

FULL PAPERS

Local epidemiological surveillance of Norovirus infections in children hospitalized for gastroenteritis

Romano Mattei, Chiara Severoni, Laura Neri, Elisa Donati, Arnaldo Savarino

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Campo di Marte, Lucca

Key words: Epidemiological surveillance, Gastroenteritis, Norovirus.

Epidemiologia locale delle infezioni da Norovirus in bambini ricoverati per gastroenterite

SUMMARY

Objective. Aim of this study was to determine the prevalence and distribution of the Norovirus (NoVs) infections, from October 2007 to April 2008, in children hospitalized for gastroenteritis.

Materials and methods. From October 2007 to April 2008 faecal specimens were obtained from 220 infants and children (130 males, 90 females) of whom 58 under 1, 60 between 1 and 2, 28 between 2 and 3, 74 between 3 and 12 years old, admitted for gastroenteritis to the Department of Paediatrics at the Campo di Marte's Hospital in Lucca, Italy. All the specimens were examined both for the presence of bacteria (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia* spp, *Aeromonas* spp and enteropathogenic *E. coli*) and for the presence of rotaviruses (HRVs) and adenoviruses (AdVs). Sixty-eight frozen stool samples negative for bacteria and viruses were examined for NoVs. HRVs and AdVs were detected by the immunochromatographic test RIDAQUICK Rotavirus/Adenovirus Combi test (R-Biopharm, Germany). NoVs detection was carried out by the enzyme immunoassay RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation EIA (R-Biopharm, Germany). In the RIDASCREEN Norovirus test, specific monoclonal antibodies against antigens of several different genotypes are used in a sandwich type method. In a validation study of the RIDASCREEN Norovirus ELISA 3rd Generation at the Institute of Virology of the University of Dresden, the test correlation with the RT PCR showed the following performance, sensitivity (83.0%), specificity (100.0%), PPV (100.0%), NPV (83.0%).

Results. HRVs were detected in 41.8% (89/220), AdVs in 4.1% (9/220) and Enteropathogenic bacteria were detected only in 7 (3.2%) patient. NoVs were detected in 18 of 68 studied cases (26.5%). Eighty-three of the NoVs and 49% of the HRVs infections occurred in children up two years old.

Conclusions. The present results point out the importance of NoVs infections in childhood hospitalization, mainly in the first two years of life. The study shows the need to implement norovirus ELISA detection assays for clinical diagnosis and for planning an active surveillance among paediatric cases requiring hospitalization due to gastroenteritis for the development of effective preventive measures.

Received July 14, 2008

Accepted September 4, 2008

INTRODUZIONE

La gastroenterite acuta è una delle principali cause di morbilità e mortalità tra i bambini nei paesi industrializzati e in via di sviluppo. La gastroenterite è una delle più comuni patologie che richiedono ospedalizzazione, sebbene nei paesi industrializzati siano descritti raramente casi mortali e solo in pazienti debilitati o anziani. Molti agenti infettivi (batteri, parassiti e virus) possono essere associati a gastroenterite, ma sono principalmente i virus ed in particolare i Rotavirus ed i Norovirus i principali agenti eziologici.

I Norovirus (NoVs), il cui prototipo è il Norwalk virus, denominati in passato come virus dalla struttura piccola e rotonda (SRSVs: small round structured

viruses) appartengono alla famiglia Caliciviridae, hanno capsidi icosaedrico delle dimensioni di $\approx 27-35$ nm di diametro, senza envelope, con RNA monocatenario a polarità positiva (9).

La molecola di RNA, di 7.7 kb, contiene tre open reading frames (ORFs): ORF1 codifica per una poliproteina non strutturale, ORF2 e ORF3 per le proteine capsidiche (19).

Questi virus presentano una elevata variabilità genetica che permette di distinguerli filogeneticamente in diversi genotipi compresi in cinque differenti genogruppi (GI-GV), dei quali GI e GII, suddivisi rispettivamente in 8 e 17 genotipi, sono patogeni per l'uomo.

Sebbene i Norovirus siano stati identificati più di

Corresponding author: Romano Mattei

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche

Ospedale Campo di Marte, 55100 Lucca.

Tel.: 0583970313 - Cell.: 3496466649 - Fax: 0583970403 - E-mail: r.mattei@usl2.toscana.it

trenta anni fa, le conoscenze del loro ciclo replicativo ed i meccanismi di patogenicità sono state limitate dall'impossibilità di coltivare questi virus in linee cellulari e di riprodurre l'infezione in modelli animali. Solo recentemente Straub et al, hanno riportato che ceppi di norovirus umani possono infettare e replicarsi in un modello tridimensionale di coltura cellulare derivata da epitelio intestinale umano (41), e nel lavoro di Guix et al, per la prima volta si riporta che i norovirus isolati da feci di volontari possono essere coltivati in cellule di epatoma umano con espressione di antigeni virali, replicazione e rilascio delle particelle virali nel medium (20).

Identificati per la prima volta nel 1972 come causa della cosiddetta "winter vomiting disease" (24, 1, 14), i Norovirus sono causa di gastroenterite caratterizzata da nausea, vomito, crampi addominali, diarrea associate occasionalmente a cefalea, dolori muscolari e febbre (4, 43). Il periodo d'incubazione varia fra 10 e 48 ore ed in genere la malattia si risolve in 36-48 ore. I casi documentati di diarrea protratta e di serie complicanze sono rari e si verificano quasi esclusivamente in pazienti anziani o immunodepressi (4, 33).

I Norovirus hanno una distribuzione cosmopolita, sono una causa frequente di gastroenterite epidemica negli adulti (25) e dopo i Rotavirus sono la più importante causa di gastroenterite virale nei bambini (35, 39, 34, 38). Sono causa di epidemie soprattutto in comunità chiuse quali case di cura (25, 18), ospedali (11, 5, 40, 23), navi da crociera (21, 27, 22) e dormitori (3) ed inoltre sono riconosciuti responsabili della diarrea del viaggiatore in pazienti di tutte le età (26, 29, 12). Il serbatoio principale dei norovirus è l'uomo. Sono altamente contagiosi essendo la dose minima infettante inferiore a 100 particelle virali (36). Le modalità di trasmissione includono il consumo di cibo e bevande contaminati (2, 15, 32, 44, 46), il contatto con superfici contaminate e la trasmissione per via aerea a seguito della formazione di aerosol a partire dagli episodi di vomito (6, 11). È stato infatti stimato che un singolo incidente di vomito può generare da 300 a 3000 dosi infettanti di virus (10). L'immunità che segue l'infezione ha breve durata e non conferisce protezione nei confronti di successive infezioni, probabilmente a causa della variabilità genetica del virus. Tale variabilità è ascrivibile a meccanismi evolutivi del virus, tutt'oggi sconosciuti, che governano la persistenza e la comparsa di nuovi ceppi epidemici nella popolazione umana (30, 31, 28, 13, 7, 37, 38).

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso fra ottobre 2007 e aprile 2008, sono stati raccolti campioni di feci da 220 pazienti pediatriche (130 maschi, e 90 femmine), di cui 58 con meno di un anno, 60 con età compresa tra

1 e 2 anni, 28 tra 2 e 3 anni e 74 tra 3 e 12 anni, ricoverati per gastroenterite presso il reparto di Pediatria dell'Ospedale Campo di Marte di Lucca. Su tutti i campioni di feci è stato eseguito sia l'esame colturale per la ricerca dei principali batteri (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersinia* spp, *Aeromonas* spp ed *E. coli enteropatogeni*), sia la ricerca degli antigeni virali di Rotavirus (HRVs) e Adenovirus (AdVs). Sessantotto campioni di feci risultati negativi all'esame colturale per batteri e virus sono stati congelati e successivamente esaminati per la ricerca dei NoVs.

Gli antigeni virali dei HRVs e AdVs sono stati ricercati con il test immunocromatografico RIDA-QUICK Rotavirus/Adenovirus Combi test (R-Biopharm, Germany).

La ricerca dei NoVs è stata eseguita con il metodo immunoenzimatico RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation EIA (R-Biopharm, Germany). Il test RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation sostituisce il test di 2^a generazione che già di per se si era rivelato piuttosto valido (8). È un test EIA tipo sandwich che utilizza una esclusiva miscela di anticorpi monoclonali per la rilevazione qualitativa dei norovirus genogruppo I e II in campioni di feci. Il test è stato presentato al "23rd Annual Clinical Virology Symposium and Annual Meeting of the Pan American Society for Clinical Virology, Clearwater, USA, April 29th to May 2nd 2007" e gli autori, nella validazione hanno confrontato i risultati ottenuti con il RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation e quelli ottenuti in RT PCR, considerato il gold standard. I dati emersi rilevano la seguente performance del test: sensibilità 83%, specificità 100%, PPV (100.0 %), NPV (83.0 %) (17). È possibile eseguire il test RIDASCREEN in automazione sul sistema automatico DSX 4 Plate ELISA processor (Dynex Technologies Inc, Virginia, USA) e studi sono in corso per una validazione anche su altri strumenti (16). Il test è stato utilizzato recentemente anche da autori francesi in uno studio di prevalenza delle infezioni gastrointestinali in bambini ospedalizzati (42).

Tabella I. Distribuzione e frequenza delle infezioni virali e batteriche in bambini ricoverati per gastroenterite nel periodo Ottobre 2007 - Aprile 2008 presso il Reparto di Pediatria, Ospedale Campo di Marte, Lucca

Microrganismo	No. casi (tot)	%
Norovirus	18 (68)	26.5
Rotavirus	92 (220)	41.8
Adenovirus	9 (220)	4.1
Salmonella	3 (220)	1.4
Campylobacter	1 (220)	0.4
Yersinia	1 (220)	0.4
Aeromonas	1 (220)	0.4
Shigella	1 (220)	0.4

Tabella 2. Distribuzione delle infezioni virali e batteriche e loro frequenza per gruppi d'età, in bambini ricoverati per gastroenterite nel periodo Ottobre 2007 - Aprile 2008 presso il Reparto di Pediatria, Ospedale Campo di Marte, Lucca

Età	Norovirus (n=18)		Rotavirus (n=92)		Adenovirus (n=9)		Batteri (n=7)	
	Frequenza	%	Frequenza	%	Frequenza	%	Frequenza	%
<1 anno	6	33.3	14	15.2	3	33.3	1	14.3
≥ 1 e <2 anni	9	50	31	33.7	3	33.3	2	28.6
≥2 e <3 anni	1	5.6	14	15.2	2	22.2	2	28.6
≥ 3 e ≤12 anni	2	11.1	33	35.9	1	11.1	2	28.6

RISULTATI

I Rotavirus sono stati identificati nel 41.8% (89/220) del totale, gli Adenovirus nel 4.1% (9/220) ed i batteri enteropatogeni nel 3.2% (7/220). I Norovirus sono stati identificati in 18 dei 68 casi esaminati (26.5%) (tabella 1). L'83% delle infezioni sostenute da Norovirus ed il 49% di quelle da Rotavirus si sono verificate in bambini con età inferiore a due anni (tabella 2).

DISCUSSIONE

In Italia non esiste un sistema organico di sorveglianza delle patologie acute del tratto gastroenterico. Di conseguenza l'effettiva distribuzione dell'infezione nella popolazione appare misconosciuta o quantomeno sottostimata. I nostri risultati rivelano che i Norovirus sono la seconda causa d'infezione gastrointestinale nei bambini che necessitano di ospedalizzazione, di questi il 50% con età inferiore a due anni. La diagnostica dei Norovirus prima dell'avvento dei test Elisa era basata sulla microscopia elettronica e sulla rilevazione molecolare del genoma virale tramite PCR, tecniche accessibili a pochi laboratori. Oggi i test ELISA ed in particolare il test automatizzabile RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation sono, a nostro avviso, un valido strumento diagnostico delle infezioni da Norovirus e un utile mezzo per la sorveglianza di possibili focolai epidemici e l'attuazione di misure di prevenzione e di contenimento. Le infezioni, non da ultimo, hanno forti ricadute sul consumo di risorse come ben evidenziato nel lavoro di Ziegg et al, che ha preso in considerazione l'impatto finanziario di un focolaio epidemico ospedaliero (45).

BIBLIOGRAFIA

1. Appleton H, Buckley M, Robertson MH, Thom BT. Virus-like particles in winter vomiting disease. *Lancet*. 1977; 1(8008): 409-11.
2. Appleton H. Small round viruses: classification and role in food-borne infections. *Ciba Found Symp*. 1987; 128: 108-25.
3. Arness MK, Feighner BH, Canbam ML, et al. Norwalk-like viral gastroenteritis outbreak in U.S. Army trainees. *Emerg. Infect Dis* 2000; 6: 204-207.
4. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006; 35: 275-90.
5. Billgren M, Christenson B, Hedlund KO, Vinjé J. Epidemiology of Norwalk-like human caliciviruses in hospital outbreaks of acute gastroenteritis in the Stockholm area in 1996. *J Infect*. 2002; 44(1): 26-32.
6. Cáceres VM, Kim DK, Bresee JS, et al. A viral gastroenteritis outbreak associated with person-to-person spread among hospital staff. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998; 19(3): 162-7.
7. Caracciolo S, Minini C, Colombrita D, et al. Detection of sporadic cases of Norovirus infection in hospitalized children in Italy. *New Microbiol*. 2007; 30(1): 49-52.
8. Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, et al. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods*. 2007; 141(2): 216-9.
9. Caul EO, Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol*. 1982; 9(4): 257-65.
10. Caul EO. Hyperemesis hiemis-a sick hazard.1: *J Hosp Infect*. 1995; 30 Suppl: 498-502.
11. Chadwick PR, McCann R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect*. 1994; 26(4): 251-9.
12. Chapin AR, Carpenter CM, Dudley WC, et al. Prevalence of norovirus among visitors from the United States to Mexico and Guatemala who experience traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(3): 1112-7.
13. Colomba C, Saporito L, Giammanco GM, et al. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(9): 1389-91.
14. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972; 140(2): 578-83.
15. Domínguez A, Torner N, Ruíz L, et al. The Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. 1: *J Clin Virol*. 2008 May 14 (Epub ahead of print).
16. Fischer R, Bopp E, Apostel F, Stork N, Sander P. (R-Biopharm AG, Germany). Automated Norovirus Detection: Reducing the risks for infection in routine diagnostic laboratories. Study in house - R-Biopharm laboratories.
17. Fischer R., Dressler D., Leidinger H., Sander P. RIDASCREEN ® Norovirus 3rd Generation: A third

- generation ELISA assay for the detection of Norovirus Infections in Stool Specimens. Poster abstract #TP-62 Presented at the 23rd Annual Clinical Virology Symposium and Annual Meeting of the Pan American Society for Clinical Virology, Clearwater, USA, April 29th to May 2nd 2007.
18. Gellert GA, Waterman SH, Ewert D, et al. An outbreak of acute gastroenteritis caused by a small round structured virus in a geriatric convalescent facility. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1990; 11(9): 459-64.
 19. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparco-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol.* 2000; 74(14): 6581-91.
 20. Guix S, Asanaka M, Katayama K, et al. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol.* 2007; 81(22): 12238-48.
 21. Gunn RA, Terranova WA, Greenberg HB, et al. Norwalk virus gastroenteritis aboard a cruise ship: an outbreak on five consecutive cruises. *Am J Epidemiol.* 1980; 112(6): 820-7.
 22. Isakbaeva ET, Widdowson MA, Beard RS, et al., "Norovirus transmission on cruise ship", *Emerging Infectious Diseases*, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2005;11:1, 154-157.
 23. Itoda I, Hidai H, Kikuchi K, Yamaura H, Totsuka K. (Hospital outbreak of viral gastroenteritis attributed to Norwalk-like viruses in Japan). *Kansenshogaku Zasshi.* 2002; 76(1): 32-40.
 24. 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(5): 1075-81.
 25. Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med.* 1982; 96(6 Pt 1): 756-61.
 26. Keswick BH, Blacklow NR, Cukor GC, DuPont HL, Vollet JL. Norwalk virus and rotavirus in travellers' diarrhoea in Mexico. *Lancet.* 1982; 1(8263): 109-10.
 27. Khan AS, Moe CL, Glass RI, et al. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 318-22.
 28. Kirkwood C. Viral gastroenteritis in Europe: a new norovirus variant? *Lancet.* 2004; 363(9410): 671-2.
 29. Ko G, Garcia C, Jiang ZD, et al. Noroviruses as a cause of traveler's diarrhea among students from the United States visiting Mexico. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(12): 6126-9.
 30. Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008; 5(2): e31.
 31. Lopman B, Vennema H, Kohli E, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 2004; 363(9410): 671-2.
 32. Martinez A, Dominguez A, Torner N, et al. Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks in Catalonia, Spain. *BMC Infect Dis.* 2008; 8: 47.
 33. 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.
 34. Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. *J Med Virol.* 2006; 78(11): 1486-92.
 35. Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol* 2003; 71: 82-93.
 36. Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, et al. "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep.* 2001; 50(RR-9): 1-17.
 37. Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J Med Virol.* 2007; 79(9): 1388-400.
 38. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, et al. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIb among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol.* 2006; 78(7): 971-8.
 39. Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(2): 201-6.
 40. Stevenson P, McCann R, Duthie R, Glew E, Ganguli L. A hospital outbreak due to Norwalk virus. *J Hosp Infect.* 1994; 26(4): 261-72.
 41. Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, et al. *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(3): 396-403.
 42. Tran A, Minette D, Leveque N, Jacques J, Lejeune B, Payan C, Andreoletti L. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus and Astrovirus infections by rapid EIA and ELISA assays in French hospitalized children. Poster 2222 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008.
 43. Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 964-9.
 44. Van Duynhoven YT, de Jager CM, Kortbeek LM, et al. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. 1: *Epidemiol Infect.* 2005; 133(1): 9-21.
 45. Zingg W, Colombo C, Jucker T, Bossart W, Ruef C. Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005; 26(3): 263-7
 46. Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(1): 95-102.