

NOROVIRUSGENOTYYPIN GII-4 AIHEUTTAMAN GASTROENTERIITIN TAUDINKUVA JA VAKAVUUS

Valve, Oona
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen laitos
Rokotetutkimuskeskus
Heinäkuu 2009

TIIVISTELMÄ

Tampereen yliopisto
Lääketieteen laitos
Rokotetutkimuskeskus

OONA VALVE: NOROVIRUSGENOTYYPIN GII-4 AIHEUTTAMAN GASTROENTERIITIN TAUDINKUVA JA VAKAVUUS

Kirjallinen työ, 24 s.

Ohjaajat: professori Timo Vesikari, tutkija Leena Teräväinen, tutkija Shang-Qin Zeng

Heinäkuu 2009

Avainsanat: lapsi, norovirus, gastroenteriitti, genotyyppi, taudinkuva

Tutkimuksen tarkoitus oli selvittää, aiheuttaako norovirusgenotyyppi GII-4 taudinkuvaltaan vaikeampia gastroenteriittejä kuin muut norovirusgenotyypit pienillä lapsilla. Tutkimuksessa seurattiin alle kaksivuotiaita suomalaislapsia kahden rotaviruskauden ajan mahdollisen gastroenteriitin varalta. Tässä tutkimuksessa huomioitiin vain noroinfektiot ja niistä primaariset noroinfektiot eli tapaukset, joissa lapsi sairasti norovirusinfektion ensimmäisen kerran elämässään. Näin saman lapsen useiden infektioiden mahdollinen suojavaikutus eliminoitiin. Primaarisia norovirusepisodeja oli yhteensä 155, joista 40 oli GII-4-positiivisia ja loput 88 muiden genotyyppien aiheuttamia. GII-4 aiheutti taudinkuvaltaan vaikeampia infektioita kuin muut genotyypit. GII-4-episodeissa ripuli kesti pidempään ($p = 0.006$), ripulikertoja vuorokauden aikana oli enemmän ($p = 0.003$) ja oksentelupäivien määrä episodin aikana oli suurempi ($p = 0.014$). Episodeille laskettiin taudinkuvan kliinistä merkitystä kuvaavat kokonaiscoret 20-pisteisen Vesikari score -menetelmän mukaan. Vakavien tautitapausten rajana pidettiin vähintään 11 pistettä. Kliininen score oli suurempi GII-4-tapauksissa (7,60) kuin muiden genotyyppien infektioissa (5,79) ($p = 0.001$). GII-4-ryhmässä oli vakavaksi luokiteltavia episodeja kuudella lapsella, kun taas muiden genotyyppien infektioissa kahdella lapsella. Pienillä lapsilla saatu tulos vastaa yleistä käsitystä siitä, että GII-4 aiheuttaa vaikeampia taudinkuvia kuin muut norovirukset.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	1
1.1 Kalikivirukset.....	1
1.2 Norovirusten rakenne, genomi ja luokittelu.....	2
1.3 Epidemiologia	3
1.4 Patogeneesi.....	5
1.5 Kliininen taudinkuva	6
1.6 Immunitetti	7
1.7 Komplikaatiot.....	8
1.8 Ehkäisy ja hoito	8
1.9 Diagnostiikka	9
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	11
2.1 Aineisto	11
2.2 Menetelmät.....	12
3 TULOKSET	15
4 POHDINTA	19
LÄHTEET	22

1 JOHDANTO

1.1 Kalikivirukset

Norovirukset (entisiltä nimiltään pienet pyöreät virukset = small round structured viruses, Norwalkin kaltaiset virukset) ovat ryhmä toisistaan antigeenisesti ja rakenteellisesti poikkeavia pieniä viruksia. Ne kuuluvat kalikivirusperheeseen, johon norovirusten lisäksi kuuluvat lako-, sapo- ja vesivirukset. Näistä jokaisella on omat tyyppilajinsa. (1)

Kalikiviruksilla on positiivisäikeinen, yksijuosteinen RNA-genomi, joka on järjestäytyneenä kahteen tai kolmeen avoimeen lukukehykseen (ORF = open reading frame) (1).

Kalikivirusten ikosahedraalinen kapsidi on rakentunut yhdestä päärakenneproteiinista, ja siinä on kuppimaisia syvennyksiä pinnalla, mistä virusperhe on saanut nimensäkin (calix = kuppi) (1). Kaikki neljä kalikivirussukua eroavat toisistaan kapsidiproteiinien aminohapposekvenssien perusteella, ja edelleen fylogeneettisten analyysien pohjalta eri sukujen sisällä virukset voidaan jakaa omiin genoryhmiinsä ja -tyyppeihinsä. Kalikivirukset satoine eri virustyyppineen ovat läheistä sukua pikornaviruksille (2).

Kalikivirukset aiheuttavat monenlaisia sairauksia, mutta vain noro- ja sapovirukset ovat ihmispatoogeneja. Norovirukset ovat tärkeimpiä ruoan välityksellä tarttuvien ripuli- ja oksennustautiepidemioiden aiheuttajia kaikenikäisillä maailmanlaajuisesti. Sapovirukset aiheuttavat lähinnä lievää pienten lasten ripulitautia, ja toisin kuin norovirukset, ne ovat harvinaisia ruoka- tai vesiperäisten epidemioiden aiheuttajia. (3, 4)

1.2 Norovirusten rakenne, genomi ja luokittelu

Norovirukset ovat pieniä, läpimitaltaan 37 nanometriä, vaipattomia viruksia, joiden perimä on noin 7,5 kiloemästä ja sisältää poly-A-hännän (2). Genomissa on kolme erillistä avointa lukukohtaa, ORF1–ORF3. ORF1 koodaa viruksen replikaatiossa tarvittavia proteiineja, ORF2 keskeistä rakenneproteiinia, kapsidiproteiinia VP1, ja ORF3 pienempää rakenneproteiinia VP2 (1). Norovirusten kapsidi on ikosahedraalinen ja koostuu 180 kapsidiproteiinin muodostamasta polypeptidistä, jonka molekyylipaino on 59 000 daltonia.

Norovirukset luokitellaan niiden perimän mukaan genoryhmiin ja edelleen genoryhmien sisällä genotyyppeihin (1). Luokittelu genoryhmiin tapahtuu tavallisesti viruksen kapsidiproteiinin (VP1) geenin tai polymeraasigeenien aminohapposekvenssien perusteella (5). Norovirukset jaetaan viiteen genoryhmään GI–GV (5). GI-ryhmän genotyyppejä tunnetaan 14, GII-ryhmän 17, GIII-ryhmän 2, GIV-ryhmän 1 ja GV-ryhmän 1 (5, 6). Ryhmät GI ja II ovat ihmisille tärkeimmät ja sisältävät suurimman osan tunnetuista genotyypeistä (5). GIV-virukset ovat aiheuttaneet vain satunnaisia tapauksia (7), eikä niiden merkitystä tunneta kovin hyvin. GIII- ja GV-ryhmien virukset sairastuttavat vain eläimiä, eikä ole todisteita siitä, että kyseiset virukset voisivat tarttua eläimestä ihmiseen (8).

1.3 Epidemiologia

Norovirukset ovat tärkeimpiä akuutin virusperäisen gastroenteriitin aiheuttajia maailmanlaajuisesti (7, 9–11). Niiden on arvioitu aiheuttavan noin 70–95 % kaikista ei-bakteeriperäisistä ja noin puolet kaikista gastroenteriittitapauksista (7, 10–12). Erityisesti virusdiagnoositiikan kehittyessä norovirukset ovat nousseet viime vuosina yleisimmiksi tunnistetuista epidemioiden aiheuttajista (3). Norovirukset voivat aiheuttaa vakavia episodeja sairaaloissa, joissa on paljon puolustuskyvyltään valmiiksi heikompia potilaita (13, 14). Pienillä lapsilla, vanhuksilla, immuunipuutteisilla ja kroonisesti sairailta infektio voikin olla hengenvaarallinen. Kehitysmaissa norovirusten on arvioitu aiheuttavan jopa 200 000 kuolemantapausta lapsilla vuosittain (15).

Norovirukset aiheuttavat sekä lasten endeemistä gastroenteriittiä ja myös laajoja epidemioita. Lisäksi jatkuvasti tavataan sporadisia, satunnaisia norovirustapauksia. Norovirusepidemiat painottuvat kevättalveen, mutta yksittäisiä infektioita ilmenee ympäri vuoden (9).

Norovirukset tarttuvat herkästi ja aiheuttavat tautiryppäitä ja epidemioita erityisesti ravintoloissa, sairaaloissa, kouluissa, päiväkodeissa sekä lomakohteissa, kuten risteilyaluksilla ja leirintäalueilla, missä ihmiset ovat läheisessä kontaktissa toisiinsa ja syövät samaa ruokaa (7). 1990-luvun alusta norovirukset ovat lisänneet osuuttaan ruokamyrkytysepidemioiden syynä (3). Tartunnan välittäjinä ovat olleet usein saastuneet ulkomaiset pakastemarjat tai osterit (3, 10). Infektoituneet elintarviketyöntekijät sekä norovirusten saastuttama talous- ja uimavesi ovat myös useasti olleet epidemian tartunnanlähteenä (3). Lisäksi norovirukset ovat tavallisia turistiripulin aiheuttajia.

Lapsilla norovirus on rotaviruksen jälkeen tärkein gastroenteriitin aiheuttaja niin yleisyyden kuin kliinisen vaikeusasteen perusteella (16, 17). Tuoreessa italialaisessa yhden vuoden tutkimuksessa havaittiin norovirusten olleen jopa yleisimpiä akuutin ripulitaudin aiheuttajia myös lapsilla (18). Norovirukset aiheuttavat viidenneksen kaikista lasten gastroenteriiteistä

(16). Jo 1990-luvun alussa osoitettiin, että suomalaisista lapsista noin puolet on sairastanut norovirusinfektion kahden vuoden ikään mennessä (19).

Noroviruksille on tyypillistä suuri geneettinen muuntuvuus. Norovirukset ovat ryhmä geneettisesti ja antigeenisesti erilaisia virusvariantteja, jotka kiertävät maailmalla samanaikaisesti ja aiheuttavat vatsatauteja (9, 20). Genotyypit kehittyvät jatkuvasti ympäristön paineessa, jolloin syntyy uusia kantoja. Uusilla varianteilla on yleensä suurempi virulenssi ja näin ne ovat tehokkaita saamaan aikaan suuria epidemioita (20, 21). Genoryhmistä GII-ryhmä on huomattavasti yleisempi ja vallitsevampi kuin GI (7, 9, 16).

Genoryhmän II sisällä genotyyppi GII-4 on nykyisin noroviruksista aktiivisin (9, 18, 22). Se on merkittävä genotyyppi niin yksittäisissä noroinfektioissa kuin epidemioissakin (4, 9, 7, 17, 18). Sen eri variantit ovat aiheuttaneet kaikki maailmanlaajuiset noroepidemiat 1990-luvulta lähtien. Tänä aikana on esiintynyt neljä GII-4-norovirusepidemiaa vuosina 1995, 2002, 2004 ja 2006, joiden aikana uudet variantit ovat ilmestyneet ja korvanneet vanhat (18, 21). Viimeisimmät tunnetut GII-4-variantit kiersivät vuonna 2006 maailmalla samanaikaisesti: variantti 2006a havaittiin ensimmäisen kerran joulukuussa 2005 Englannissa ja Uudessa-Seelannissa ja variantti 2006b vuoden 2006 kevään aikana ympäri Eurooppaa (23). 2006b:stä on tullut sittemmin vallitsevin (17). Genotyypin GII-4 on havaittu aiheuttavan eniten sairaalakäyntejä vaativia norovirusinfektioita lapsilla (22) sekä infektoivan herkimmin vanhuksia hoitokodeissa (7), mikä kuvastaa sitä, että puolustuskyvyltään heikoimmat henkilöt ovat alttiimpia kyseiselle virukselle. Genotyypin GII-4 aktiivinen muuntuminen perustuu mutaatioihin viruksen proteiinien rakenteissa sekä mahdollisesti myös vilkkaaseen rekombinaatioon (21, 22).

1.4 Patogeneesi

Norovirukset ovat hyvin kestäviä ja säilyvät pitkään ympäristössä, esimerkiksi kylmissä vesistöissä ja pakastetuotteissa. Ne voivat säilyä pitkään myös eritteissä, esimerkiksi oksennuksessa useita vuorokausia, ja ne kestävät hyvin lämpöä ja happamuutta. Norovirukset ovat resistenttejä monille desinfiointiaineille. Ne leviävät ja infektoivat herkästi. Jopa noin 10–100 viruspartikkelia riittää tartuttamaan (24). Norovirustartunta voi tapahtua suoraan ihmisestä toiseen aerosolin ja kosketuksen kautta (fekaali-oraalitartunta) tai epäsuorasti viruksella kontaminoitujen pintojen sekä erityisesti epidemioissa elintarvikkeiden ja veden välityksellä.

Norovirus pääsee kulkeutumaan nielun kautta mahalaukuun ja suolistoon, missä se sitoutuu epiteelisolujen pintaan. Viruksen replikaatiota ei tunneta hyvin, koska virusta ei ole pystytty viljelemään. Tiedetään kuitenkin, että norovirus aiheuttaa ohutsuolen limakalvolla tulehduksen. Suolistossa, erityisesti ohutsuolen alkupäässä, on nähtävissä kryptien ja villusten hyperplasiaa, lisääntynyttä enterosyyttien apoptoosia ja tulehdussolujen kertymistä epiteelin alaiseen kudokseen, mikä näkyy epätasaisena, laikukkaana limakalvon vauriona. Tulehduksen seurauksena suoliston normaali rakenne muuttuu, motiliteetti vaimenee, imeytymispinta-ala vähenee ja ravintoaineiden imeytyminen suolesta häiriintyy. Muutoksia on havaittu ennen oireisen taudin alkua sekä oireettomilla noroviruksen saaneilla henkilöillä. Oireisen norovirusinfektion mekanismeja ei tunneta, mutta edellä mainitut tekijät saattavat ainakin osittain selittää ripulin syntymekanismiin. Suolistossa on myös havaittu entsyymitoiminnan muutoksia, kuten sakkaraasin, trehalaasin ja alkalisen fosfataasin vähentynyttä aktiivisuutta norovirusinfektion aikana, ja väheneminen on ollut yhteydessä oireiseen taudinkuvaan. (24)

1.5 Kliininen taudinkuva

Norovirusgastroenteriitin inkubaatioaika on lyhyt, minkä jälkeen keskimäärin 24–48 tunnin kuluttua ilmenevät ensimmäiset oireet. Norovirukset aiheuttavat etenkin talvi- ja kevätkuukausiin ajoittuvaa ripuli- ja oksennustautia (winter vomiting disease), mutta taudinkuva voi vaihdella hyvin paljon yksilöiden välillä (4, 13). Tauti alkaa usein äkillisesti ilman esioireita, ja dominoivat oireet ovat ripuli, oksentelu, pahoinvointi ja vatsakrampit. Lisäksi usein voi esiintyä kuumetta, päänsärkyä, viluntunnetta, lihaskipuja, heikotusta ja ruokahaluttomuutta. Uloste on vetistä, eikä siinä yleensä ole limaa tai verta (13).

Oireet kestävät keskimäärin 1–3 päivää, mutta taudinkesto voi vaihdella vuorokaudesta kahteen viikkoon. Vaikeita sairaalahoitoja vaativia tapauksia on myös kuvattu (25). Arviolta jopa kolmasosa tartunnoista voi olla subkliinisiä (26). Infektion aikana muodostuu uutta virusta, joka erittyy suurina määrinä ulosteeseen ja oksennukseen (3). Akuutti infektiovaihe on tartuttavuuden kannalta tärkein, mutta paranemisen jälkeenkin virusta voi vielä erittyä ulosteeseen 1–3 viikon ajan, jolloin oireettomat henkilöt voivat tietämättään levittää virusta (4, 26). Pienten lasten on havaittu erittävän virusta kauemmin kuin vanhempien henkilöiden (4).

Vaikeusasteeltaan noroinfektiot ovat usein lievempiä kuin lapsilla vakavimpia virusperäisiä ripulitauteja aiheuttavat rotavirusinfektiot, mutta vaikeampia kuin muiden ripulivirusten, kuten astro- ja adenovirusten, aiheuttamat infektiot (4, 16).

1.6 Immunitaetti

Norovirus aiheuttaa tautia kaikenikäisillä (4, 20). Infektion jälkeen kehittyy noin 6–14 viikon pituinen suoja, mutta pitkäkestoista immunitaettia ei ole. Sairastettu norovirusinfektio näyttää suojaavan vain saman genotyypin infektiolta, ja genotyypin uusintainfektio on mahdollista jo noin puolen vuoden päästä. (27) Suojamekanismia ei tunneta.

Aivan kaikki eivät sairastu norovirusinfektioon, ja alttiuden infektiioon on havaittu riippuvan perimästä (27). Sitoutuessaan suolen seinämään norovirukset käyttävät reseptoreinaan ihmisen veriryhmäantigeenejä, ABO- ja Lewis-antigeenejä. Ne ovat epiteelisolujen pinnalla olevia hiilihydraattirakenteita, joiden suhteen on vaihtelua väestössä. Alttius noroinfektioon riippuu näistä antigeeneistä. On osoitettu, että henkilöt, joilla on veriryhmä B, ovat vähemmän alttiita norovirusinfektioille, ja että henkilöillä, joilla on veriryhmä O, riski on suurin (27). Arvioidaan, että noin 20 % väestöstä olisi resistenttejä norovirusinfektioille (27). Kuitenkin eri noroviruskantojen sitoutuminen eri reseptoreihin vaihtelee, joten toleranssi yhtä genotyyppiä tai genotyypin varianttia kohtaan ei välttämättä suojaa muilta norovirusgenotyypeiltä (28).

Korkeat vasta-ainepitoisuudet eivät takaa suojaa norovirusinfektiolta (26). Kuitenkin myös opitun immunitaetin ja vasta-aineiden tuotannon on havaittu olevan yhteydessä alttiuteen sairastua norovirusinfektioon (19, 27, 28). Noroviruksen vasta-aineita saadaan jo varhaisessa iässä, niiden määrä jatkaa kasvua lapsuudesta aikuisuuteen asti ja ne säilyvät läpi elämän (29). Taudinkuvan on huomattu lieventyvän aikuisiällä, mikä voi kertoa osittaisesta suojasta infektiolle (4).

1.7 Komplikaatiot

Norovirusten aiheuttama tauti paranee itsestään. Kuolleisuus liittyy taudin aikana kehittyvään nestehukkaan. Lapset ja vanhukset ovat herkimpiä ripulin aiheuttamalle kuivumalle, ja erityisesti iäkkäillä potilailla ripulin on todettu kestävän normaalia pidempään (14, 30). On myös viitteitä siitä, että immuunipuutteisilla infektio voi kroonistua, jolloin potilaat erittävät virusta jopa kuukausia (31).

Kehittyneissä maissa kuolemat ovat harvinaisia. Riskit ovat liittyneet lähinnä taustalla oleviin kroonisiin sairauksiin tai yleiskunnon laskuun, jolloin potilas on voinut aspiroida oksennustaan ja tukehtua siihen (14, 32). Lasten, vanhusten ja kroonisesti sairaiden yleinen kunnon heikentyminen altistaa oksennuksen aspiraatiolle, jolloin tukehtumisvaara on suurempi. Kehitysmaissa norovirusgastroenteriittiin liittyy kuitenkin huomattavaa kuolleisuutta (15), joka johtuu hoitamattomasta nestehukasta.

1.8 Ehkäisy ja hoito

Noroviruksen aiheuttamaan tautiin ei ole olemassa spesifistä lääkehoitoa.

Norovirusgastroenteriitin hoidossa tärkeää on huolehtia nestetasapainosta ja estää potilaan kuivuminen. Aikuisille voi antaa kipulääkettä, ripulilääkkeitä sekä pahoinvointia ja oksentelua hillitseviä lääkkeitä, mutta lapsille lääkehoitoa ei anneta.

Norovirusinfektion kontrollointi on hankalaa, sillä norovirukset ovat hyvin resistenttejä ja tarttuvat herkästi. Norovirusta vastaan ei ole saatavissa rokotetta (33), joten ehkäisy perustuu lähinnä viruskosketuksen välttämiseen. Taudin ehkäisemiseksi ja kulun rajoittamiseksi potilaiden eristäminen sairaaloissa ja päiväkodeissa sekä hyvä käsihygienia ovat tarpeen.

1.9 Diagnostiikka

Ensimmäinen kalikivirus löydettiin vuonna 1968 Norwalkissa, Ohiossa ilmenneen vatsatautiepidemian yhteydessä (34). Kuitenkin vasta 1990-luvulla molekyylietekniikan kehityksen myötä kyseinen Norwalk-virukseksi nimetty aiheuttajapatogeeni pystyttiin varmasti tunnistamaan kalikivirukseksi, kun sen perimä kloonattiin ja selvitettiin käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktio-tekniikan (RT-PCR) avulla (35). Tämän jälkeen useita norovirustyypppejä on tunnistettu, ja norovirusten luokittelu ja diagnostikka on kehittynyt huimaa vauhtia. Norwalk-virus onkin norovirusten tyyppivirus, jota on tutkittu eniten ja joka on siten lisännyt tietämystä norovirusinfektioiden kulusta.

Norovirusten tutkiminen on erittäin haasteellista. Norovirusten lajirunsauden vuoksi antigeeninosoitusmenetelmien kehittäminen on ollut vaikeaa. Lisäksi niillä on hyvin suppea isäntäspesifisyys, eli ihmisille tautia aiheuttavat norot eivät tartuta eläimiä, joten ei ole olemassa sopivaa koe-eläinmallia niiden tutkimiseen (2). Norovirukset eivät myöskään kasva soluviljelmissä (2). Norovirusten tutkiminen onkin perustunut paljolti epidemioiden seurantaan, vapaaehtoistutkimusten varaan sekä norovirusinfektioiden diagnostikassa tärkeään menetelmään, polymeraasiketjureaktiotekniikkaan.

Norovirusten diagnostikassa käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktiolla näytteestä eristettyä viruksen perimää, RNA:ta, käännetään ja monistetaan entsyymaattisesti DNA:ksi.

Monistettavat jaksot sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun RNA-jakson välissä. Testissä käytetään tunnettuihin genomien alueisiin valmistettuja alukkeita, jotka emäsparisäännön mukaisesti hakeutuvat vastaavaan alueeseen näytteessä. Yleensä alukkeet on suunniteltu niin, että ne hakeutuvat viruksen genomien tiettyihin konservoituneisiin alueisiin, kuten RNA-polymeraasientsyymiin tai kapsidiproteiinin geenin alueeseen genomissa, jolloin mahdollisimman moni virus voidaan tunnistaa. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet RNA-näytteeseen, käänteiskopioijaentsyymi alkaa muodostaa kopiota

alukkeiden määräämältä genomien alueelta. Tämä toistetaan useita kertoja polymeraasiketjureaktiolla, jolloin DNA:n määrä lisääntyy moninkertaisesti. Monistettu DNA analysoidaan agarosigeelielektroforeesissa, jossa erikokoiset virustyypit erottuvat toisistaan koon (emäsparien lukumäärän) perusteella. Näin virus voidaan alustavasti tunnistaa esimerkiksi norovirukseksi. Tämän jälkeen kyseisen DNA-tuotteen emäsjärjestys sekvensoidaan, jolloin edelleen virusnäytteen genotyyppi voidaan selvittää. Virusnäytteet saadaan yleensä potilaiden ulosteista, epidemioissa myös vedestä tai muista ympäristönäytteistä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Aineisto

Tämä tutkimus on osa suurempaa Tampereella toteutettua rokotetutkimusta, jossa on tutkittu erään monovalentin ihmisen rotavirusrokotteen (G1, RIX4414) tehoa ja immunogeenisyyttä alle kaksivuotiailla suomalaislapsilla. Rokotetutkimus oli satunnaistettu, kaksoissokkoutettu ja placebokontrolloitu. Siinä 405:lle satunnaisesti valitulle terveelle vauvalle annettiin joko tutkittavaa virusrokotetta tai placebovalmistetta suhteessa 2:1 lasten ollessa 2 ja 4 kuukauden ikäisiä. Tämän jälkeen lapsia seurattiin mahdollisen akuutin gastroenteriitin varalta kahden rotavirusepidemian ajan vuosina 2000–2002 lasten ollessa 2 kuukauden – 2 vuoden ikäisiä. Tutkimukseen osallistuneet lapset olivat syntyneet 21.8.–16.11.2000 kuudella paikkakunnalla (Tampere, Espoo, Turku, Lahti, Pori ja Jyväskylä). Vain terveet lapset, jotka olivat syntyneet aikaisintaan 36. raskausviikolla, saivat osallistua tutkimukseen. Heidän vanhempiaan lähestyttiin ensin kirjein ja sitten puhelimitse. Noin 40 % vanhemmista suostui tutkimukseen.

(36)

2.2 Menetelmät

Seuranta-aikana kerättiin tiedot kaikista tutkimukseen osallistuneiden 405 lapsen gastroenteriittitapauksista. Aina kun lapsi sairastui ripulitautiin, vanhemmat kirjasivat tiedot lapsen taudinkuvasta: ripulin ja oksentelun keston päivissä, ripuli- ja oksennuskertojen määrät vuorokaudessa sekä mahdollisen kuumeen ja sen korkeimman lukeman episodin aikana. Lisäksi sairastuneen lapsen mahdollinen kuivuma ja sairaalahoidon tarve rekisteröitiin. Lapsilta otettiin ulostenäytteet, joista määritettiin ensisijaisesti rotavirusnäytteet. Myöhemmin samat ulostenäytteet tutkittiin norovirusten suhteen ja tunnistuksessa käytettiin käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktiotestiä. Virusten RNA eristettiin näytteestä, minkä jälkeen se käännettiin ensin DNA:ksi käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktiomenetelmällä. Tämän jälkeen DNA monistettiin polymeraasiketjureaktiomenetelmällä moninkertaiseksi. Tunnistuksessa käytetyt alukkeet oli suunniteltu viruksen genomien konservoituneelle RNA-polymeraasigeenin alueelle, joka sijaitsee kalikiviruksilla genomien lukukohdan ORF1 lopussa. Kyseiset alukkeet pystyvät tunnistamaan sekä noro- ja sapovirusia. Polymeraasiketjureaktion jälkeen monistettu DNA analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla virustyyppien tunnistamiseksi: norovirusta vastasi 331 emäsparin suuruinen DNA-pätkä. Lopuksi emäsjärjestykset sekvensoitiin ja norovirusten genotyypit selvitettiin. Genotyypit GII-4 varmistettiin vielä polymeraasiketjureaktiolla, jossa käytettiin kapsidiproteiinin geeniä kohtaan suunniteltuja alukkeita. Ulostenäytteiden noroviruspitoisuudet mitattiin myös kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktio-menetelmällä (37).

Jokaista sairastumiskertaa käsiteltiin erillisenä tapauksena, joten tautitapauksia ja ulostenäytteitä saatiin yhteensä 485. Näistä noropositiivisia tapauksia oli 155 (37). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli verrata norovirusgenotyypin GII-4 aiheuttamia pienten lasten primaarisia gastroenteriittejä muiden norovirustyyppien aiheuttamiin tapauksiin. Niinpä tässä tutkimuksessa on tutkittu vain primaarisia noroinfektioita eli tapauksia, joissa lapsi on sairastunut ensimmäisen kerran norovirusgastroenteriittiin. Osa noroviruksen saaneista

lapsista oli sairastanut noroinfektion useammin kuin kerran, joten heillä aikaisemmat noroinfektiot olisivat saattaneet vaikuttaa seuraaviin infektiioihin suojaavasti. Aineistoon otettiin yhteensä 128 tapausta, joiden katsottiin olevan primaarisia noroinfektioepisodeja. 155 tapauksen joukossa oli siis 27 tapausta, joissa oli toistuvia norovirusinfektioita samalla lapsella.

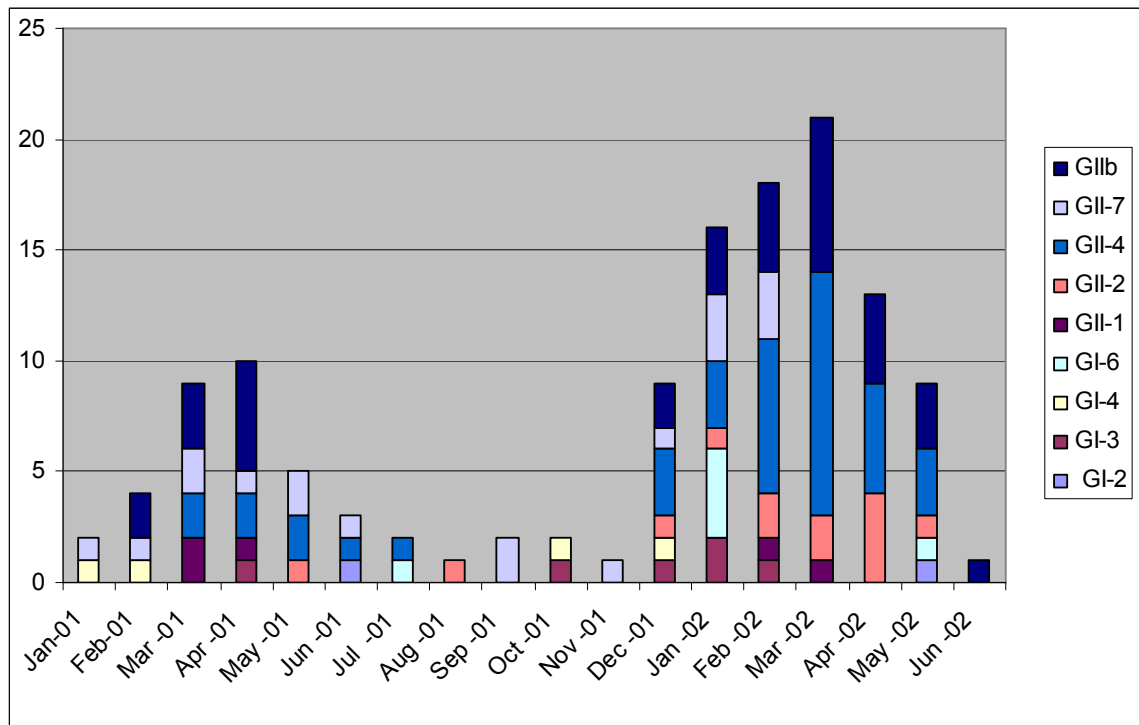
Tiedot ulostenäytteistä löytyneiden virusten genotyypeistä, virusmääristä sekä valmiiksi kerätyt tiedot noropositiivisten tapausten kliinisistä taudinkuvista kirjattiin MS Excel - tietokantaohjelmaan. Jokaisesta tautitapauksesta syötettiin erikseen tiedot ripulin kestosta, ripulikertojen lukumäärästä pahimmillaan episodin aikana, oksentelun kestosta, oksennuskertojen lukumäärästä pahimmillaan episodin aikana, mahdollinen kuume ja kuivuma sekä jos lapsi oli joutunut sairaalahoitoon tai saanut oraalista nesteytystä. Kaikille näille tekijöille laskettiin episodikohtaisesti myös kliinistä merkitystä kuvaavat pisteet eli scoret ja edelleen yksittäisten pisteiden summasta kyseiselle episodille kokonaispisteet eli kokonaisscore. Tämä tapahtui 20-pisteisen Vesikari score -menetelmän mukaan (38, taulukko 1). Kokonaisscore kuvaa yksittäisen taudinkuvan kliinistä vakavuutta kokonaisuudessaan ottaen huomioon niin ripuloinnin, oksentelun, kuumeilun, kuivuman kuin mahdollisen sairaalahoidon. Suurimmat mahdolliset pisteet ovat 20, ja vakavan episodin rajana pidetään vähintään 11 pistettä. Kirjaamisen ja pisteytyksen jälkeen verrattiin genotyypin GII-4 ja muiden genotyyppien aiheuttamia tautitapauksia toisiinsa suoraan tutkimalla eri oireita ja tekijöitä sekä episodeille laskettujen kokonaisscore -arvojen mukaan. Sairastuneiden lasten iät infektion tapahtumahetkellä selvitettiin ja tutkittiin, eroavatko ne genotyypin GII-4 ja muiden genotyyppien aiheuttamissa infektioiden. Myös sairastuneen lapsen iän ja taudinkuvan välistä yhteyttä verrattiin tutkittavissa ryhmissä. Lisäksi ulosteen viruspitoisuutta ja siten viruksen erittymistä verrattiin GII-4 ja muiden genotyyppien tapauksissa. Datan käsittely ja tulosten analysointi tapahtui SPSS-ohjelman (versio 15.0) avulla.

Taulukko 1. Vesikari score -menetelmä (38).

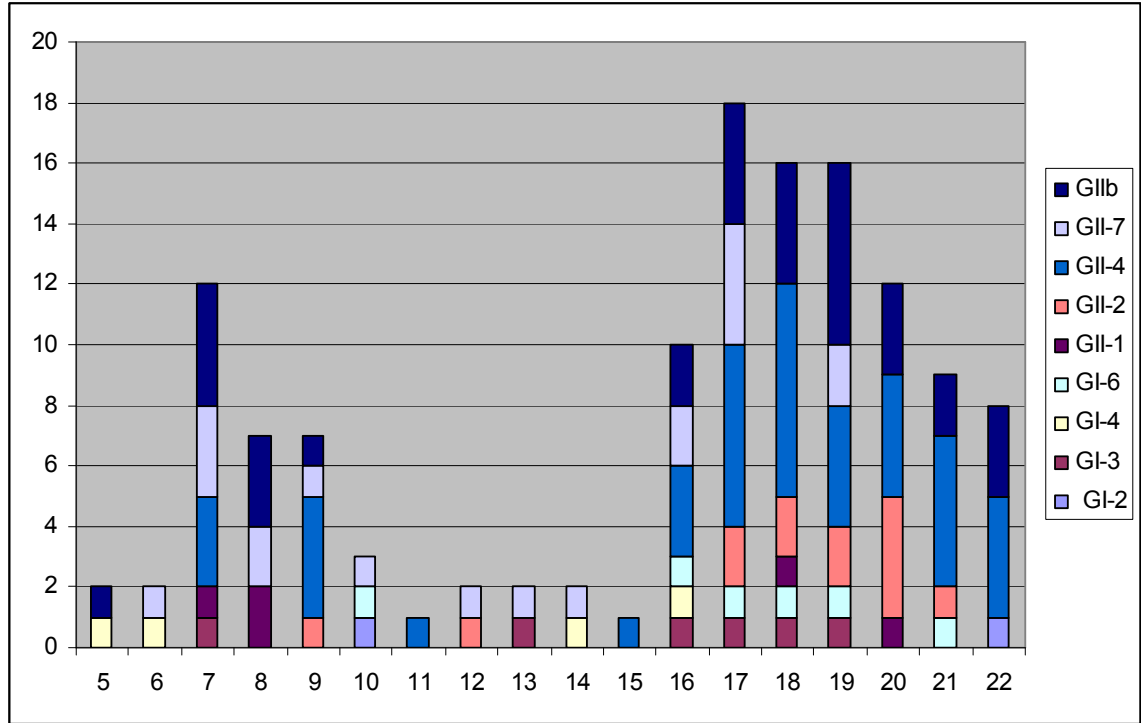
Oire tai merkki		Kliininen score
Ripulin kesto päivissä	1–4	1
	5	2
	6–	3
Ripulikertojen lukumäärä pahimmillaan yhdessä vrk:ssa episodin aikana	1–3	1
	4–5	2
	6–	3
Oksentelun kesto päivissä	1	1
	2	2
	3–	3
Oksennuskertojen lukumäärä pahimmillaan yhdessä vrk:ssa episodin aikana	1	1
	2–4	2
	5–	3
Kuume (°C) pahimmillaan episodin aikana	37.1–38.4	1
	38.5–38.9	2
	39–	3
Kuivuma	1–5 %	2
	6 %–	3
Hoito	Ei mitään	0
	Oraalinen nesteytys	1
	Sairaalaan joutuminen	2

3 TULOKSET

Kaikista 128 primaarisesta norovirusinfektiosta GII-4-positiivisia oli 40 (31,25 %) ja muiden genotyyppien aiheuttamia tapauksia 88 (68,75 %). Yhteensä 9 eri genotyypin havaittiin aiheuttavan norovirusgastroenteriittejä tutkittavissa lapsissa. Episodeista 48 ilmeni ensimmäisenä seurantakautena vuonna 2001 ja loput 80 vuonna 2002. GII-4 aiheutti ripuliepisodeja molempina vuosina. Kuvasta 1 nähdään norovirusgenotyyppien osuudet ja ajallinen jakautuminen ja kuvaan 2 on merkitty sairastuneiden lasten iät infektion tapahtuessa.



Kuva 1. Genotyyppien osuudet ja ajallinen jakauma tutkimusajanjakson aikana.



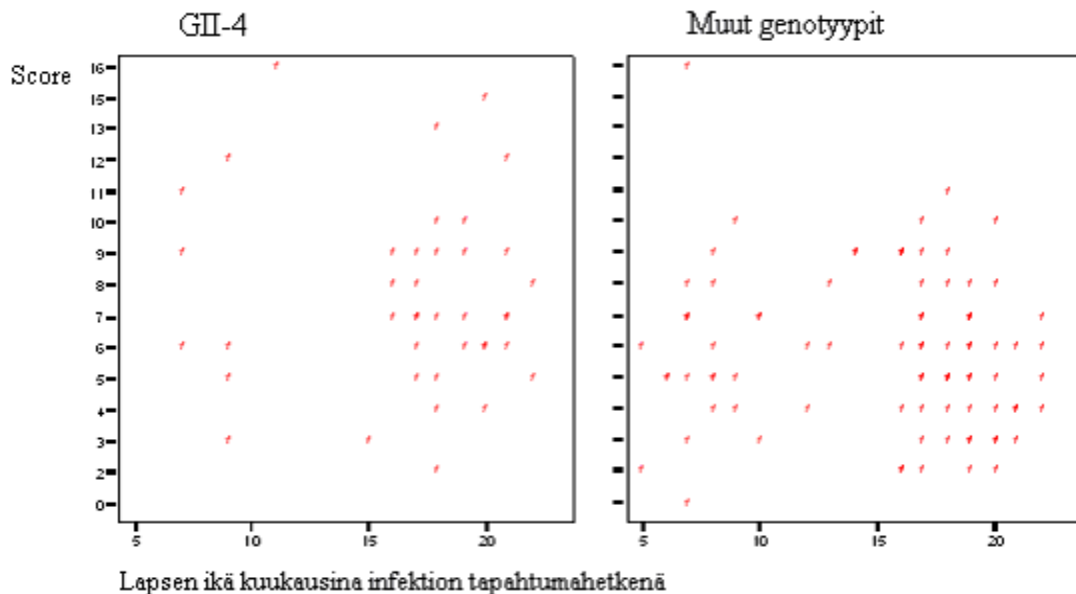
Kuva 2. Lasten iät sairastumishetkellä eri genotyyppien aiheuttamissa infektioissa.

Vaaka-akselilla lasten iät kuukausina, pystyakselilla genotyypit ja niiden määrät kussakin ikäryhmässä.

Kaikista 40:sta GII-4-tapauksesta ripulia oli 32:lla (80 %), oksentelua 36:lla (90 %), kuumetta (vähintään 37 °C) 31:llä (77,5 %) ja 1–5 %:n kuivumaa 1:llä (2,5 %).

Sairaalahoitoa ja oraalista nesteytystä vaati 1 (2,5 %). Tyypillisessä tautitapauksessa ripuli kesti 2 päivää (md = 2), ulostamiskertojen määrä vuorokaudessa oli pahimmillaan 4 (md = 4), oksentelu kesti 2 päivää (md = 2), oksennuskertojen määrä vuorokaudessa oli pahimmillaan 3 (md = 3) ja kuumetta oli keskimäärin 37,8 °C. Muilla genotyypeillä ripulia oli 55:llä (62,5 %), oksentelua 75:llä (85,2 %) ja kuumetta 55:llä (62,5 %). Kuivumaa oli 5:llä, joista 1–5 %:n kuivumaa 3:lla (3,4 %) ja yli 5 %:n kuivumaa 2:lla (2,3 %). Oraalista nesteytystä sairaalassa vaati 2 (2,3 %). Tyypitapauksessa ripuli kesti päivän (md = 1), ulostamiskertojen määrä vuorokaudessa oli pahimmillaan 3 (md = 3), oksentelu kesti päivän (md = 1), oksennuskertojen määrä vuorokaudessa oli pahimmillaan 3 (md = 3) ja kuumetta oli keskimäärin 37,8 °C.

Genotyyppi GII-4 aiheutti kliiniseltä taudinkuvaltaan vaikeampia ripulitauteja kuin muut genotyypit pienillä lapsilla. GII-4-episodeissa ripuli kesti pidempään ($p = 0.006$, Mann-Whitney) ja ripulikertoja vuorokauden aikana oli enemmän ($p = 0.003$, Mann-Whitney). Myös oksentelupäivien määrä episodin aikana oli suurempi GII-4-episodeissa ($p = 0.014$, Mann-Whitney). Tautiepisodin vakavuutta kuvaava kliininen score oli suurempi GII-4-tapauksissa (7,60) kuin muiden genotyyppien infektioiden (5,79) ($p = 0.001$, riippumaton t-testi), ja GII-4-ryhmässä oli vakaviksi luokiteltavia episodeja 6 lapsella kun muiden genotyyppien episodeissa vakavia episodeja oli vain 2 lapsella. Ulosteen virusmäärät eivät eronneet merkitsevästi GII-4- ja muiden genotyyppien infektioiden ($p = 0.479$, Mann-Whitney). Infektioita ilmeni kummassakin ryhmässä enemmän toisena ikävuotena, mutta lasten ikäjakaumassa ei ollut merkitsevää eroa GII-4- ja muiden genotyyppien infektioiden ($p = 0.093$, t-testi). Sairastuneen lapsen iän ja taudinkuvan vaikeuden välillä ei löydetty korrelaatiota GII-4 tai muiden genotyyppien tapauksissa (kuva 3).



Kuva 3. Kliininen score sairastuneen lapsen iän funktiona ryhmissä GII-4 ja muut genotyypit.

	GII-4			Muut			P-arvo
	N (%)	Mediaani	Kvartiilit	N (%)	Mediaani	Kvartiilit	
			25			25	
	40 (32 %)		50	85 (68 %)		50	
			75			75	
Ripuli,			1,00			0,00	
Kesto		2,00	2,00		1,00	1,00	0.006
			3,00			2,00	
Ripulikerrat			1,00			0,00	
vrk aikana		4,00	4,00		3,00	3,00	0.003
			6,00			4,00	
Oksentelu,			1,00			1,00	
Kesto		2,00	2,00		1,00	1,00	0.014
			2,75			2,00	
Kokonais-							
score		7,60*	3,103**		5,79*	2,549**	0.001

*Keskiarvo

**Keskihajonta

Taulukko 2. Merkitsevät erot ja niitä kuvaavat p-arvot GII-4- ja muiden genotyyppien aiheuttamissa infektoissa. Sarakkeissa mediaanit / keskiarvot ja kvartiilit / keskihajonnat oireille tutkittavissa ryhmissä GII-4 ja muut genotyypit.

4 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, eroavatko taudinkuvat genotyypin GII-4 aiheuttamissa gastroenteriiteissä kliinisesti muiden norogenotyyppien aiheuttamista infektioista alle kaksivuotiailla suomalaislapsilla. Tutkimuksen mukaan genotyypin GII-4 aiheuttama infektio olisi kliinisesti vaikeampi taudinkuvaltaan kuin muut norovirusinfektiot. Erityisesti GII-4-infektioissa ripuli ja oksentelu kestävät pidempään, mikä voi heikentää yleiskuntoa. Kuumeilussa, kuivumisessa sekä oraalisen nesteytyksen tai sairaalahoidon tarpeessa ei havaittu merkitsevää eroa GII-4- tai muiden genotyyppien aiheuttamien infektioiden välillä. Taudinkuvaan ei vaikuttanut lapsen ikä sairastumishetkellä.

Tutkimuksen tulos vastaa vuosina 2005–2006 Nicaraguassa, Keski-Amerikassa vastaavasta aiheesta tehtyä tutkimusta, jossa GII-4-infektioon sairastuneet lapset sairastivat tautia kauemmin (39). Tiedetään, että genotyyppi GII-4 on ollut vallitseva ja sen aktiivista muuntumista on tutkittu paljon. Herää kysymys, miksi yksi genotyyppi on noussut näin merkittäväksi yli muiden ja miksi se aiheuttaa vaikeampia taudinkuvia? Tiedetään, että taudinkuvaan vaikuttaa se, onko kyseessä ensimmäinen vai uusintainfektio ja siten infektioiden myötä syntyvä immuniteetti, mutta tässä tutkimuksessa käsiteltiin vain primaari-infektioita, kun uusintainfektioiden suojavaikutus eliminointiin. Joissain tutkimuksissa viruksen erittymisen ja ulosteen viruspitoisuuden on huomattu korreloivan taudinkuvan kanssa (30, 39), mutta samaa yhteyttä ei tässä tutkimuksessa havaittu. Toisaalta viruksen erittymiseen voivat vaikuttaa myös monet muut tekijät, kuten potilasnäytteiden keräyspäivät ja yksilölliset tekijät. Taudinkuvaan voivat myös vaikuttaa vauriot esimerkiksi ruuansulatuskanavan epiteelissä tai seinämän nukkalisäkkeissä. Kiinnostava kysymys onkin, mitkä ominaisuudet tekevät genotyypistä GII-4 niin virulentin. Aktiivisen muuntumisen ohella sen yliasemaan voivat vaikuttaa esimerkiksi sen kapsidiominaisuudet ja siten viruksen

kestävyys erilaisissa olosuhteissa, voimakkaampi sitoutuminen suoliston solujen reseptoreihin ja veriryhmiin, tehokkaampi replikaatio sekä laajempi isäntäkatras.

Norovirusten vaikean diagnostiikan vuoksi on mahdollista, että osa viruksista on tunnistettu väärin. Tutkimuksessa käytettiin virustyyppitykseen käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktio-menettelmää. Koska testissä käytettiin vain yhteen genomien alueeseen, RNA-polymeraasigeenin kohtaan suunniteltuja alukkeita, ja koska norovirukset ovat perimältään hyvin laaja ryhmä, ei yksittäinen alukepari välttämättä tunnista kaikkia norovirusnäytteistä. Polymeraasiketjureaktiotekniikka on myös hyvin herkkä, joten väärin positiivisten tulosten mahdollisuus voi lisääntyä esimerkiksi tutkimuksen yhteydessä näytteiden kontaminoituessa viruksella. On myös mahdollista, että aluke reagoi näytteessä olevien muiden, epäspesifien nukleiinihappojen kanssa, jotka eivät kuitenkaan ole diagnosoitavista viruksista peräisin, ja näin aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Lisäksi samat alukkeet pystyivät kiinnittymään myös sapovirusiin. Toisaalta tätä tutkimusta varten oli selvitetty norovirukset genotyypejä myöten, joten väärin positiivisten näytteiden mahdollisuus on pieni. Virusten luokittelu genotyypeihin perustuu virusten perimän emäsjärjestyksiin. Niiden tunnistamiseen on tarkka ohjelma, joka ei herkästi hyväksy norovirusiksi vieraita emäsjärjestyksiä. Lisäksi genotyypit GII-4 tutkittiin kahdella sekä RNA-polymeraasin että kapsidiproteiinin geenien alueisiin kohdistuvilla alukkeilla. Polymeraasiketjureaktiotesti on tällä hetkellä paras mahdollinen käytettävissä oleva menetelmä norovirusten diagnostiikassa. Vaikka kaikkia viruksia ei välttämättä pystyttäisi havaitsemaan yhdellä alukkeella, testissä käytetyt alukkeet oli suunniteltu RNA-polymeraasigeeniä kohtaan eli hyvin konservoituneelle alueelle, jolloin mahdollisimman moni virus kuitenkin löytyy. Koska myös tutkimusaineisto oli suuri ja koska tutkimuksen tulokset ja niistä löytyneet merkitsevät erot eivät perustuneet vain muutamiiin episodeihin ja näytteisiin vaan havaitut erot tulivat vahvasti ja useassa tapauksessa esille, pienenee virheiden ja niiden aiheuttaman tuloksen vääristymän mahdollisuus. Tutkimusta voidaan siis pitää suhteellisen luotettavana.

Koska GII-4 näyttäisi olevan vaarallisempi kuin muut genotyypit, genotyypin GII-4 aiheuttamiin episodeihin ja mahdollisiin epidemioihin tulisi varautua ehkä normaalia tehokkaammin ja kontrolloida infektion kulkua erityisesti riskiryhmissä tarpeen mukaan. Vaikka tässä tutkimuksessa myös genotyypin GII-4 infektiot jäivät suhteellisen lieviksi kokonaisscoren perusteella, voivat jo pienetkin erot ripuli- ja oksentelupäivien määrässä olla kliinisesti merkittäviä eri genotyyppien aiheuttamissa infektioissa, erityisesti kun kyseessä on pieni lapsi, vanhus tai immuunipuutteinen potilas. Koska norovirusinfektioon ei ole tehoavaa rokotetta tai lääkehoitoa ja immuniteetti virukselle on heikko, voisi mahdollista lääkehoito- ja rokotekehittelyä suunnata tulevaisuudessa enemmän genotyyppiä GII-4 kohtaan.

LÄHTEET

1. Green KY, Ando T, Balayan MS, ym. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000;181:322-30.
2. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990;250:1580-3.
3. Von Bonsdorff C-H, Maunula L. Norovirukset – hygienian haaste? *Lääkärilehti* 2003;58:2855-9.
4. Rockx B, de Wit M, Vennema H, ym. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35:246-53.
5. Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-23.
6. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, ym. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 2004;42:2988-95.
7. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, ym. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186:1-7.
8. Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, ym. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* 2003;77:2789-98.
9. Maunula L, Von Bonsdorff C-H. Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002. *J Clin Virol* 2005;34:186-94.
10. Iritani N, Seto Y, Haruki K, Kimura M, Ayata M, Ogura H. Major change in the predominant type of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. *J Clin Microbiol* 2000;38:2649-54.
11. Buesa J, Collado B, López-Andújar P, ym. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 2002;40:2854-9.
12. Marshall JA, Dimitriadis A, Wright PJ. Molecular and epidemiological features of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia in 2001. *J Med Virol* 2005;75:321-31.

13. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DWG. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004;39:318-24.
14. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:69-74.
15. 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;14:1224–31.
16. Pang X-L, Joensuu J, Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:420-6.
17. Jin M, Xie H-P, Duan Z-J, ym. Emergence of the GII4/2006b variant and recombinant noroviruses in China. *J Med Virol* 2008;80:1997-2004.
18. Ramirez S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Arista S. Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. *J Med Virol* 2009;81:139-45.
19. Lew JF, Valdesuso J, Vesikari T, ym. Detection of Norwalk virus or Norwalk-like virus infections in Finnish infants and young children. *J Infect Dis* 1994;169:1364-7.
20. Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000;181:262-9.
21. Siebenga J, Vennema H, Renckens B, ym. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J virol* 2007;81:9932-41.
22. Guo L, Song J, Xu X, ym. Genetic analysis of norovirus in children affected with acute gastroenteritis in Beijing, 2004–2007. *J Clin Virol* 2009;44:94-8.
23. Tu ET, Bull RA, Greening GE, ym. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis* 2008;46:413-20.
24. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin N am* 2006;35:275-90.
25. Zintz C, Bok K, Parada E, ym. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol* 2005;5:281-90.

26. 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;170:34-43.
27. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, ym. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003;9:548-53.
28. Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 2005;79:2900-9.
29. Jing Y, Qian Y, Huo Y, Wang L-P, Jiang X. Seroprevalence against Norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China. *J Med Virol* 2000;60:97-101.
30. Lee N, Chan MCW, Wong B, ym. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1399-401.
31. Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, ym. Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *Am J Transplant* 2003;3:764-8.
32. Thiele K, Müller L, Uerlings H, Schmidt U. Sudden death of a child due to aspiration of the gastric content during an infection with Norwalk-like virus. *Rev Cubana Med Trop* 2005;57:223-5.
33. Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, ym. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000;181:367-73.
34. 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.
35. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:2529-34.
36. Vesikari T, Karvonen A, Puustinen L, ym. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:937-43.
37. Zeng S-Q, ym. Norovirus gastroenteritis in young children receiving human rotavirus vaccine. Artikkelilähetetty julkaistavaksi.
38. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990;22:259-67.
39. Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, ym. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol* 2008;46:2573-80.