's estimated in our region and country. Also we provide extra datas to studies that has been done so far.

Keywords : Canakkale, diarrhea, norovirus

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER	iv
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Norovirusün sınıflandırılması ve özellikleri	4
2.3. Patogenez ve İmmunite	5
2.4. Klinik Bulgular	6
2.5. Norovirusun Tanısı Özgül Tanı Yöntemleri	7
2.5.1. Elektron Mikroskopik İnceleme	8
2.5.2. Antijen Arama	9
2.5.3. Antikor Arama	9
2.5.4. Moleküler Teknikler	10
2.6. Norovirusün Epidemiyolojisi	11
2.7. Tedavi ve Korunma	15

3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Dışkı Örneklerinin Toplanması	17
3.2. Dışkı Örneklerinin Çalışılması	17
3.2.1. Dışkıda Norovirüs Antijenin Saptaması Testi ELISA Yöntemi	17
3.2.2. Dışkıda RT-PCR Yöntemi ile Norovirüs Aranması	19
3.2.3. İstatistiksel Yöntem	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇLAR	38
7. KAYNAKLAR	40

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
EIM	Enzim immunoassay
ELISA	Enzim bağı immunosorbent assay
dk	Dakika
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
EM	Elektron mikroskobu
IgA	İmmunoglobulin A
IgG	İmmunoglobulin G
IgM	İmmunoglobulin M
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Rotation per minute
RT-PCR	Reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
sn	Saniye
slgA	Salgısal IgA
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre

ŞEKİLLER

ŞEKİL 1. Norovirüsün, transmisyon elektron mikroskopunda görüntüsü	8
ŞEKİL 2. 3. Jenerasyon Ridascreen Norovirüs Kiti	18
ŞEKİL 3. Norovirüs çalışmasında görülen pozitif ve negatif örnekler	19
ŞEKİL 4. RealStar Norovirus RT-PCR Kit 2.0 kiti	20
ŞEKİL 5. Norovirüs GI	25
ŞEKİL 6. Norovirüs GII	26

TABLolar

Tablo 3.1. RealStar Norovirüs RT-PCR Kit 2.0 kit içeriği	22
Tablo 3.2. Master miks hazırlama tablosu	23
Tablo 3.3 Bir örnek için reaksiyon hazırlama	24
Tablo 3.4. PCR protokolü	24
Tablo 3.5. Analiz tablosu	25
Tablo 4.1. Hasta cinsiyet tablosu	27
Tablo 4.2. Hasta yaş dağılımı tablosu	27
Tablo 4.3. ELISA sonuçları	28
Tablo 4.4. Yaş gruplarına göre ELISA sonuçlarının dağılımı	28
Tablo 4.5. PCR sonuçları	29
Tablo 4.6. Yaş gruplarına göre PCR sonuçlarının dağılımı	29
Tablo 4.7. ELISA VE PCR sonuçlarının karşılaştırılması	30
Tablo 4.8. Hastaların aylara göre dağılımı	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut gastroenterit insanlarda en yaygın hastalıklardan biridir. Bakteriyel, paraziter, viral etkenler gastroenterite sebep olur (1). Viral gastroenterit salgınları genellikle rotavirüsler, astrovirüsler, adenovirüsler ve insan calicivirüsleri (norovirüs ve sapovirüs) ile ortaya çıkabilir (2). Dünyadaki gıda kaynaklı salgınların yaklaşık %28'inden norovirüs enfeksiyonları sorumludur (3). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda tüm gastroenterit salgınlarının yaklaşık %50'sinden (%36-59) norovirüs sorumlu tutulmaktadır (4).

Akut gastroenteritler tüm dünyada yaygın olarak görülen enfeksiyon hastalıkları arasında yer almakta ve ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır, özellikle çocuklar hastalıktan etkilenen grupta yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde akut barsak enfeksiyonları, solunum yolları enfeksiyonlarından sonra çocuk morbititesinin ve sağlık harcamalarının önemli bir kısmını teşkil etmektedir (5). Akut gastroenterit, gelişmiş ve gelişmekte olan tüm ülkelerde olduğu gibi bizim ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunudur (6). Dünya'da en sık akut diyare etkeni olarak rotavirüs görülmekte iken akut su kaynaklı gastroenterit salgınlarının etkeni olarak da norovirüs sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (5, 7, 8).

İnsanlarda norovirüs enfeksiyonunun kuluçka süresi 12-48 saat olup, hastalık son 12-60 saat içerisinde oluşan kusma, ishal veya her ikisinin birlikte görülmesiyle karakterizedir (9, 10). Norovirüsün insandan insana yayılımı için bilinen geçiş yolları; fekal-oral yol, kontamine yiyecekler ve sular, kusma materyalinden aerosol oluşumu ile yayılım ve kontamine olmuş çevresel yüzeylerdir (11). Norovirusun çevresel yüzeylerden el ve parmaklar yoluyla bulaşması da laboratuvar çalışmalarında gösterilmiştir (12). Salgınlarda birincil olgular, sıklıkla fekal içerikle kontamine yiyecek ve çevresel maddelerle oluşurken ikincil olgular insandan insana geçiş şeklinde meydana gelmektedir (13). Dünyada yaygın görülen norovirüsler, tüm yaş gruplarında bakteriyel olmayan gastroenterit salgınlarının en önemli sebebidir. (14). Norovirüs gastroenteriti, gerek gelişmiş (% 4-30) gerekse gelişmekte olan ülkelerde (% 3-

25) benzer sıklıkta görülmektedir (15). Norovirüsler büyük çocuklar ve erişkinlerde salgınlar yapar. Norovirüs enfeksiyonlarının en çarpıcı özelliği semptomların hızlı başlaması ve hastalığın hızlı yayılmasıdır. Norovirüs gastroenteriti genellikle ani başlar, kliniği bulantı, kusma, sulu ishal ve kramp biçiminde karın ağrısı ile seyreder. Bazı hastalarda sadece kusma görülebilir ve bu sebeple hastalığa önceleri “winter vomiting disease; kış kusma hastalığı” da denmiştir (16). Hastalık genellikle 12-48 saat süren kuluçka döneminden sonra başlar. Erişkinlerde ishal, çocuklarda kusma daha yaygın görülür. Halsizlik, hafif ateş, seyrek olarak da baş ağrısı görülebilir. Dışkı genellikle kan, mukus veya lökosit içermez. Dışkılama sıklığı günde ortalama 4-8 kez olup, orta miktarda dışkılama yapılır. Klinik belirtiler genellikle 24-72 saat sürer ve kendi kendini sınırlar, kronik enfeksiyona neden olmaz. Hastaneye tedavi için yatırmak nadiren gerekir ancak ciddi dehidratasyon, özellikle malnutrisyonlu çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi zayıf hastalarda gerekebilir (4, 17).

Gastroenterit salgınları sırasında etkenin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Norovirüs enfeksiyonunun laboratuvar tanısında, hücre kültürü ve deney hayvanları modeli geliştirilememiştir. Bu nedenle, norovirüs tanımlanması için birçok alternatif yöntem kullanılmıştır (18). Bu amaçla en çok elektron mikroskopi (EM), reverse transcription PCR (RT-PCR) ve “in-house” ELISA yöntemlerinden yararlanılmıştır (1, 19). EM yönteminin dışkıda duyarlılığı düşük olup (dışkının 1 gramında yaklaşık 10^6 virus partikülü varlığında saptama mümkün olabilmektedir), iyi yetişmiş bir uzman ve donanıma ihtiyaç vardır. ELISA ise, çok özel donanım gerektirmeyen çalışılması kolay bir yöntem olup, başarısı yeterli ve uygun miktarda norovirüs antijenlerinin varlığına bağlı olup duyarlılığı düşüktür (20). Günümüzde, norovirüsün moleküler tanısında RT-PCR teknolojisi veya bu metodun farklı varyasyonları olan gerçek zamanlı veya multipleks gerçek zamanlı RT-PCR protokolleri kullanılmaktadır (4, 20). Bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü son derece yüksek olmakla birlikte, iyi yetişmiş bir uzmana ve karmaşık ve pahalı bir cihaz olan “real-time” ısı döngü ekipmanına ihtiyaç vardır. Son yıllarda, norovirüsün moleküler ve serolojik tanısı için ticari kitler piyasada yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde norovirüs salgınlarında, en üst düzeyde laboratuvar performansını yakalamak için en az

iki farklı metodun kombine olarak kullanılması önerilmekte ve PCR ve ELISA kombinasyonunun en iyi sonuçları verdiği belirtilmektedir (19). Bruin ve arkadaşları 158 olgudan RT-PCR ile pozitif tespit edilen 74 (%47)'ünü, "Southern blot" ve sekans (nükleotid dizileme) yöntemlerini kullanarak doğrulamışlardır. Bu sonuçlar ile RT-PCR yönteminin norovirüs tanısında "altın standart" olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (20).

Literatürde yaptığımız arama sonucunda, Çanakkale ilinde hiç norovirüs vakası bildirilmediği tespit edilmiştir. İlimiz hem kara hem de su yolu olarak bir geçiş noktası olup, ulusal ve uluslararası olarak etkenin ilimize taşınmasının çok büyük bir olasılıkta olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışma ile norovirüs araştırılmasında ELISA ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması, Çanakkale ilinde akut gastroenteritli olgularda norovirus varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Sonuçta, ilimizde etkenin varlığı ve önemi hakkında veri elde edilmesi hedeflenmiştir. Norovirüs laboratuvar analizlerinde ELISA kolay ve daha ucuz bir yöntemdir, PCR altın standart yöntem olarak kabul edilse de, ELISA'nın tanıdaki yeri hakkında birbirinden çok farklı veriler bulunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Norovirüsler (NoV), ilk defa Amerikan'ın Ohio eyaletinde Norwalk'taki bir ilkokulda 1968 yılında ortaya çıkan akut gastroenterit vakalarındaki dışkı örneklerinin 4 yıl sonra elektron mikroskopisinde incelenmesinde tanımlanmış ve 'Norwalk virus' olarak isimlendirilmiştir (17, 21).

Daha sonraki salgınlarda Montgomery County, Snow Mountain, Mexico, Hawaii, Jena, Taunton ve Toronto virüsleri olarak salgın yaptıkları bölgenin adıyla isimlendirilmişlerdir. Daha sonra ilk salgın yaptığı yerin ismi ile 'Norwalk-like virus' olarak tanımlanmış, elektron mikroskopisindeki düzgün görünümüleri nedeniyle 'küçük yuvarlak yapılı virüsler' (small round structured viruses-SRSV) olarak adlandırılmış, en son ise Uluslararası Virüs Taksonomisi tarafından 'Norovirus' olarak isimlendirilmiştir (22, 23).

2.2.Norovirusün sınıflandırılması ve özellikleri

Norovirüsler *Caliciviridae* ailesinde bulunan 30-38 nm büyüklüğünde, ~7,5 kb tek iplikli RNA genomu içeren, zarfsız, küçük, pozitif polariteli, kübik simetrikli ikozahedral viruslardır (24, 25). *Caliciviridae* ailesi Vesivirüs, Lagovirüs, Norovirüs, Sapovirüs, Nebovirüs olmak üzere beş genustan oluşmaktadır (26). Norovirüs viral kapsidlerinin filogenetik analizine göre 5 farklı genogruba GI, GII, GIII, GIV, GV olarak kendi içinde ayrılmıştır (27). Her genogrup sekans benzerliği analizi, filogenetik analizi, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi yöntemlerle 5 genogrub, çoğunluğu GI ve GII genogrubuna (GI.1-8, GII.1-21, GIII.1-3, GIV.1-2, GV.1) ait olmak üzere 35 alt genotipe ayrılmaktadır (4, 28). GI, GII, GIV genogrubları insanlar için patojen olup GIII ve GV hayvanlar için patojendir (29). GII genogrubu insanlarda patojen olmakla beraber domuzlarda da GII.11, GII.18, GII.19 genotipleri bulunmuştur (30, 31). Bir çalışmada ise köpektен GIV ait yeni bir genotip bulunmuştur (29). Norovirüsler insan dışında deniz memelileri, domuz, sığır, kedi, tavşan, köpek, fare, aslan gibi hayvanlardanda izole edilmişlerdir (17, 30). İnsan ve domuz norovirüslerinin arasındaki yakın genetik ve antijenik ilişkiler zoonotik iletim ile

yeni insan salgın türlerinin ortaya çıkması için rezervuar potansiyelleri kaygılara yol açmaktadır (31). Ayrıca insan norovirüslerinin deneysel koşullar altında primatlar ve domuzları enfekte ettiği gösterilmiştir. Buna rağmen bir hayvandan insana zoonotik iletim rapor edilmemiştir (32).

Akut gastroenterit salgınlarından en sık izole edilen norovirüs genogrubları GI ve GII olmakla birlikte GII.4 genotipi dünyada ve ülkemizde norovirüs salgınlarından ve akut gastroenteritli vakalardan tanımlanan en yaygın olan genotiptir (33, 34).

Norovirüs genomu yaklaşık 7500 nükleotid içeren tek iplikli RNA yapısında, üç açık okunan bölge (Open reading frame-ORF) şeklinde organize olmuştur, bunlar yapısal olmayan proteinleri kodlayan ORF1, kapsid proteinlerini kodlayan ORF2 ve minör yapısal proteinleri kodlayan ORF3' tür. Yapılan kriyoelektron mikroskopik ve X-ray kristalografik çalışmalar norovirüslerin 180 kapsomerden meydana gelen, 90 ikili (dimeric) kapsomerin oluşturduğu T=3 ikozahedral kapsid simetrisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Her kapsid proteini kabuk (Shell-S) ve çıkıntı (Protrusion-P) olarak iki temel bölümden meydana gelir. P bölümünde iki alt bölümden oluşur (P1 ve P2), P2 alt bölümü kapsid proteininin en değişken bölgesi olup, norovirüslerin reseptöre tutunma ve antijenik özelliklerinden sorumludur (17, 25, 35).

Norovirüsler zarfsız olduğu için zarflı virüslere göre daha dayanıklı olup eter, alkol, sirke, aseptik el solüsyonları ve ısıya dirençlidir. Isıtmaya 60 °C'de yarım saat, pH 2-7'e 3 saat dayanır, kuruluğa, donmaya ve kloro da nispeten dirençlidir (17, 36).

2.3. Patogenez ve immunité

Norovirüs çok bulaşıcı olup enfeksiyonun gelişmesi için 10-100 kadar virüs partikülü yeterlidir. Norovirüsler başlıca fekal-oral yolla bulaşır. Kontamine yiyecek ve su veya kişiden kişiye direk bulaşabilir, çevre ve eşya kontaminasyonu da enfeksiyon kaynağı olabilir. Kusmadan kaynaklanan aerosolların damlacık yoluyla oral mukozaya girmeleride bulaşma nedenlerinden biridir (37). Norovirüs vücuda ağız yolundan girdikten sonra midedeki asitten etkilenmeden ince bağırsağa geçerek buradaki mukozada viral

replikasyonunu gerçekleştirmektedir. Üreme sonucunda ince bağırsak enterositlerinde hasar gelişerek villuslarda düzleşmeler görülmektedir. Gönüllü yetişkinlerde yapılan virüsün yutulması sonrasında proksimal intestinal biyopsi örneklerinde histolojik değişiklikler görülmüştür. Bunlar genişleyip düzleşen villiler, kript hiperplazisi, sitoplazmik vakuolizasyon ve lamina propria'daki polimorf nükleer ve mononükleer hücrelerdir (17, 38, 39). Son zamanlarda ABO, Lewis doku kan grubu antijenleri noroviruslerin reseptörleri olarak tanımlanmıştır (40).

İshalin mekanizması geçici D-ksiloz, laktoz ve yağın emilim bozukluğu, alkalin fosfataz ve trehalaz gibi fırçamsı kenar enzimlerinin aktivitelerindeki düşüştür. Ancak kusmanın oluşum mekanizması bilinmemekle birlikte midenin boşalım zamanı uzamıştır (37, 39).

Norovirüse immün yanıt henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan araştırmalarda enfeksiyonu geçirmiş kişilerin 4-6 ay içinde aynı virüsle tekrar enfekte olmadığı gösterilmiştir, ancak enfeksiyonu geçirmiş olmak farklı genotiplere karşı enfekte olmayı engellememektedir. Enfeksiyon vücutta IgG, IgM ve IgA antikorları oluşturur. IgA ve IgM pikleri genellikle 2 haftada oluşmakta ve IgG'den önce meydana çıkmaktadır. IgM seviyeleri genellikle 2-4 ay içinde, IgA ise yaklaşık 3 ay sonra kaybolmaktadır. Yapılan çalışmalara göre IgM yeni geçirilen enfeksiyonu göstermektedir (17, 37). Enfeksiyon sonrası bağışıklık yaklaşık 6 ay ile 2 yıl arasında sürmekte ve sonra aynı etkenle tekrar karşılaştıklarında yeniden enfeksiyonu geçirmektedirler (41).

Norovirüsler hasta kişilerle direkt temas yoluyla geçebildiği gibi, hasta kişilerin çıkartıları ile bulaşı olan su ve gıdalarla da yayılabilmektedir (42).

2.4. Klinik bulgular

Norovirüsün kuluçka süresi yaklaşık 1-2 gün arasında olup bulantı, kusma ve sulu diare gibi semptomlar görülmektedir. Diyare, kusma, abdominal ağrı, kramp, halsizlik, düşük ateş gibi tipik semptomları olan norovirus enfeksiyonu genellikle kısa sürede kendiliğinden geçmektedir (11, 43). Klinik bulgular 2-3 gün içinde geçse de hastalar dışkıda virüs yaymaya 8 haftaya kadar devam edebilmektedirler (43). Yetişkinlerde genellikle mukussuz, kansız,

sulu ishal görülürken çocuklarda bulantı, kusma karın ağrısı daha sık görülmektedir (38).

Kusma sık görüldüğü için bu sebeble hastalığa önceden 'winter vomiting disease' (kış kusma hastalığı) denilmiştir. Son yıllarda medyada norovirüs kaynaklı enfeksiyonlara mide gribi (Gastric flu) tabiri de sık kullanılmaktadır (44). İshalli hastalarda dışkı lökosit, eritrosit ve mukus içermez. Kansız, mukussuz, yumuşak ve sulu kıvamda günde 4-8 kez dışkılama görülür. Enfekte insanların gastroenterite ek olarak yaklaşık %25-50 sinde baş ağrısı, üşüme, titreme, hafif ateş ve kas ağrısı görülebilmektedir (17, 38). Olguların yaklaşık üçte biri herhangi bir klinik bulgu göstermeden enfeksiyonu asemptomatik olarak geçirmektedir (45).

Norovirüs enfeksiyonu kendi kendini sınırlamakta ve hastaların çoğunluğu sekelsiz bir şekilde iyileşmektedir ancak altta yatan hastalığı olan immun suprese hastalar, yaşlı ve küçük çocuklarda enfeksiyon daha ağır seyretmekte ve nadir de olsa ölüm görülmektedir (46).

2.5. Norovirüsün tanısı ve özgül tanı yöntemleri

Norovirüslerin tanısı ve epidemiyolojik çalışmalar için örnek toplanmasına hastalığın ilk gününden itibaren başlanmalıdır. Bu amaçla dışkı, kusmuk, serum, su ve gıdalar incelenebilmektedir. Norovirüsün doğru tanımlanması için örneklerin diyarenin başlangıcından itibaren yedi gün içinde toplanması gerekmekte olup duyarlılık daha sonra düşmektedir. Örneklerin geç toplanması, elverişsiz saklama koşulları çalışılan yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü değiştirmekte ve araştırma sonuçlarını etkileyebilmektedir (47).

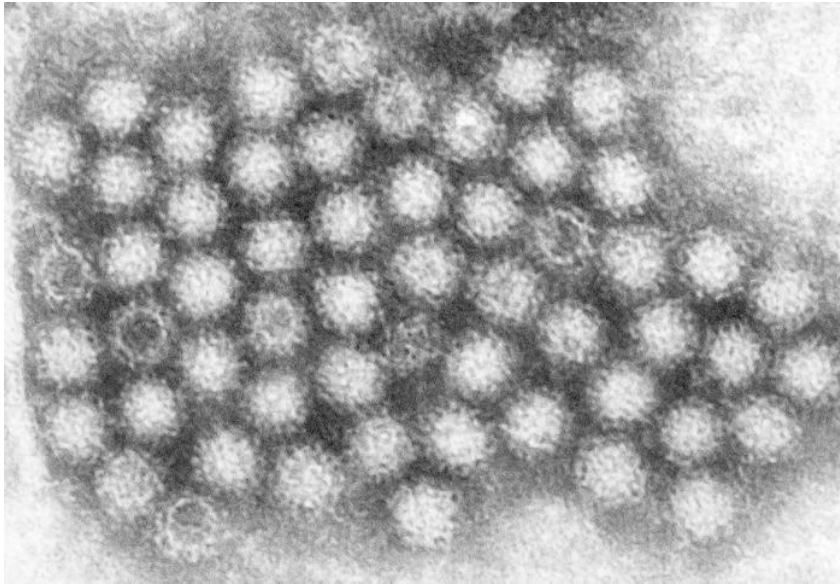
Norovirüsler hücre kültüründe üretilmediği ve deney hayvanları modeli geliştirilemediği için tanıda diğer yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Norovirüsler ilk kez 1972 yılında elektron mikroskopisinde tanımlanmış olup şimdi tanıda elektron mikroskopisinin yanında 'Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction' (RT-PCR) ve in-house 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay' (ELISA) yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden RT-PCR en duyarlı tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (20,

48). Son yıllarda ticari ELISA kitleri de geliştirilmiştir, hatta kaset formatında immunokromatografik testler de piyasaya sürülmüştür.

2.5.1. Elektron mikroskopik inceleme

Dışkı örneklerinin elektron mikroskopuyla incelenmesi zahmetli, nisbeten duyarlılığı düşük, yoğun emek gerektiren ve enfeksiyonun başlangıcından itibaren 2-3 gün içinde saptanabilen virüslerin morfolojik olarak görünümüne dayanan bir yöntemdir (49). Elektron mikroskopisi bir gram dışkı örneğinde yaklaşık 10^6 virüs partikülünü saptama sınırına sahip olup iyi bir donanım ve deneyimli personele ihtiyacı bulunmaktadır (20). Norovirüsler elektron mikroskopunda, yuvarlak ve dış yüzeyinden içe doğru çukurlu bir yapıda kupa veya fincan formunda olmasıyla ayırt edilebilmektedir (Şekil 1.), (1,17). Enfeksiyonun başlangıcında tercihen ilk iki günde yaklaşık 1-10 gram kadar dışkı örneği alınmalıdır. Rektal sürüntü örnekleri yeteri kadar virüs içermeyeceğinden inceleme için tercih edilmez. Bir hafta içinde incelenemeyecek örnekler -70°C ' de saklanmalıdır (50).

İmmun elektron mikroskopisinde virüsün tespitini kolaylaştırmak için antiserum kullanılmakta ve bu antiserum ile dışkı süspansiyonundaki virüsler bir araya toplanmakta ve virüslerin daha kolay tespitini sağlamaktadır (51).



Şekil 1. Norovirüsün, transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) görüntüsü (CDC; Charles D. Humphrey, <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=10704>)

2.5.2. Antijen arama

ELISA yöntemleri genellikle çok karmaşık olmayan uygulaması kolay yöntemlerdir. ELISA'da saptama sınırı yaklaşık bir gram dışkı örneğinde 10^4-10^6 viral partikül olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntem ile norovirüsün kapsid proteini yani antijeni saptanabilmektedir (1, 52).

RT-PCR norovirüs tanısında altın standart olarak kabul edilse de, çalışmadaki zorluklar yüzünden alternatif testler geliştirilmesi gerekli olmuştur. Rekombinant kapsid antijenleri dışkı örneklerinde bulunan gerçek virüslere morfolojik olarak benzerdir ve rekombinant antijenlerinin çoğu Baculovirus'te eksprese edilen viral kapsid antijenlerine dayanır. Rekombinant kapsid antijenleri ile immunize hayvanlardan elde edilen hiperimmun serumun kullanıldığı sandviç formatındaki ELISA, dışkı örneklerindeki viral antijenlerin tespiti için geliştirilmiştir (37). Antijen saptayan, rekombinant kapsidlere karşı artırılmış hiperimmun antiserumların kullanımına dayanan enzim-bağlı immunsorbent yöntemler genellikle tipe özgü olup aynı veya genetik olarak benzer suşları saptayabilmektedir (49).

2.5.3. Antikor arama

Norovirüs için serumda antikor aranırken özellikle yetişkin hastalar önceden virüse karşı antikor geliştirebilecekleri için tek serumda değil akut ve konvelesan faz olarak 2 kez serum örneği çalışılıp antikor titresinde 4 katlık artışı saptamak gerekir. Rekombinat antijenlerin kullanıldığı antikor yanıtını saptayan Enzyme Immunoassay (EIA)'ler IgG, IgM, IgA serolojik yanıtlarını tanımlamak için geliştirilmiştir. Enfeksiyondan yaklaşık 8-11 gün sonrasında norovirusa özgü IgA ve IgG titrelerinde önemli bir artış görülmekte ve IgG antikorun titresini ise enfeksiyonun ilk beş gündeki akut dönemdeki ile 3-6 hafta sonraki dönemde 4 katlık bir artış olmaktadır. Norovirüse özgün IgM antikorları ise 2 hafta içerisinde saptanmaktadır (1, 38). Az sayıda olan çalışmalarda sIgA dışkıda enfeksiyon için belirteç olarak kullanılmış, ancak gönüllülerde yapılan yeni bir çalışmada oral olarak norovirüs alındıktan sonra sIgA düzeyinde anlamlı bir artış tespit edilememiştir (53).

2.5.4 Moleküler teknikler

RT-PCR ve nükleik asit hibridizasyon yöntemleri norovirüs genomunun klinik ve çevre örneklerinden saptamada ve salgın araştırmalarında en duyarlı yöntemlerdir. Norovirüs salgınlarını tanımlamak için kullanılan RT-PCR altın standart olarak kabul edilmektedir (49).

Hibridizasyon yöntemleri EIA yöntemlerine benzer olarak 1 ml fekal örnekte en az 10^4 - 10^5 viral partikül olduğunda saptayacak kapasitede olup RT-PCR yöntemleri ise daha az sayıda virüs miktarını örneğin 10 genomik kopyayı saptayabilmektedir (1, 54). RT-PCR yöntemi dışkıının yanında kusmuk, salgına sebep olabilecek su, gıda ve deniz ürünlerinde de tanı için kullanılabilir (28).

Şu anda en yaygın kullanılan yöntem tanı için RT-PCR'dir ve bunun modifikasyonları geliştirilmekte ve duyarlılığı ve özgüllüğü artırılmaya çalışılmaktadır. Bu yöntemler real time RT-PCR ve multipleks real time RT-PCR olup çalışmalarda kullanılmaktadır. Bazı çalışmalar real time RT-PCR yönteminin geleneksel RT-PCR yönteminden daha duyarlı ve hızlı olduğunu göstermektedir (43).

Real-time PCR'da hedefin amplifikasyonu ve tespiti aynı tüpte eş zamanlı olarak oluşmaktadır. Amplifikasyon platosu her bir siklusta raportörden kaynaklanarak cihaz tarafından okunan floresan sinyali göstermektedir. Siklusun başında floresan sinyalde küçük değişiklikler olmaktadır. Bu başlangıç sinyal seviyesi plato için baz çizgisi olarak tanımlanır. Baz çizgisi üzerinde oluşan artışlar biriken PCR ürünlerini göstermektedir. Siklus eşik değeri (Cycle Threshold, C_T) belirli bir eşiği aşan floresansın siklus sayısı olarak tanımlanır. Örnekteki nükleik asit konsantrasyonu C_T ile ters orantılıdır. Nükleik asit konsantrasyonu ne kadar yüksek ise C_T o kadar düşük olur. Bu yöntemde reaksiyon, test inhibitörlerine daha az duyarlıdır. Real-time PCR reaksiyonun erken safhalarından itibaren saptama yapabilmeye imkan sağladığı için geleneksel PCR'a göre büyük avantaj sağlar (24).

2.6. Norovirüsün epidemiyolojisi

Norovirüs epidemik gastroenteritlerin dünyadaki en sık nedeni olarak viral gastroenteritlerin %90'ın üzerinde etken olup tüm gastroenteritlerin ise yaklaşık %50'sinin nedeni olarak bildirilmektedir (55). Norovirüs salgınları genellikle yıl boyunca görülmekle birlikte bazen mevsimsel salgınlar da yapmaktadır. Salgın şekilleri dünyanın kuzey ve güney yarıkürelerinde farklılık göstermekte olup kuzey yarıkürede salgınlar daha çok kış ve ilkbahar aylarında görülmektedir ve bu yüzden 'kış kusma hastalığı' olarak bilinmektedir. Güney yarıkürede ise salgınlarla daha çok ilkbahar ve yaz aylarında karşılaşmaktadır (38).

Norovirüs salgınları son yıllarda daha çok önem kazanmakta ve buna yönelik araştırmalar ülkemizde de olduğu gibi artmaktadır. Norovirüs salgınlarından daha çok GI ve GII genogrupları sebep olmakta bunların içinden de en sık olarak GII.4 genotipi bu salgınlara sebep olmaktadır. GII genogrubundan sonra GI görülmekte nadir olarak GIV salgınlarda saptanmaktadır (34, 36).

Norovirüsün etken olduğu akut gastroenteritler gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ve her yaş grubunda görülmekte olup daha az olarak sporadik, çoğunlukla epidemik bazen ise pandemik olarak yayılmaktadır. Hastalıkları önleme ve kontrol merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), dünyada 1996-2000 yılları arasında oluşan 348 norovirüs salgınında bulaşmanın %39 gıda kaynaklı, %12 insandan insana, %3 su kaynaklı olduğunu belirtmiştir. Büyük salgınların ortaya çıkmasının en önemli nedeninin dışkı bulaşmış su şebekeleri olduğu anlaşılmıştır (38). CDC' nin araştırma raporlarına göre salgınların olduğu bulaşma alanları lokanta ve hazır yemek satan yerler %36, bakımevi ve hastaneler %29, okul ve çocuk yuvaları %12, yolcu gemileri ve oteller %10 diğer yerler ise %9 olarak tespit edilmiştir (52).

Norovirüsün birincil bulaş yolu fekal-oral yoldur, virüs enfekte kişilerin dışkısında ve kusmuğunda bulunur. Çok düşük miktardaki enfektif dozu yaklaşık 10-100 kadar norovirüs virionu enfeksiyon için yeterli olmaktadır. Norovirüsün kusmayla havaya aerosol şeklinde yayılıp hava yoluyla yayılması mümkün olup kontamine yüzeyler, cisimler ve doğrudan insanla temasla da

bulaşma meydana gelmektedir (11). Toplum kökenli gastroenteritlerin önde gelen nedenlerinden biri olan norovirüsler okullar, hastaneler, kamplar, lokantalar, hapishaneler, bakımevleri, yurtlar, askeri birlikler gibi kişilerin bir arada yoğun olarak bulunduğu ortamlarda meydana gelen salgınların en yaygın sebeplerinden biridir (56, 57).

Norovirüsle gelişen gıda kaynaklı gastroenteritler en çok görülen salgın sebeplerinden biri olup kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ile meydana gelmektedir. ABD’de tüm gıda kaynaklı gastroenterit salgınlarının yaklaşık %50’sinden norovirüs sorumludur. Gıdaların kontaminasyonu ise enfekte personelin gıdayı kontamine etmesi, kontamine olmuş ekipmanların kullanılması, gıdaların kontamine olmuş yüzeylere teması ile olmaktadır. En sık salgın sebebi olan yiyecekler ise salatalar, salata sosları, sandviçler, donmuş gıdalar, sıvı gıdalar, kremalar ve kabuklu deniz hayvanlarıdır. Su kaynaklı olan norovirüs salgınları ise su şebekesi ve tesisleri, kuyu ve havuz gibi yerlere kanalizasyon suyu karışması sonucu meydana gelmektedir (16, 37, 58).

Ülkemizde bir kaç yıl önce İstanbul’da gıda maddelerinin norovirüs ile kontaminasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada norovirüs GI ve GII araştırılmıştır. Bu çalışmada hazır yemek, domates, yeşil soğan, marul ve karışık salata gibi 525 gıda maddesi norovirüs GI ve GII yönünden RT-PCR ile analiz edilmiş, 1 yeşil soğanda ve 1 domateste olmak üzere 2 örnekte norovirüs GII pozitif bulunmuştur (59). Yine İstanbul’da 2008-2009 yıllarında boğazdan toplanan midyelerden norovirüs araştırılmasında %4.5 (5/110) oranında RT-PCR kullanılarak norovirüs GII pozitif bulunmuştur (60).

Ülkemizde 2008 yılına kadar bakteriyel olmayan gastroenteritlerle ilgili sürveyans sistemine sahip olmadığı için 2008 yılına kadar salgın şeklinde norovirüs enfeksiyonu bildirim yapılmamıştır (61).

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’nde yapılan iki uzmanlık tezi çalışmasında norovirüslerle ilgili ilk çalışmada RT-PCR ile erişkinde %13, çocuklarda %27 oranında norovirüs pozitifliği bulunmuş (62), diğer uzmanlık tezi çalışmasında pediatrik nozokomiyal ishallerde norovirüs pozitifliği %6.9 oranında bulunmuştur (63).

Altıncı ve arkadaşlarının gastroenteritli çocuklarda Kasım 2006 ile Haziran 2007 arasında yapmış oldukları Afyon bölgesindeki norovirüs çalışmasında örneklerin %17'sinde (15/88) norovirüs pozitifliği bulmuşlardır. Yapılan dizi analizine göre suşların çoğu GIIb/Hilversum, birer tanesi ise GII.4/2006a ve GII.6 olarak tanımlanmıştır (64).

Aksaray ilinde 2008 yılının mayıs ayında başlayan ve Kırşehir, Şereflikoçhisar ve Adana bölgelerini etkileyen gastroenterit salgınında toplanan 50 örnek Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı'na gönderilmiş ve burada real-time PCR ve ELISA testleri ile çalışılmıştır. ELISA testinde %26 (13/50) pozitiflik, real-time PCR ile 10 örnek uygun olmadığı için çalışılmamış %33 (13/40) norovirus pozitifliği bulunmuştur. Real-time PCR ile saptanan örneklerin 9 tanesi GI kalan 4 tanesi ise GII genotipi olarak tespit edilmiştir. Sağlık Bakanlığı 2008 yılının mayıs ayında Aksaray ilinde başlayan bu salgının Türkiye'deki ilk norovirüs salgını olduğunu resmi olarak açıklamıştır (61).

2009 yılında akut viral gastroenteritlerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan 11 ilden toplanan farklı zaman dilimlerinde alınan 69'u kadın, 78'i erkek 147 dışkı örneği Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB), Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü (SHAM), Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı (VRAL)'nda incelenmiştir. Laboratuvara gelen her örnek norovirüs Genotip I ve II (GI, GII), rotavirüs, adenovirüs ve astrovirüs açısından incelenmiş ve en sık saptanan viral etken norovirüs, özellikle de Genotip II olmuştur. Örneklerin %9.5'i (14/147) Genotip I, %29'u (43/147) örnekte Genotip II norovirüs pozitifliği saptanmıştır. Rize, Çanakkale, Karaman ve Manisa illerinden gelen dışkı örneklerinde norovirüs saptanmamış, Balıkesir, Tokat, Kocaeli, Tunceli, Kastamonu, Ordu ve Sivas illerinden gelen örneklerde norovirüs pozitifliği saptanmıştır (65).

Mart-Nisan 2009 tarihlerinde Tokat ilinde meydana gelen ve binlerce kişiyi etkileyen gastroenterit salgınında etken olarak C. jejuni ve norovirüs bulunmuştur. Bu salgın sırasında 7800 gastroenterit şikayetiyle sağlık

merkezlerine başvurmuş ve 24 hastaya ait dışkı örnekleri incelenmiş 8'inde C. jejuni, 11'inde RT-PCR ile norovirüs saptanmıştır (66).

Özkul ve arkadaşlarının İstanbul'da 2008-2009 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ve Haseki Hastanesi'nde 82'si kadın, 156'sı erkek 238 akut gastroenteritli çocukta yaptıkları çalışmada %15.1 (36/238) norovirüs GII pozitif bulunmuştur (34).

Trabzon ili Sürmene ilçesinde Temmuz 2010 yılında başlayan norovirüs salgınında ilk gün 271 olan vaka sayısı 2. gün 880 ulaşmış ilk günden alınan önlemlerle vaka sayısı hızla azalmaya başlamasına rağmen kişiden kişiye bulaş özelliği nedeniyle ancak 10. gün sonrasında beklenen seviyelere inmiştir. Salgın süresince 2483 akut gastroenterit vakası sağlık kurumlarına başvurmuştur. Ankara RSMHB'na gönderilen örneklerin incelenmesi sonucunda hastalık etkeninin norovirüs olduğu tespit edilmiştir. Salgının nedeni olarak içme suyu tankının klor seviyesinin düşmesi ve bu dönemde yeni kullanılmaya başlanan bir kuyu pompasından kaynaklandığı tespit edilmiştir (67).

Brezilya, Rio De Janerio'da 2005-2008 yılları arasında yapılan 4 yıllık norovirüs enfeksiyonlarının sürveyans çalışmasında akut gastroenterit olgularında 1687 örneğin 324 tanesi rotavirüs pozitif çıktığı için çalışma dışı bırakılmış, kalan 1367 örnekten 1087'si norovirüs için test edilmiş ve bu hastaların 267'si sağlık merkezlerine ayaktan başvuran olgular olup, 820'si ise kamu hastanelerinde yatarak tedavi gören hastalardır. Yatan hastaların %30.2 (248/820), ayaktan hastaların %49.8 (133/267) olmak üzere, toplamda %35.1 (381/1087) oranında norovirüs pozitif sonuç bulunmuştur (27).

ABD'de ortalama her yıl norovirüs 19-21 milyon kişide akut gastroenterite neden olur ve öncelikle küçük çocuklarda 1.700.000-1.900.000 poliklinik ve 400.000 acil servise başvuruya yol açar. Çok küçük çocuklar ve yaşlılar arasında 56.000-71.000 arasında hastaneye yatış ve 570-800 arasında ölüme yol açar (68).

ABD ve diğer gelişmiş ülkelerde norovirüs salgınları için uzun süreli bakım evleri ve hastaneler gibi sağlık tesisleri en sık salgın görülen yerlerdir. ABD'de 1999-2007 yılları arasında Oregon'da, 275 norovirüs salgınında yapılan

bir araştırmada en sık %55 ile uzun süreli bakım evleri ilk sırayı almış daha sonra %15 restoranlarda , %4 okullarda, %4 hastanelerde, %3 konutlarda, %2 kamplarda, %1 cezaevlerinde, %16 diğer yerlerde görölmüştür (47).

2.7.Tedavi ve korunma

Norovirüs gastroenteriti genellikle herhangi bir tedavi gerektirmeden kendiliğinden iyileşir. Norovirüs enfeksiyonunu tedavi etmek için herhangi bir antiviral tedavi yöntemi henüz bulunmamakla birlikte mevcut koruyucu bir aşısı da yoktur. Hücre kültürünün olmaması, norovirüs için antiviral ilaçların geliştirilmesinin önünde bir engel teşkil etmiştir. Enfeksiyonun tedavisi destek tedavisinin yapılmasıdır, izotonik sıvılarla kaybedilen sıvıların yerine konması ve dehidratasyonun engellenmesidir. Norovirüs gastroenteriti olan kişilerin yaklaşık %10'u dehidratasyon için oral veya intravenöz sıvı tedavisi alması gerekebilir (4, 39, 43). Baş ağrısı, kas ağrısı, kusma, bulantı gibi klinik bulgulara semptomatik tedavi uygulanabilir, analjezik ve antiemetik ilaçlar verilmektedir. Enfeksiyonun belirtileri genellikle 24-72 saat sonrasında geçmektedir (38).

Norovirüse yönelik yeni tedavi yaklaşımı olarak eritrositlerde bulunan karbonhidrat reseptörlerine norovirüsün bağlanmasını engelleyen antiviral ajanlar üstünde çalışılmaktadır (69).

Norovirüse yönelik aşı çalışmaları virüs benzeri parçacık içeren (virus-like particles) aşı çalışmaları devam etmektedir. Norovirüse yönelik etkili bir aşı için norovirüs GI ve GII'yi temsil eden suşları içeren çalışmalar yapılması önerilmektedir (70).

Norovirüs gıda, su, kişisel temas ve çevresel yüzeyler aracılığıyla bulaştığından salgınını kontrol etmek zordur. Salgınlar genellikle su ve gıda kaynaklı olduğu için bu kaynakların kontamine olmasını engellemek korunmada önemlidir. Norovirüs salgınlarından korunmada virüsün bulaşma yollarıyla mücadele önemli rol oynar. Gıda kaynaklı bulaşma her türlü gıdanın kontaminasyon riskiyle beraber özellikle midye, istiridye gibi deniz ürünleri, taze sebze ve meyvelerde risk daha fazladır (37, 71).

Gıda sektöründe çalışan norovirüs enfeksiyonu olan kişiler virüs atılımı devam ettiği için iyileştikten sonra 3 gün daha çalıştırılmamalı ve çalıştığı

zamanlarda eldiven kullanmalıdır. Gıda sektöründe çalışanlar tuvaletten çıktığında ve işe başlamadan önce mutlaka su ve sabunla ellerini yıkamalıdır. Gıda sektöründe çalışanlar ayrıca eldiven, bone ve maske kullanmaları gerekmektedir. İnsandan insana bulaşmada fekal-oral yol engellenmeli ve bu amaçla el hijyenine uyulmalı, hasta kişiler izole edilerek ayrılmalı ve ilgili ortamlarda yüzey dezenfeksiyonu yapılmalıdır. Kontamine ortamlar dezenfektanlarla %10'luk sodyum hipoklorit yada germisitlerle temizlenmeli ve kontamine yatak örtüleri en az 70°C ve çamaşır suyu içeren deterjanlarla yıkanmalıdır (17).

Laboratuvar tarafından norovirüs tanısı doğrulandığında hastaların gereksiz antibiyotik kullanımı önlenmiş olacaktır. Norovirüs diğer ishal salgınlarında olduğu gibi ciddi ekonomik ve işgücü kaybına neden olmakla birlikte kısa süre içinde büyük nüfus kitlelerini etkileyebilmektedir. Büyük salgınlara neden olabilmesi, etkilenen kişilerin düşkünlüğü ve toplumsal paniğe yol açması nedeniyle de önemlidir (24, 61).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Dışkı Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma ÇOMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 050-99-144 sayı numaralı izni ile Eylül 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde yürütüldü. Hastaneye ishal şikayetiyle başvuran 92 hasta çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastaların yaş, cinsiyet, klinik tanı, demografik bilgiler ve örneklerin alındığı tarih bilgileri kayıt altına alındı. Gaita örnekleri ağız kapalı fiksatif içermeyen plastik tüplerde hasta başına 2 adet olacak şekilde çalışma yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

3.2. Dışkı Örneklerinin Çalışılması

3.2.1 Dışkıda Norovirüs Antijenin Saptanması Testi ELISA Yöntemi

Olgulardan alınan dışkı örneklerinde Norovirüs antijenini tespit etmek için GI ve GII genotiplerini tayin edebilen, mikropalak ELISA kiti (RIDASCREEN, üçüncü jenerasyon, R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) kullanıldı (Şekil 2.). Dışkı örnekleri oda sıcaklığına getirildikten sonra, ELISA kiti içindeki sulandırma tamponu ile %10 oranında sulandırıldı, santrifüjlendi ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışma prosedürüne göre diğer işlemler yapıldı. Sonuçlar hesaplandıktan sonra çalışmalardan elde edilen pozitif ve negatif kontrollerin sonuçlarına göre hesaplanan sınır değerler (cut-off) ile karşılaştırılarak pozitif yada negatif olarak rapor edildi.

Dışkı örneklerinde ELISA için BioTek ELx50 yıkayıcı ve BioTek Elx800 okuyucu kullanıldı. Santrifüj için Eppendorf Centrifuge 5224 cihazı kullanılmıştır.

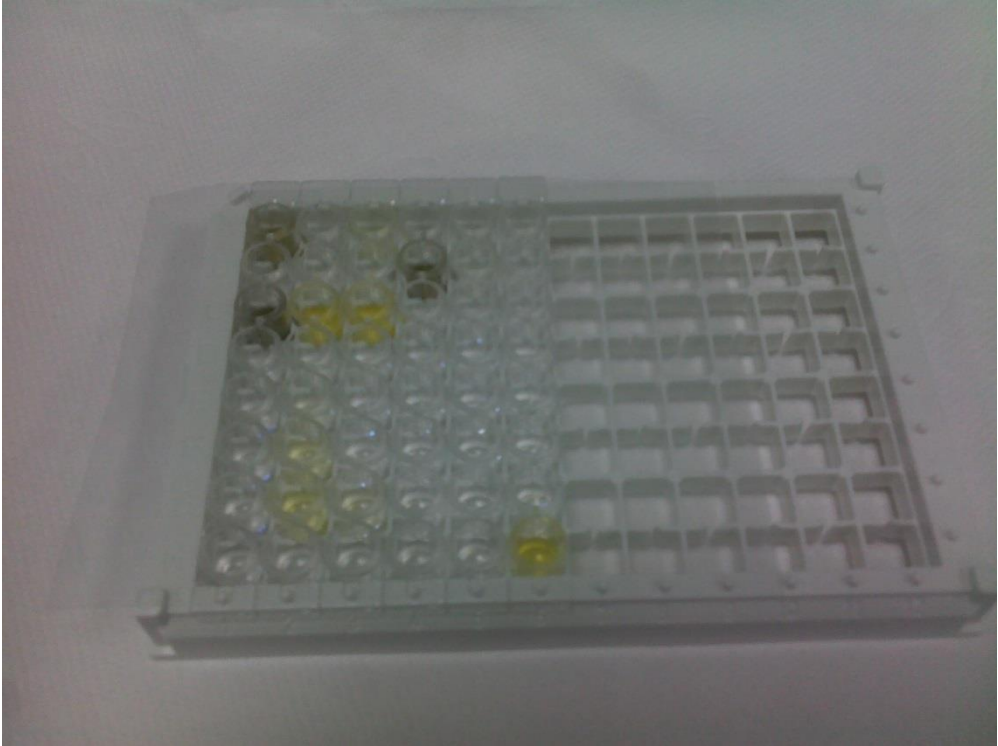


Şekil 2. 3. Jenerasyon Ridascreen Norovirüs kiti

Norovirüs ELISA Test Prosedürü

1. Dışkı örnekleri çalışma öncesi oda sıcaklığına getirildi.
2. Tüm solüsyonlar ve mikroplaterler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi (20 – 25 °C).
3. Distile su ile yıkama tampon solüsyonu 1:10 oranında dilüe edildi.
4. Örnek dilüsyon tampon solüsyonu ile gaita örnekleri 1:11 oranında dilüe edildi (Diluent 1).
5. İlk kuyucuğa 100 µl pozitif kontrol, ikinci kuyucuğa negatif kontrol (Dilüent 1), diğer kuyucuklara sırayla 100 µl örneklerden eklendi.
6. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat 1 eklendi ve karıştırıldı.
7. Plaklar oda sıcaklığında (20-25°C) 60 dakika karanlıkta bekletildi.
8. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama tampon solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
9. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat 2 eklendi.
10. Plaklar oda sıcaklığında (20-25°C) 30 dakika karanlıkta bekletildi.

11. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama tampon solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
12. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat eklendi.
13. Plaklar oda sıcaklığında (20-25°C) 15 dakika karanlıkta bekletildi.
14. Her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu (sülfirik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu.
15. Plaktaki kuyucuklarda oluşan renk değişikliği spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 3.).
16. Negatif kontrolün ölçülen optik dansite (OD) değerinin üzerine 0.150 eklenerek "cut-off" değeri belirlendi.



Şekil 3. Norovirüs çalışmasında görülen pozitif ve negatif örnekler

3.2.2 Dışkıda RT-PCR Yöntemi ile Norovirüs Aranması

Dışkıda PCR ile norovirüs tespiti için RealStar Norovirüs RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics GmbH, Hamburg, Almanya) kiti kullanılmış olup, gerçek

zamanlı PCR teknolojisine dayalı bir yöntem kullanan in vitro tanı amaçlı bir test kitidir (Şekil 4.). Norovirüs genogrup I (GI) ve genogrup (GII) ait RNA'yı kalitatif olarak tespit etmektedir. Real-time PCR amplifikasyonun erken safhalarından itibaren deteksiyon yapabilmeye imkan sağlar. Kit, olası RT-PCR inhibisyonunu belirlemek ve kit solüsyonlarının bütünlüğünü doğrulamak için, heterolog amplifikasyon sistemi (iç kontrol) içerir. RT-PCR teknolojisini temel alan test, RNA'yı cDNA'ya dönüştüren revers-transkriptaz enzimi kullanarak amplifiye DNA tespiti için hedef dizilerin amplifikasyonu ve hedefe özgü problemleri kullanan PCR yöntemidir.

Gaitadan RNA ekstraksiyonu için QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, QIAamp, QIAGEN Group) üreticinin açıklamaları doğrultusunda kullanılmıştır. PCR için Rotor Gene Q RT-PCR cihazı kullanılmıştır.



Şekil 4. RealStar Norovirüs RT-PCR Kit 2.0 kiti

Dışkıdan RNA izolasyonu

1. Dışkı örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Sıvı dışkı örneklerinden 100 µl, katı dışkı örneklerinden yaklaşık 80-100 mg olacak şekilde 2ml'lik eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 400 µl saf su eklendi (1/5 oranında).
3. 15 sn. vortekslendi.

4. Ardından 10.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
5. Üst fazdan 400 µl alınıp üzerine 400 µl kloroform eklendi.
6. 12000 rpm de 10 dk. santrifüj edildi.
7. QIAGEN Protease AVE tampon solüsyonu ile sulandırıldı.
8. Üzerine 25 µl QIAGEN Protease solüsyonu eklendi.
9. Üst fazdan 200 µl alındı.
10. Üzerine 200 µl tampon solüsyonu AL carrier RNA karışımından eklenir ve 15 sn vortekslendi.
11. İnternal kontrol 6 µl tüm örneklere eklendi.
12. Ardından 56 °C de 15 dk. inkube edildi.
13. Örnekler kapakta kalabileceği için kısa bir spin santrifüj yapıldı.
14. 250 µl etanol (%96-100) eklenip 15 sn vortekslendi.
15. Lizat 5 dk. oda sıcaklığında inkube edildi.
16. Örnekler kapakta kalabileceği için kısa bir spin santrifüj yapıldı.
17. Örneklerin tamamı QIAamp MinElute spin column içerisine dikkatlice aktarıldı.
18. Spin column kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
19. Toplama tüpü atıldı. Spin column yeni 2 ml'lik toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
20. Spin column kapağı açıldı, 500 µl AW1 tampon solüsyonu eklendi.
21. Spin column kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
22. Toplama tüpü atıldı. Spin column yeni 2 ml'lik toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
23. 500 µl AW2 tampon solüsyonu eklendi.
24. Spin column kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

25. Toplama tüpü atıldı. Spin column yeni 2 ml'lik toplama tüpü içerisine yerleştirildi.

26. 500 µl etanol (%96-100) eklendi.

27. Spin column kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

28. Toplama tüpü atıldı. Spin column yeni 2 ml'lik eppendorf tüpü içerisine yerleştirildi.

29. Spin column kapakları kapatılarak 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilerek membran iyice kurutuldu.

30. Toplama tüpü atıldı. Spin column yeni 2 ml'lik eppendorf içerisine yerleştirildi.

31. Üzerine 60 µl AVE tampon solüsyonu eklendi. Spin column kapakları kapatılarak oda sıcaklığında 3 dk. bekletildi.

32. Ardından 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Spin column'lar atıldı.

33. Eppendorf içerisindeki izole RNA -20°C de PCR çalışılincaya kadar saklandı.

RT-PCR Test protokolü

Tablo 3.1. RealStar Norovirüs RT-PCR Kit 2.0 kit içeriği

Kapak rengi	Mavi	Mor	Yeşil	Kırmızı	Turuncu	Beyaz
İçerik	Master A	Master B	İnternal Kontrol	Pozitif Kontrol Norovirüs GI	Pozitif Kontrol Norovirüs GII	PCR suyu

1. Kontaminasyonu engellemek için tüm işlemler temiz bir PCR ortamında ve filtreli pipet ucu ile yapıldı.

2. Tüm reaktifler (Tablo 3.1.) ve örnekler kullanılmadan önce hafif vortekslendi.

3. 2 ml'lik eppendorf tüpünde master miks hazırlandı.

4. Mavi kapaklı Master A tüpünden örnek başına 5 µl olacak şekilde alındı.

5. Mor kapaklı Master B tüpünden örnek başına 15 µl olacak şekilde alındı.

6. Master miks karışımı pipetlendi (Tablo 3.2.).

Tablo 3. 2. Master miks hazırlama tablosu

Örnek sayısı	1	24
Master A	5 µl	120 µl
Master B	15 µl	360 µl
Master Miks	20 µl	480 µl

7. Master miks PCR tüplerine her birine 20 µl olacak şekilde eklendi (internal kontrol RNA izolasyon basamağında eklenmişti).

8. Daha sonra üstüne 5 µl ekstraksiyon ürünü ya da 5 µl pozitif veya negatif kontrol eklendi ve reaksiyon hazırlandı (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3 Bir örnek için reaksiyon hazırlama

	Reaksiyon hazırlama
Master Miks	20 µl
Örnek ya da kontrol	5 µl
Toplam hacim	25 µl

9. Her PCR tüpü içeriği toplam 25 µl olarak alındı.
10. Pozitif kontroller ve negatif kontroller her çalışmada kullanıldı.
11. Örnekler ve kontroller master miks ile iyice pipetajlandı.
12. PCR tüpleri kapakları ile kapatıldı.
13. Daha sonra 300 rpm'de yaklaşık 30 saniye edildi.
14. Hazırlanmış olan örnekler ve kontroller çalışılması için Rotor Gene Q RT-PCR cihazına yüklendi.
15. Tablo 3.4.de verilen programa göre PCR protokolü uygulandı.

Tablo 3.4. PCR protokolü

	Evre	Çevrim tekrarlar	Okumalar	Sıcaklık	Süre
Ters Transkripsiyon	Bekleme	1	-	50°C	10:00 dk.
Denatürasyon	Bekleme	1	-	95°C	10:00 dk.
Amplifikasyon	Döngü	45	-	95°C	15 sn.
			+	58°C	45 sn.

16. Çalışma başlatıldı.

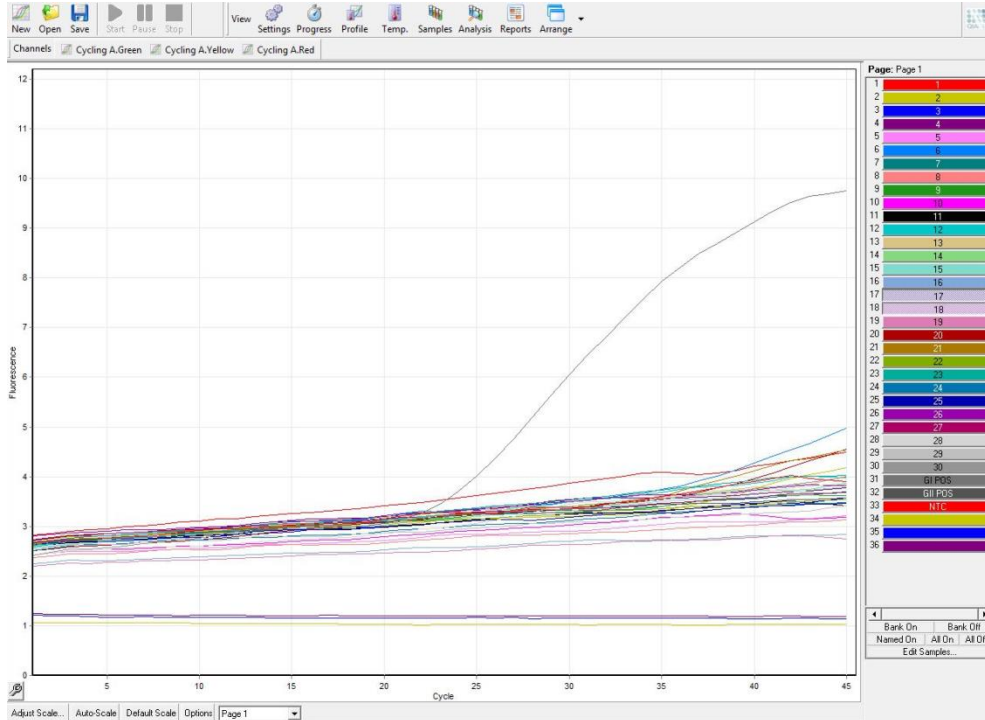
17. Çalışma sonrası Tablo 3.5. analiz tablosuna göre Cy5 (kırmızı) boyasının filtreleri ile tespit ettiğimiz örnekler norovirüs GI (Şekil 5.) olarak tanımlandı.

18. Çalışma sonrası FAM (yeşil) boyasının filtreleri ile tespit ettiğimiz örnekler norovirüs GII (Şekil 6.) olarak tanımlandı.

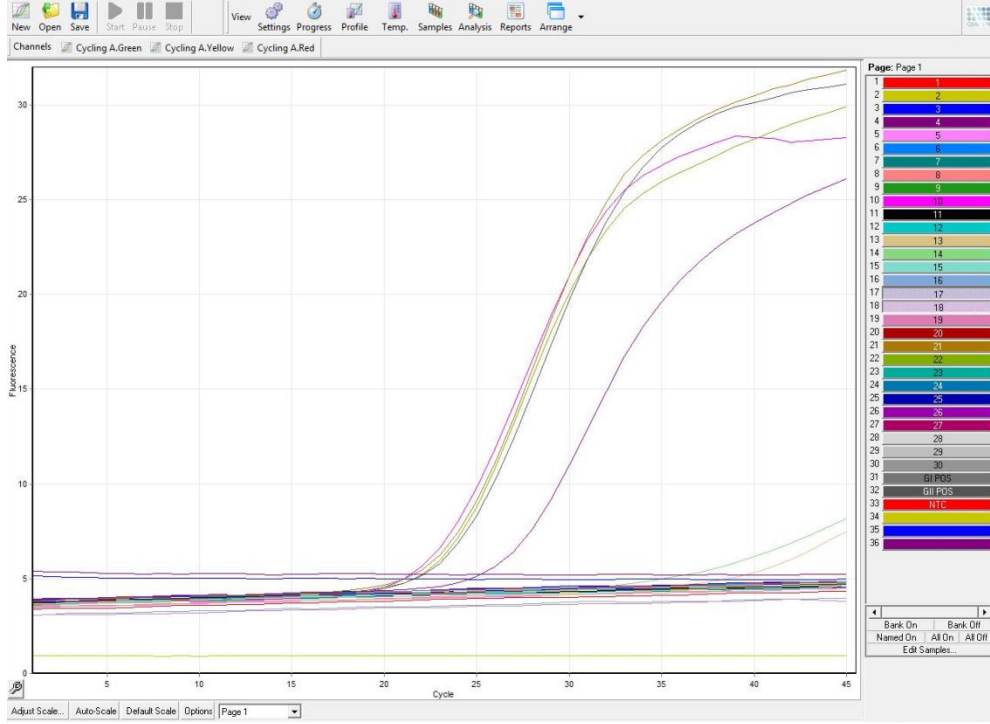
19. İnternal kontrol ise JOE (sarı) boyasının filtreleri ile tespit edildi.

Tablo 3.5. Analiz tablosu

Tespit	Dedektör ismi	Raportör
Norovirüs GI spesifik RNA	NV G I	Cy5
Norovirüs GII spesifik RNA	NV G II	FAM
İnternal kontrol	IC	JOE



Şekil 5. Norovirüs GI



Şekil 6. Norovirüs GII

3.2.3. İstatistiksel Yöntem

Araştırmanın verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 19.0 istatistik programı kullanılmıştır. Veriler tanımlayıcı istatistiksel analizler kullanılarak sıklık ve yüzde, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler kullanılarak sunuldu. Yaş grupları, cinsiyet gibi kategorik verilerin değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 92 hastadan dışkı örneği toplandı. Bu örneklerin 57'si (%61.9) erkek hastalara ait olup 35'i (% 38.1) ise kadın hastalara aittir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Hasta cinsiyet tablosu

Cinsiyet	Sayı	Yüzde (%)
Kadın	35	38.1
Erkek	57	61.9
Toplam	92	100

Çalışmamızda yer alan hastaların yaş ortalaması 30.1 ± 25.2 (minimum:1, maksimum:85) hastaların yaş aralığı 0-85 yıl aralığında dağılım göstermektedir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Hasta yaş dağılım tablosu

Yaş	Kadın	Erkek	Toplam
0-4	8	12	20
5-17	7	11	18
18-64	17	27	44
>65	3	7	10
Toplam	35	57	92

Çalışmamızda ELISA ile norovirüs pozitif 10 örnek %10.9 (10/92), negatif ise 82 örnek %89.1 (82/92) bulunmuştur (Tablo 4.3.). ELISA ile erkek hastaların 7'sinde kadın hastaların 3'ünde norovirüs saptanmış ancak cinsiyet açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.736$). Yaş gruplarına göre ELISA pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0.185$) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.3. ELISA sonuçları

	ELISA(+) POZİTİF	ELISA(-) NEGATİF	TOPLAM
KADIN	3	32	35
ERKEK	7	50	57
TOPLAM	10	82	92

Tablo 4.4. Yaş gruplarına göre ELISA sonuçlarının dağılımı

YAŞ	ELISA(+) POZİTİF	ELISA(-) NEGATİF	TOPLAM
0-4	4	16	20
5-17	1	17	18
18-64	5	39	44
>65	0	10	10
TOPLAM	10	82	92

PCR ile yapılan çalışma sonucunda 4 örnek internal kontrolü negatif çıktığı için kalan 88 örnek üstünden değerlendirmeler yapılmış ve ELISA ile de 88 örnek üstünden kıyaslamaya alınmıştır. PCR sonuçlarına göre 15 örnek %17 (15/88) pozitif, 73 örnek %83 (73/88) ise negatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5.). PCR ile çıkan sonuçlarda erkek hastaların 9'unda, kadın hastaların 6'sında norovirüs pozitif bulunmuş ve cinsiyet grupları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.849).

Tablo 4.5. PCR sonuçları

	PCR GI(+) POZİTİF	PCR GII(+) POZİTİF	PCR(-) NEGATİF	TOPLAM
KADIN	-	6	29	35
ERKEK	1	8	44	53
TOPLAM	1	14	73	88

Yaş gruplarına göre PCR pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.473$) (tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Yaş gruplarına göre PCR sonuçlarının dağılımı

YAŞ	PCR GI(+) POZİTİF	PCR GII(+) POZİTİF	PCR(-) NEGATİF	TOPLAM
0-4	1	2	16	19
5-17	0	3	14	17
18-64	0	9	34	43
>65	0	0	9	9
TOPLAM	1	14	73	88

Yine ELISA ile pozitif bulunan 1 örnek PCR çalışmasında negatif sonuç vermiş, PCR ile pozitif bulunmuş 6 örnek ise ELISA ile negatif olarak bulunmuştur (Tablo 4.7.). RT-PCR ile internal kontrolü negatif çıkan 4 örneğin ELISA sonuçları negatif olarak tespit edilmiştir.

PCR ile çalışılan örneklerden 14'ü norovirüs GII olarak bulunmuşken, 1 örnek norovirüs GI pozitif olarak tespit edilmiştir. PCR ile norovirüs GI tespit edilen örnek, ELISA sonucunda da norovirüs pozitif bulunmuştur.

Tablo 4.7. ELISA ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması

	PCR (+) POZİTİF	PCR (-) NEGATİF	TOPLAM
ELISA(+) POZİTİF	9	1	10
ELISA(-) NEGATİF	6	72	78
TOPLAM	15	73	88

PCR referans alındığında, ELISA testinin duyarlılığı %60 (9/9+6), özgülüğü %98 (72/72+1) olarak tespit edilmiştir.

Aylara göre dağılımda Eylül ve Kasım aylarında 4'er pozitif örnek bulunmuş, Ocak ayı ise en çok örnek alınan ay olmasına rağmen 2 örnek norovirüs pozitif bulunmuştur (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. Hastaların aylara göre dağılımı

Aylar	Örnek	ELISA (+) Pozitif	PCR (+) Pozitif
Ocak	28	1	2
Şubat	5	-	-
Mart	5	-	-
Nisan	3	-	-
Mayıs	11	3	2
Haziran	9	1	1
Temmuz	1	-	-
Ağustos	0	-	-
Eylül	9	2	4
Ekim	4	1	1
Kasım	15	2	4
Aralık	2	-	1
Toplam	92	10	15

5. TARTIŞMA

Moleküler yöntemlerin tanıda kullanılmaya başlanmasıyla norovirüsler tüm yaş gruplarında bakteriyel olmayan epidemik gastroenteritlerin %90'ından fazlasına, tüm gastroenteritlerin ise yaklaşık %50'sine sebep olduğu belirlenmiştir (72). Son zamanlarda çocuklarda norovirüs gastroenteriti nedeniyle hastaneye yatışlar tüm dünyada rotavirüsten sonra ikinci sırada geldiği kabul edilmiştir. Rotavirüsün ulusal aşılama programları içine alınması nedeniyle, norovirüs gastroenteritinin rolünün daha çok artması beklenmektedir (73). Norovirüs akut gastroenteritle ilişkili olarak ilk keşfedilen virüstür (16). Norovirüs 1972 yılında keşfedilmesine rağmen hücre kültürü yapılamaması ve moleküler dışı tanı yöntemlerindeki zorluklar, norovirüsün epidemiyolojisini ve norovirüsle ilişkili enfeksiyonların etkilerinin değerlendirilmesindeki ilk çabaları engellemiştir. Son 15 yıl içinde meydana gelen RT-PCR gibi moleküler yöntemlerdeki gelişmeler norovirüsün sporadik ve salgınlardaki etiyolojik rolünün daha geniş incelenmesine olanak verdi (74, 75).

Norovirüs enfeksiyonlarının tanısında elektron mikroskopik inceleme, ELISA, RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR gibi yöntemler kullanılmaktadır (19). ELISA dışı örneklerinde norovirüs antijeninin tespitinde yaygın olarak kullanılan hızlı ve pratik ve ekonomik bir yöntem olup çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılmasına imkan vermektedir. Dışkıda norovirüs antijen tespiti için yapılan ELISA testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin araştırıldığı çalışmalarda Ridascreen ELISA kitinin en yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve sporadik ve gastroenterit salgınlılarının tanısında pratik, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (76, 77). Ridascreen ELISA kitinin üreticisi (R-Biopharm, Darmstadt, Almanya) tarafından bu kitin duyarlılığı %80, özgüllüğü %100 olarak açıklanmakta ayrıca çapraz reaksiyon vermediği belirtilmektedir. Bu kitin yine yapılan çalışmalarda dünyada en yaygın görülen GI ve GII genogruplarının tanımlanmasında başarılı sonuçlar verdiği ifade edilmiştir (76, 77, 78, 79).

Bizim çalışmamızda ELISA ile %10.9 (10/92) örnek pozitif, %89.1 (82/92) örnek negatif bulunmuştur. Yaş gruplarına göre yapılan ELISA pozitifliği

değerlendirilmesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.185$).

Çalışmamızda PCR ile %17 (15/88) örnek norovirüs pozitif, %83 (73/88) örnek negatif tesbit edilmiştir. Yaş gruplarına göre yapılan PCR pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.473$).

Çalışmamızdaki erkek ve kadın hastalar norovirüs ELISA ve PCR sonuçları açısından değerlendirilmiştir. Buna göre ELISA ile erkek hastaların 7'sinde kadın hastaların 3'ünde norovirüs saptanmış ancak cinsiyet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.736$). PCR ile çıkan sonuçlarda erkek hastaların 9'unda, kadın hastaların 6'sında norovirüs pozitif bulunmuş ve cinsiyet grupları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.849$). Bu sonuçlar da norovirusün cinsiyete bağlı bir enfeksiyon olmadığını doğrulamaktadır.

Günümüzde norovirüsün tespitinde altın standart olarak RT-PCR kabul edilmektedir. Erwin de Bruin ve arkadaşları (20) 158 örneklik bir çalışmada RT-PCR ile pozitif tespit edilen örneklerin 74'ünü (%47) Southern blot hibridizasyon ve sekans (nükleotid dizileme) yöntemlerini kullanarak doğrulamışlardır. Geriye kalan 84 örnek (%53) RT-PCR ile negatif bulunmuş ve Southern blot ve sekans yöntemleri ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlar RT-PCR'in norovirüs tanısında altın standart (gold standard) yöntem olarak doğrulamıştır. Yine bu çalışmada ticari ELISA kitinin (Ridascreen) duyarlılık ve özgüllüğü altın standart olarak kabul edilen RT-PCR ile karşılaştırılmış ve 10 (%6) örnekte her iki yöntemle de pozitiflik, 71 (%45) örnekte her iki yöntemle de negatiflik tespit edilirken, 77 (%49) örnekte kullanılan yöntemlerin herhangi birisiyle pozitiflik bulunmuştur. RT-PCR temel alındığında Ridascreen ELISA kitinin duyarlılığı %36, özgüllüğünü %88 olarak tespit etmişlerdir. Sanz ve arkadaşları (80) yine RT-PCR göre Ridascreen ELISA kitinin duyarlılığını %80, özgüllüğünü %90, Dimitriadis ve arkadaşları (81) duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %47 ve %71, Schmid ve arkadaşları (82) duyarlılığı ve özgüllüğü %34.6 ve %65.3, Zhang ve arkadaşları (83) duyarlılığı ve özgüllüğü %96.1 ve %93.5, Uyar ve arkadaşları (61) duyarlılığı %61.5, özgüllüğü %100 olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak

yapılan çalışmalarda duyarlılık %34.6-96.1 özgüllük %65.3-100 arasında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda Ridascreen ELISA kitinin duyarlılığı %60, özgüllüğü %98 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında bölgeden bölgeye ve kullanılan PCR yöntemine göre farklılıklar olduğu düşünülebilir.

Kasım 2005-Kasım 2006 arasında Güney Kore'de akut gastroenteritli olgularda yapılan bir çalışmada 762 dışkı örneğinden RT-PCR ile yapılan testte örneklerin %15'i (114/762) pozitif bulunmuştur. Bu pozitif bulunan 114 örneğin %10.5'u (12/114) norovirüs GI, %89.5'i (102/114) GII pozitif suşlar saptanmıştır (84).

Brezilya'da 2005-2008 yılları arasında yapılan bir çalışmada akut gastroenteritli 1687 dışkı örneği çalışmaya alınmış bunların 324'ü (%19.2) rotavirüs pozitif bulunmuş, geri kalan 1363 örnekten 1087 tanesi norovirüs için RT-PCR ile test edilmiş. Bu incelenen örneklerden %35.1 (381/1087) norovirüs pozitif olarak tanımlanmış. Tüm sekans analizi için seçilen 108 örnekten %80.7'si GII.4 genotipine ait çıkmıştır (27).

İspanya'nın Katolanya bölgesinde 2004-2005 yıllarında 1791 kişiyi etkileyen 60 salgın incelenmiş, bu salgınlardan 55'nin norovirüs kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu salgınların %50'sinin gıda kaynaklı olduğu bulunmuş ve norovirüs GII.4 tüm salgınların %42'sinde pozitif olarak tespit edilmiştir (85).

Finlandiya'da 1998-2002 yılları arasında meydana gelen 416 akut gastroenterit salgını incelenmiş salgınların 252'sinin (%62.6) nedenin norovirüs kaynaklı olduğu ve en sık GII etken olduğu belirlenmiştir (86).

Oldak ve arkadaşları tarafından Polonya'da 2008 yılında 5 yaş altı çocuklarda ELISA testi kullanılarak yapılan çalışmada norovirüs antijeni %10.5 (19/181) oranında saptanmıştır (7). Tran ve arkadaşları 2007 yılında Fransa'da 0-28 aylık çocuklarda ELISA yöntemi ile yaptıkları çalışmada %13 oranında norovirüs pozitifliği saptamışlardır (87).

Ülkemizde norovirüsle ilk çalışma 1999 yılında İstanbul Üniversitesi'nde uzmanlık tezi kapsamında yapılmıştır. Bu çalışmada RT-PCR ile erişkinde %13, çocuklarda %27 oranında norovirüs pozitifliği bulunmuş (62), başka bir uzmanlık tezi çalışmasında, gastroenteritli kişilerde RT-PCR ile %6.9 oranında norovirüs

pozitifliği bulunmuştur (63). Altındış ve arkadaşlarının (64) 2006-2007 yıllarında Afyon'da gastroenteritli kişilerde yaptıkları çalışmada RT-PCR ile %17 (15/88) oranında pozitiflik bulunmuştur. Uyar ve arkadaşlarının (61) yaptıkları çalışmada ELISA testinde %26 (13/50), real-time RT-PCR'da %33 (13/40) norovirüs pozitif olarak bulmuşlardır. Bu real-time RT-PCR'da pozitif bulunan 13 örneğin dokuzu norovirüs GI, dördü GII olarak bulunmuştur. Albayrak ve arkadaşlarının (65) 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada Türkiye'nin 11 ilinden gelen 147 gastroenteritli örnek, viral gastroenterit etkenleri yönünden incelenmiş ve en sık saptanan etken norovirüs olmuş, örneklerin %9.5'i (14/147) norovirüs GI, %29'u (43/147) GII pozitif olarak saptanmıştır. Altay ve arkadaşlarının (88) Ankara'da 2004-20011 tarihleri arasında 0-5 yaş arası çocuklarda yaptıkları çalışmada %14.1 (141/1000) örnek Ridascreen ELISA ile pozitif bulunmuştur. Ülkemizde Adana İncirlik'te bulunan bir ABD üssünde 2009 yılında meydana gelen bir gastroenterit salgınında 97 hastanın 37'sine ait dışkı örnekleri incelemeye alınmış ve bunların %43'ü (16/37) Norovirüs GII olarak RT-PCR ile tespit edilmiştir (89). Özkul ve arkadaşlarının (34) 2008-2009 yıllarında İstanbul'da gastroenteritli çocuklarda yaptıkları çalışmada örneklerin %10.5'i (25/238) Ridascreen ELISA ile pozitif bulunmuş, %15.1'i (36/238) real-time RT-PCR'da norovirüs GII pozitif olarak tespit edilmiştir. Tüm ELISA pozitif örnekler real-time RT-PCR ile de pozitif bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ELISA ile %10.9 (10/92) örnek pozitif bulunmuş, real-time PCR ile %17 (15/88) örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Real-time PCR sonuçlarından elde ettiğimiz pozitif sonuçlardan 1 örnek %6.6'sı (1/15) norovirüs GI, 14 örnek %93.4'ü (14/15) norovirüs GII pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla ve literatürle uyumludur ve şehrimizde de norovirüs GII daha sık bulunmuştur.

Çalışmamızda ayrıca ELISA ile pozitif bulunan bir örnek real-time RT-PCR ile negatif bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarla altın standart kabul edilmiş olan RT-PCR'ın, gaita çalışmalarında gaitada bulunan PCR inhibitörlerinden etkilendiği ve yalancı negatif sonuçlara neden olabileceği bildirilmektedir (17, 20).

Enterik viral enfeksiyonların dışkı süspansiyonlarından yapılmış RNA ekstraksiyonu kullanılarak real-time RT-PCR tepkimesiyle tanı şansı artmakta ve bu yöntem doku kültüründen viral izolasyon ve karakterizasyonun yerini artarak almaktadır (90, 91). Ancak sonuçların yorumlanması her zaman kolay olmamaktadır. Real-time RT-PCR'in duyarlılığı klinik örnekte yer alan bazı maddelerin, PCR kimyasallarını kısmen veya tamamen inhibe etmesiyle olumsuz yönde etkilenmektedir. Dışkı süspansiyonundan RNA ekstraksiyonu sırasında tamamen ortamdan alınamayan potansiyel inhibitörler içerisinde hemoglobin, immunglobulin, bilirubin, trigliseritler, kompleks polisakkaritler, organik ve fenolik bileşikler, glikojen, yağ, metabolik ürünler (özellikle patolojik koşullara maruz kalan), bakteri, sebze, ilaçlar, antikoagülanlar ve alkol gibi maddeler bulunmaktadır (91). Endojen, real-time RT-PCR inhibitörlerinin listesine birde eksojen inhibitörleri de eklenirse bunlar da deterjanlar, şelatlama bileşikleri ve guadinyum HCL gibi ekstraksiyon protokollerinin eksojen inhibitörleri olarak sayılabilir (92).

Yapılan çalışmalarda norovirüs enfeksiyonlarının kuzey yarımkürede daha çok kış ve ilkbahar aylarının başlarında daha çok görüldüğü ifade edilmektedir (38). Ancak bizim çalışmamızda Eylül ve Kasım aylarında dörder örnek pozitif bulunmasına rağmen en çok örnek alınan (28 örnek) Ocak ayında iki pozitif örnek bulunmuştur. Bu sonuçların örnek sayısının az olması ve örneklerin toplumdan değil de sadece hastaneye başvuran hastalardan alınmasının sebep olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda kullandığımız Ridascreen ELISA kitinin test başı maliyeti 17 Türk lirası iken, real-time RT-PCR kitinde bu fiyat 70 Türk lirası olarak gerçekleşmiştir. Real-time RT-PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir ancak oldukça pahalı olması, iyi yetişmiş eleman ve nispeten uzun zaman gerektirmesi (yaklaşık 7-8 saat) dezavantajlarıdır. Genotiplendirme şansı PCR'ın üstün olan yönlerinden biri olup epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla fayda sağlamaktadır. Dışkıdaki PCR inhibitörlerinden etkilense PCR norovirüs enfeksiyonlarının tanısında altın standart olarak kabul edilmiş bir yöntemdir. PCR rutin laboratuvarlarda kullanılması zor ve ekonomik olmasada referans laboratuvarlarda ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmalıdır. ELISA

yöntemi ise daha hızlı (yaklaşık 4-5 saat) ve pratik olup fiyat olarak ta avantajlıdır. Ancak duyarlılığının düşük olması dezavantajlarından biri olmakla birlikte özgüllüğü yüksektir. ELISA yöntemi özellikle PCR imkanlarının olmadığı bölgelerde, salgınların saptanmasında kullanışlı olacaktır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamız sonunda Çanakkale ilinden ilk defa akut gastroenteritli hastalarda norovirüs etkeni saptanmıştır. ELISA ile %10,9 (10/92) oranında pozitiflik bulunmuş, real-time RT-PCR ile %17 (15/88) oranında norovirüs pozitif örnek tespit edilmiştir. Real-time RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerin 14'ü norovirüs GII, biri ise GI bulunmuştur. Çalışmamızda ayrıca Ridascreen ELISA kitinin, RT-PCR temel alındığında duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %98 olarak bulunmuştur.

Norovirüs enfeksiyonu hızlı yayılması, kısa sürede büyük toplulukları etkilemesi, etkilenen kişilerde düşüklük oluşturması, ciddi ekonomik kayıplara, işgücü kayıplarına hatta ölümlere yol açması ve toplumlarda paniğe sebep olması nedeniyle hızlı tanısı önemlidir. Rotavirüs aşısının kullanımının artmasıyla norovirüs enfeksiyonun görülme sıklığının daha da artacağı düşünülmektedir. Ayrıca bölgemizin ulusal ve uluslararası kara ve deniz yolu geçiş noktasında bulunması ve turizm potansiyelinin yüksek bir bölge olması dolayısıyla akut gastroenteritli olgularda norovirüs enfeksiyonu mutlaka düşünülmeli ve laboratuvarlarda çalışılması için önlemlerin alınması gereklidir. Real-time RT-PCR gibi moleküler yöntemlerin norovirüsün tanısında ve genotiplendirilmesinde üstünlüğü çok yüksek olmakla birlikte, ELISA gibi dışkıda antijen tespitine dayalı pratik ve ekonomik yöntemlerin kısıtlı imkanların olduğu laboratuvarlarda uygulanabilirliği daha yüksektir. Duyarlılığı yüksek olmadığından akut vakalarda tek tek etkenin tespitinde ELISA yöntemi kullanımı tartışmalı olacaktır. Ancak salgın durumlarında pek çok vakada birden analiz uygulanacağından, salgında etken tespitinde ucuz ve özgüllüğü yüksek olduğundan etkin bir yöntem olabilecektir. Ekstraksiyon basamağı da eklendiğinden toplam çalışma süresi ve maliyeti yüksek olan PCR testinde, literatürde bahsedildiği gibi çalışmamızda da olası inhibitörler sebebi ile sonuç alamadığımız örneklerle rastlanmıştır.

Bölgemizde görülen vakaların yaş, cinsiyet ve mevsim gibi özelliklere göre dağılım farklılığı göstermediği saptanmıştır.

Çanakkale’de sınırlı sayıda örnekte oldukça önemli bir oranda norovirüs saptanmış olması, bölgemizde ve belki de ülkemizde norovirüsün tahmin edilenden daha önemli bir etken olduğunu düşünmek için şimdiye kadar yapılan çalışmalara ek veriler de sağlanmış oldu.

KAYNAKLAR

1. ATMAR, R.L., ESTES, M.K., (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (1):15-37.
2. GLASS, R., (2013). Beyond discovering the viral agents of acute gastroenteritis. *Emerg Infectious Diseases*. 19(8):1190-1191.
3. TURCIOS, R.M., WIDDOWSON, M.A., SULKA, A.C., MEAD, P.S., GLASS, R.I., (2006). Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States. *Clinical Infectious Diseases*. 42:964-969.
4. HALL, A.J., VINJE, J., LOPMAN, B., PARK, G.W., YEN, C., GREGORICUS, N., PARASHAR, U., (2011). Updated norovirus outbreak management and disease prevention guideline. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 60:3.
5. MEDICI, C.M., MARTINELLI, M., ARCANGELETTI, M.C., PINARDI, F., CONTO, F.D., DODI, I., VIRDIS, R., ABELLI, L.A., ALOISI, A., ZERBINI, L., VALCAVI, P., CALDERARO, A., BERNASCONI, S., IZZI, G.C., DETTORI, G., CHEZZI, C., (2004). Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. *Acta Bio Medica Ateneo Parmense*. 75:100-106.
6. ÖZDEMİR, S., DELİALİOĞLU, NURAN., EMEKDAŞ, GÜROL., (2010). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus, adenovirus ve astrovirus sıklığının araştırılması ve epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 44:571-578.
7. OLDAK, E., SULIK, A., ROZKIEWICZ, D., LIWOCH,NIENATOWICZ, N., ZAWADZKA, E., (2009). Norovirus and rotavirus – two major causative agents of sporadic viral gastroenteritis in hospitalized polish children. *Advances in Medical Sciences*. 54(2):183-186.
8. MOYO, S.J., GRO, N., KIRSTI, V., MATEE, M.I., KITUNDU, J., MASELLE, S.Y., LANGELAND, N., MYRMEL, H., (2007). Prevalence of

enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. *BMC Public Health*. 7:359.

9. LOPMAN, B.A., REACHER, M.H., VIPOND, I.B., SARANGI, J., BROWN, D.W.G., (2004). Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care setting. *Clinical Infectious Diseases* 39:318-324.

10. ROCKX, B., WIT, M., VENNEMA, H., VINJE, J., BRUIN, E., DUYNHOVEN, Y., (2002). Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases* 35:246-53.

11. SAID, M.A., PERL, T.M., SEARS, C.L., (2008). Gastrointestinal flu: norovirus in health care and long-term care facilities. *Clinical Infectious Diseases* 47:1202-8.

12. BARKER, J., VIPOND, I.B., BLOOMFIELD, S.F., (2004). Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*. 58(1):42-49.

13. BECKER, K.M., MOE, C.L., SOUTHWICK, K.L., MACCORMAK, J.N. (2000). Transmission of norwalk virus during a football game. *The New England Journal of Medicine*. 343(17):1223-1227.

14. FANKHAUSER, R.L., MONROE, S.S., NOEL, J.S., HUMPHREY, C.D., BRESEE, J.S., PARASHAR, U.D., ANDO, T., GLASS, R.I., (2002). Epidemiologic and molecular trends of 'Norwalk-like Viruses' associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 186:1-7.

15. MORENO-ESPINOSA, S., FARKAS, T., JIANG, X., (2004). Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Pediatric Infectious Diseases*. 15:237-245.

16. WIDDOWSON, M.A., MONROE, S.S., GLASS, R.I., (2005). Are noroviruses emerging?. *Emerging Infectious Diseases*. 11(5):735-737.

17. ÖZTÜRK, R., Norovirüs ve Diğer Calicivirüsler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. WİLKE, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2008). 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. s.:1832-1837.
18. GALLIMORE, C.I., GREEN, J., DAVID, LEWIS., RICHARDS, A.F., LOPMAN, B.A., HALE, A.D., EGLIN, R., GRAY, J.J., BROWN, D.W.G., (2004). Diversity of noroviruses cocirculating in the Nort of England from 1998 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(4):1396-1401.
19. RABENAU, H.F., STURMER, M., BUXBAUM, S., WALCZOK, A., PREISER,W., DOERR, H.W., (2003). Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best?. *Intervirology*. 46:232-238.
20. De BRUIN, E., DUIZER, E., VENNEMA, H., KOOPMANS, M.P., (2006). Diagnosis of norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR . *Journal of Virological Methods*. 137:259-264.
21. KAPIKIAN, A.Z., WYATT, R.G., DOLIN, R., THORNHILL, T.S., KALICA, A.R., CHANOCK, R.M., (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*. 10(5):1075-1081.
22. LEWIS, D.C., LIGHTFOOT, N.F., PETHER, J.V., (1988). Solid-phase immune electron microscopy with human immunoglobulin M for serotyping of Norwalk-like viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 26(5):938-942.
23. LOPMAN, B., ZAMBON, M., BROWN, D.W., (2008). The evolution of norovirus, the 'Gastric flu'. *Public Library of Science Medicine*. 5(2):e42.
24. FARKAS, T., JIANG, X., (2009)., Rotavirüer, Kalisivirüsler, Astrovirüsler, Enterik Adenovirüsler ve Diğer İshal Yapan Virüsler. *Manual of Clinical Microbiology* . MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., LANDRY, M.L., PFALLER, M.A., 9. Baskı. Ankara: Atlas Yayıncılık. S.:1453-1469.
25. ZHENG, D.P., ANDO, T., FANKHAUSER, R.L., BEARD, R.Z., GLASS, R.I., MONROE, S.S., (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 346:312-323.

26. GREEN, K.Y., ANDO.T., BALAYAN, M.S., BERKE, T., CLARKE, I.N., ESTES, M.K., MATSON, D.O., NAKATA, S., NEILL, J.D., STUDDERT, M.J., THIEL, H.J., (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(2):322-330.
27. FERREIRA, M.S.R., VICTORIA, M., CARVALLO-COSTA, F.A., VIEIRA, C.B., WAVIER, M.P.T.P., FIORETTI, J.M., ANDRADE, J., VOLOTAO, E.M., ROCHA, M., LEITE, J.P.G., MIAGOSTOVICH, M.P., (2010). Surveillance of norovirus infections in the State of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *Journal of Medical Virology*. 82:1442-1448.
28. SAKAMAKI, N., OHIRO, Y., ITO, M., MAKINODAN, M., OHTA, T., SUZUKI, W., TAKAYASU, S., TSUGE, H., (2012). Bioluminescent enzyme immunoassay for the detection of norovirus capsid antigen. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(12):1949-1954.
29. MARTELLA, V., LORUSSO, E., DECARO, N., ELIA, G., RADOGNA, A., D'ABROMO, M., DESARÍO, C., CAVALLI, A., CORRENTE, M., CAMERO, M., GERMINARIO, C.A., BANYAI, K., DI MARTINO, B., MARSILIO, F., CARMICHAEL, L.E., BUONAVOGLIA, C., (2008). Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerging Infectious Diseases*. 14(8):1306-1308.
30. OKA, T., SAIF, L.J., WANG, Q., (2013). First complete genome sequence of a genogroup II genotype 18 porcine norovirus, strain QW125. *Genome Announcements*. 1(3):e00344-13.
31. WANG, Q.H., HAN, M.G., CHEETHAM, S., SOUZA, M., FUNK, J.A., SAIF, L.J., (2005). Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*. 11(12):1874-1881.
32. BULL, R.A., EDEN, J.S., LUCIANI, F., McELROY, K., RAWLINSON, W.D., WHITE, P.A., (2012). Contribution of intra-and interhost dynamics to norovirus evolution. *Journal of Virology*. 86(6):3219-3229.
33. SIEBENGA, J.J., VENNEMA, H., ZHENG, D.P., VINJE, J., LEE, B.E., PANG, X.L., HO, E.C.M., LIM, W., CHOUDEKAR, A., BROOR, S., HALPERIN,

T., RASOOL, N.B.G., HEWITT, J., GREENING, G.E., JIN, M., DUAN, Z.J., LUCERO, Y., O'RYAN, M., HOEHNE, M., SCHREIER, E., RATCLIFF, R.R., WHITE, P.A., IRITANI, N., REUTER, G., KOOPMANS, M., (2009). Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *The Journal of Infectious Diseases* 200:802-12.

34. OZKUL, A.A., KOCAZEYBEK, B.S., TURAN, N., REUTER, G., BOSTAN, K., YILMAZ, A., ALTAN, E., UYUNMAZ, G., KARAKÖSE, A.R., MURATOGLU, K., ELEVLI, M., HELPS, C.R., YILMAZ, H., (2011). Frequency and phylogeny of norovirus in diarrheic children in İstanbul, Turkey. *Journal of Clinical Virology* 51:160-164.

35. KUNDU, S., LOCKWOOD, J., DEPLEDGE, D.P., CHAUDRURY, Y., ASTON, A., RAO, K., HARTLEY, J.C., GOODFELLOW, I., BREUER, J., (2013). Next-generation whole genome sequencing identifies the direction of norovirus transmission in linked patients. *Clinical Infectious Diseases*. 57(13):407-414.

36. DONALDSON, E.F., LINDESMITH, L.C., LOBUE, A.D., BARIÇ, R.S., (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological Reviews*. 225(1):190-211.

37. USTAÇELEBİ, Ş., ABACIOĞLU, H., BADUR, S., (2004). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Bölüm 14.

38. THORNTON, A.C., JENNINGS-CONKLIN, K.S., McCORMIK, M.I., (2004). Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Management Response*. 2:4-9.

39. KIRAZ, N., SAMASTI, M., AYGÜN, G., (2011). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı Cilt II. s.:1219-1223.

40. TAN, M., JIANG, X., (2011). Norovirus-host interaction: multi-selections by human HBGAs. *Trends Microbiology*. 19(8):382-388.

41. SIMMONS, K., GAMBHIR, M., LEON, J., LOPMAN, B., (2013). Duration of immunity to norovirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. 19(8):1260-1267.

42. VERHOEF, L., VENNEMA, H., PELT, W, V., LEES, D., BOSHUIZEN, H., HENSHILWOOD, K., KOOPMANS, M., (2010). Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerging Infectious Diseases*. 16(4):617-624.
43. KOO, H,L., AJAMI, N., ATMAR, R,L., DuPONT, H,L., (2010). Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discovery Medicine*. 10(50):61-70.
44. KOOPMANS, M., (2009). Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *Journal of Hospital Infection*. 73:331-337.
45. GRAHAM, D,Y., JIANG, X., TANAKA, T., OPEKUN, A,R., MADORE, H,P., ESTES, M,K., (1994). Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *The Journal of Infectious Diseases*. 170(1):34-43.
46. HARRIS, J,P., EDMUNDS, W,J., PEBODY, R., BROWN, D,W., LOPMAN, B,A., (2008). Deaths from norovirus among the Elderly, England and Wales. *Emerging Infectious Diseases*. 14(10):1546-1552.
47. PLANTENGA, M,S., SHIFERAW, B., KEENE, W,E., BIGGS, C., TERY, J,M., GRENZ, L., CIESLAK, P,R., (2011). *Emerging Infectious Diseases*. 17(8):1553-1555.
48. ANDO, T., MONROE, S,S., GENTSCH, J,R., JIN, Q., LEWIS, D,C., GLASS, R., (1995). Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses(norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(1):64-71.
49. RICHARDS, A,F., LOPMAN, B., GUNN, A., CURRY, A., ELLIS, D., COTTERILL, H., RATCLIFFE, S., JENKINS, M., APPLETON, H., GALLIMORE, C,I., GRAY, J,J., BROWN, D,W,G., (2003). Evaluation of a commercial ELISA for detecting norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of Clinical Virology*. 26(1):109-115.
50. MARKS, P,J., VIPOND, I,B., REGAN, F,M., WEDGWOOD, K., FEY, R,E., CAUL, E,O., (2003). A school outbreak of norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology Infection*. 131:727-736.

51. KAPIKIAN, A.Z., (2000). The discovery of the 27-nm norwalk virus: an historic perspective. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(2):295-302.
52. PARASHAR, U.D., QUIROZ, E.S., MOUNTS, A. W., MONROE, S,S., FANKHAUSER, R,L., ANDO, T., NOEL, J,S., BULENS, S,N., BEARD, R,Z., LI, J,F., BRESEE, J,S., GLASS, R,I., (2001). 'Norwalk-like viruses' public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 50(9):1-17.
53. SOUZA, M., CHEETHAM, S,M., AZEVEDO, M,S,P., COSTANTINI, V., SAIF, L,J., (2007). Cytokine and antibody response in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *Journal of Virology*. 81(17):9183-9192.
54. MATTISON, K., GRUDESKI, E., AUK, B., BRASSARD, J., CHAREST, H., DUST, K., GUBBAY, J., HATCHETTE, T,F., HOUDE, A., JEAN, J., JONES, T., LEE, B,E., MAMIYA, H., McDONALD, R., MYHYTCZUK, O., PANG, X., PETRICH, A., PLANTE, D., RITCHIE, G., WONG, J., BOOTH, T,F., (2011). Analytical performance of norovirus real-time RT-PCR detection protocols in Canadian laboratories. *Journal of Clinical Virology*. 50(2):109-113.
55. YEN, C., WIKSWO, M,E., LOPMAN, B,A., VINJE, J., PARASHAR, U,D., HALL, A,J., (2011). Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 53(6):568-571.
56. MARSHALL, J,A., BRUGGINK, L,D., (2011). The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8:1141-1149.
57. LOPMAN, B,A., REACHER, M., GALLIMORE, C., ADAK, G,K., GRAY, J,J., BROWN, D,W,G., (2003). A summertime peak of 'winter vomiting disease': surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*. 3:13.
58. WIDDOWSON, M,A., BULENS, S,N., BEARD, R,S., LANE, K,M., MONROE, S,S., LANGE, S., BRESEE, J,S., GLASS, R,I., (2011). Enhanced

surveillance of norovirus outbreaks of gastroenteritis in Georgia. *Public Health Reports*. 126(2):251-258.

59. YILMAZ, A., BOSTAN, K., ALTAN, EDA., MURATOĞLU, K., TURAN, N., TAN, D., HELPS, C., YILMAZ, H., (2011). Investigations on the frequency of norovirus contamination of ready-to-eat food items in İstanbul, Turkey, by using real-time reverse transcription PCR. *Journal of Food Protection*. 74(5):840-843.

60. YILMAZ, H., BOSTAN, K., TURAN, N., MURATOĞLU, K., YILMAZ, A., ÖZKUL, A.A., KOCAZEYBEK, B., HEPLS, C., (2010). Real-time PCR detection of norovirus in mussels collected from the bosphorus in İstanbul, Turkey. *Food and Environmental Virology*. 2(2):64-68.

61. UYAR, Y., ÇARHAN, A., ÖZKAYA, E., ERTEK, M., (2008). Türkiye’de 2008 yılında ortaya çıkan ilk norovirüs salgınının laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 42:607-615.

62. ÖZKAYA, A.A., (1999). Bakteriyel olmayan sporadik ishal olgularında kalısivirüs sıklığının RT-PCR ile araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi.

63. ÖZDAMAR, M., (2004). Pediyatrik nozokomiyal ishallerde viral etkenlerin saptanması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi.

64. ALTINDİŞ, M., BANYAI, K., KALAYCI, R., GULAMBER, C., KOKEN, R., YOLDAS, Y., AYKURT, P., MARTELLA, V., (2009). Frequency of norovirus in stool samples from hospitalized children due to acute gastroenteritis in Anatolia, Turkey, 2006-2007. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 41:685-688.

65. ALBAYRAK, N., YAĞCI-ÇAĞLAYIK, D., ALTAŞ, A.B., KORUKLUOĞLU, G., ERTEK, M., (2011) Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 68(1):9-15.

66. GÖNEN, İ., (2013). Management of a large outbreak caused by norovirus and campylobacter jejuni occurred in a rural area in Turkey. *Nobel Medicus*. 9(2):47-51.
67. ÇAN, G., YAVUZYILMAZ, A., ÇINARKA, H., DERELİ, M., TOPBAŞ, M., ÖZGÜN, Ş., (2011). Trabzon ili Sürmene ilçesi norovirüs salgını incelemesi-Temmuz 2010. *TAF Preventive Medicine Bulletin* 10(5):501-510.
68. HALL, A.J., LOPMAN, B.A., PAYNE, D.C., PATEL, M.M., GASTANADUY, P.A., VINJE, J., PARASHAR, U.D., (2013). Norovirus disease in the united states. *Emerging Infectious Diseases*. 19(8):1198-1205.
69. PARRA, G.I., ABENTO, E.J., SANDOVAL-JAIME, C., SOSNOVTSEV, S.V, BOK, K., GREEN, K.Y., (2012). Multiple antigenic sites are involved in blocking the interaction of GII.4 norovirus capsid with ABH histo-blood group antigens. *Journal of Virology*. 86(13):7414-7426.
70. ATMAR, R.L., ESTES, M.K., (2012). Norovirus vaccine development: next steps. *Expert Rev. Vaccines*. 11(9):1023-1025.
71. WESTRELL, T., DUSCH, V., ETHELBERG, S., HARRIS, J., HJERTGVIST, M., JOURDAN-DA SILVA, N., KOLLER, A., LENGLET, A., LISBY, M., VOLD, L., (2010). Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Eurosurveillance*. 15(12):3.
72. PATEL, M.M., WIDDOWSON, M.A., GLASS, R.I., AKAZAWA, J.V., PARASHAR, U.D., (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. 14(8):1224-1231.
73. OLDAK, E., SULIK, A., ROZKIEVICZ, D., LIWOCH-NIENARTOWICZ, N., (2012). Norovirus infections in children under 5 years of age hospitalized due to the acute viral gastroenteritis in northeastern Poland. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 31:417-422.
74. GLASS, R.I., NOEL, J., ANDO, T., FANKHAUSER, R., BELLLOT, G., MOUNTS, A., PARASHAR, U.D., BRESEE, J.S., MONROE, S.S., (2000). The

epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(2):254-261.

75. LOPMAN, B., (2006). Noroviruses: simple detection for complex epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*. 42(7):970-971.

76. CASTRICIANO, S., LUINSTRA, K., PETRICH, A., SMIEJA, M., LEE, C., JANG, D., PORTILLO, E., CHERNESKY, M., (2007). Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *Journal of Virological Methods*. 141(2):216-219.

77. MORILLO, S,G., LUCHS, A., CILLI, A., RIBEIRO, C,D., CALUX, S,J., CARMONA, R,C,C., TIMENETSKY, M,C,S,T., (2011). Norovirus 3rd Generation kit: An improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *Journal of Virological Methods*. 173(1):13-16.

78. VEGA, E., BARCLAY, L., GREGORICUS, N., WILLIAMS, K., LEE, D., VINJE, J.,(2011). Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 17(8): 1389-95.

79. GRAY, J,J., KOHLI, E., RUGGERI, F,M., VENNEMA, H., SANCHEZ-FAUQUIER, A., SCHREIER, E., GALLIMORE, C,I., ITURRIZA-GOMARA, M., GIRAUDON, H., POTHIER, P., BARTOLO, I,D., INGLESE, N., BRUIN, E., VEER, B,V,D., MORENO, S., MONTERO, V., LLANO, M,C., HÖHNE, M., DIEDRICH, S,M., (2007). European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14(10):1349-1355.

80. SANZ, J,C., REVILLA, A., FERNANDEZ, M., HERRANZ, N., MORENO, S., SANCHEZ-FAUQUIER, A., (2006). Assessment of two methods of antigenic detection by ELISA for the diagnosis of norovirus outbreaks. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 24(9):564-567.

81. DIMITRIADIS, A., MARSHALL, J,A., (2005). Evaluation of a commercial enzyme immunassay for detection of norovirus in outbreak

specimens. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 24:615-618.

82. SCHMID, M., OEHME, R., SCHALASTA, G., BROCKMANN, S., KIMMIG, P., ENDERS, G., (2004). Fast detection of norovirus using a real-time PCR assay and automated sample preparation. *BMC Infectious Diseases*. 4:15.

83. ZHANG, Q., JIN, M., CUI, S,X., LIU, N., LI, L., DUAN, Z,J., (2009). Study on effect of enzyme linked immunosorbent assay kits of norovirus. *The Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*. 23(3):227-228.

84. YOON, J,S., LEE, S,G., HONG, S,K., LEE, S,A., JHEONG, W,H., OH, S,S., OH, M,H., KO, G,P., LEE, C,L., PAIK, S,Y., (2008). Molecular epidemiology of norovirus infections in children with acute gastroenteritis in South Korea in November 2005 through November 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(4):1474-1477.

85. DOMINGUEZ, A., TORNER, N., RUIZ, L., MARTINEZ, A., BAARABEIG, I., CAMPS, N., GODOY, P., MINGUELL, S., PARRON, I., PUMARES, A., SALA, M,S., BARTOLOME, R., PEREZ, U., De SIMON, M., MONTAVA, R., BUESA, J., (2008). Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. *Journal of Clinical Virology*. 43:126-131.

86. MAUNULA, L., Von BONSDORF, C,H., (2005). Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002. *Journal of Clinical Virology*. 34(3):186-194.

87. TRAN, A., TALMUD, D., LEJEUNE, B., JOVENIN, N., RENOIS, F., PAYAN, C., LEVEQUE, N., ANDREOLETTI, L., (2010). Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(5):1943-1945.

88. ALTAY, A., BOZDAYI, G., MERAL, M., DALLAR BİLGE, Y., DALGIÇ, B., ÖZKAN, S., AHMED, K., (2013). Akut gastroenterit nedeniyle Ankara'da iki

farklı hastaneye başvuran 0-5 yaş arası çocuklarda norovirus enfeksiyonu sıklığının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 47(1):98-108.

89. AHMED, S,F., KLENA, J,D., MOSTAFA, M., DOGANTEMUR, J., MIDDLETON, T., HANSON, J., SEBENY, P,J., (2012). Viral gastroenteritis associated with genogrup II norovirus among U.S. military personnel in Turkey, 2009. *Plosone*. 7(5):e35791.

90. MACKAY, I,M., ARDEN, K,E., NITSCHKE, A., (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 30(6):1292-1305.

91. SHULMAN, L,M., HINDIYEH, M., MUHSEN, K., COHEN, D., MENDELSON, E., SOFER, D., (2012). Evaluation of four different systems for extraction of RNA from stool suspensions using MS-2 coliphage as an exogenous control for RT-PCR inhibition. *PloS One*. 7(7):e39455.

92. MONTEIRO, L., BONNEMAISON, D., VEKRIS, A., PETRY, K,G., BONNET, J., VIDAL, R., CABRITA, J., MEGRAUD, F., (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: helicobacter pylori model. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(4):995-998.