

SHORT COMMUNICATIONS

Nosocomial outbreak of norovirus gastroenteritidis with unusual clinical-epidemiological features

Marco Arosio¹, Annalisa Grigis^{1,2}, Enrico Castellucci³, Giancarla Caglioni², Franca Averara², Francesco Locati², Barbara Marziali³, Ilaria Di Bartolo⁴, Franco Maria Ruggeri⁴, Antonio Goglio^{1,2}

¹USC Microbiologia e Virologia,

²Dipartimento Prevenzione Sorveglianza Infezioni (DiPSI)

³USC Urologia, A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo

⁴Dipartimento di Sanità alimentare ed animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Key-words: Norovirus, Gastroenteritis, Nosocomial outbreak.

Focolaio ospedaliero di gastroenterite da norovirus con caratteristiche clinico-epidemiologiche atipiche

SUMMARY

Literature reports about Norovirus outbreaks, especially in hospitals, have accumulated in the past years, including patients and health workers. This report describes a small outbreak by Norovirus which occurred in USC Urology with unusual clinical-epidemiological features. The clinical course was unusual, as it presented no vomiting and duration of diarrhoea was unusually long (4-6 days) with the lack of involvement of health workers. The search for the virus was done with immunoassay method RIDASCREEN 2^a generation on 11/19 patients (58%) with gastroenteritis symptoms, and 3/11 samples (27%) were positive. The molecular investigation by RT/PCR with diagnostic primers JV12 and JV13 on the polymerase region, carried out at the Istituto Superiore di Sanità, Rome, gave negative results while the RT/PCR using primers GIISKR and GIISKF, which amplify a fragment of the capsid region, was positive in 4/11 samples (36%) showing a correlation of 2/4 samples (50%) with RIDASCREEN immunoassay test. Our observations confirm the usefulness of immunoassay tests and the need to extend the molecular methods using different diagnostic primers. In outbreaks of gastroenteritis the microbiologist should consider the detection of Norovirus in diagnostic routine, as a positive result requires prevention measures to avoid also the spreading by droplets when vomiting is present.

Received March 3, 2008

Accepted May 6, 2008

INTRODUZIONE

Sono sempre più numerosi i casi di gastroenterite da *Norovirus* segnalati in Letteratura sia a livello nazionale che internazionale (2, 4, 7, 15-20, 20, 23-25). Un report sulla situazione europea relativo ai 33 Paesi che aderiscono alla rete "Foodborne Viruses in Europe Network" riferisce centinaia di epidemie tra il 2004 ed il 2006 nelle nazioni europee che partecipano alla sorveglianza (13).

La stessa fonte non riporta dati per il nostro paese, e la ragione può dipendere dal fatto che il *Norovirus* non rientra nell'elenco dei patogeni enterici soggetti a notifica obbligatoria nella legislazione sanitaria italiana; il Ministero della Salute ha però diffuso nel 2007 delle raccomandazioni sulla ricerca di questo patogeno negli alimenti (21). In provincia di Bergamo è attivato un sistema di sorveglianza delle malattie infettive che vede coin-

volti il Servizio di Prevenzione ed Epidemiologia delle Malattie Infettive della ASL, i medici ospedalieri e del territorio, l'Unità Strutturale Complessa (USC) di Microbiologia e Virologia che a partire dal 2004 si è attrezzata per la diagnostica delle infezioni da *Norovirus*. Nell'ambito di tale sorveglianza sono state rilevate numerose epidemie di gastroenterite da *Norovirus* a livello di strutture ospedaliere, scolastiche e di residenze sanitario-assistenziali (RSA), in tutti i casi con caratteristiche clinico-epidemiologiche tipiche.

Nel corso degli ultimi anni sono stati riportati un numero crescente di segnalazioni di epidemie da *Norovirus* a livello ospedaliero (2, 3, 14, 15, 17). Il nodo della gestione dei pazienti con tale infezione è quello dell'applicazione delle misure di prevenzione, in relazione all'infettività ed alla diffusione delle varianti genetiche attualmente circolanti che

Corresponding author: Marco Arosio

USC Microbiologia e Virologia - A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo

Largo Barozzi, 1 - 24128 - Bergamo, Italia

Tel.: +035269012 - Fax: +035266666 - E-mail: microbiologia@ospedaliriuniti.bergamo.it

risulta particolarmente elevata tanto che nella maggior parte delle epidemie nosocomiali è implicata una trasmissione persona-persona con trasporto del virus alla bocca, attraverso le mani contaminate da vomito o feci e per inalazione di aerosol prodottosi durante il vomito stesso (1, 3, 17).

Le persone malate diffondono il virus dal momento in cui manifestano i sintomi generalmente sino a due-tre giorni dalla guarigione, anche se il rilascio di virus può proseguire per diverse settimane (8, 11).

Il virus è molto contagioso, diffonde velocemente negli ambienti e resiste a lungo sulle superfici. Per causare l'infezione è sufficiente una piccola quantità dell'agente virale.

I sintomi della malattia compaiono solitamente 24-48 ore dopo l'ingestione del virus ma possono manifestarsi già dopo 12 ore dall'esposizione. L'infezione da Norovirus conferisce una immunità di breve durata e specifica solo per il genotipo in causa anche se può recidivare a distanza di tempo o essere causata da un diverso genotipo.

Gli elementi che fanno sospettare un'epidemia da *Norovirus* in ospedale sono (3-5):

- breve incubazione (15-48h),
- durata della malattia (12-60h),
- vomito in più del 50% dei malati,
- presenza dell'infezione sia in malati che operatori sanitari.

Attualmente non sono disponibili farmaci antivirali specifici. Negli individui in buona salute la malattia ha un decorso breve mentre particolare attenzione va posta ai bambini piccoli, agli anziani ed ai soggetti con malattie croniche anche se un'adeguata reidratazione è di solito sufficiente a controllarne il decorso (5).

La diagnosi microbiologica è affidata all'indagine molecolare mediante RT-PCR su feci che rappresenta attualmente il metodo di riferimento ma negli ultimi anni un numero crescente di kit diagnostici immunoenzimatici sono stati commercializzati con una sensibilità riferita compresa tra il 30-70% ed una specificità variabile da 69 a 100% (6, 9, 10, 12, 22). In aggiunta ad una sensibilità superiore, la diagnosi molecolare consente il riconoscimento del genotipo virale, informazione indispensabile per stabilire il nesso di causalità tra epidemie e veicoli di infezione, specie alimentari (6, 18, 19, 26-28).

Con il presente lavoro gli Autori intendono descrivere una piccola epidemia sostenuta da Norovirus, verificatasi in un reparto chirurgico degli Ospedali Riuniti di Bergamo, con caratteristiche clinico-epidemiologiche inusuali.

DESCRIZIONE DEL FOCOLAIO INFETTIVO

Il 26 gennaio 2007 il Gruppo Operativo del

Dipartimento Prevenzione Sorveglianza Infezioni (GO-DiPSI) veniva informato di un possibile focolaio di gastroenterite nell'USC di Urologia con tre casi di diarrea, senza febbre e vomito.

L'indagine epidemiologica rilevava altri tre casi nella stessa struttura che si erano manifestati nei giorni precedenti (il 19, 23 e 24 gennaio), tutti i pazienti presentavano la stessa sintomatologia.

Venivano immediatamente messe in atto le misure precauzionali previste per le infezioni gastroenteriche che prevedono precauzioni standard da contatto ma non da droplets in quanto il quadro clinico ed epidemiologico sembrava escludere un'eziologia da Norovirus per l'assenza del vomito in tutti i pazienti contagiati (1).

Oltre alla messa in atto delle misure igieniche e ambientali (lavaggio delle mani con acqua e sapone dopo contatto con feci, strofinamento alcolico prima e dopo il contatto col malato e il suo ambiente circostante, utilizzo di guanti e camici monouso durante l'assistenza diretta, detersione e disinfezione tre volte al giorno dei servizi igienici e di tutte le superfici delle camere) si è anche deciso di raggruppare i malati con diarrea in stanze con bagni dedicati.

L'attività di diagnosi e cura dell'USC di Urologia, dotata di 55 posti letto, è invece continuata regolarmente, salvo pochi interventi complessi che, in assenza di urgenza clinica, si è preferito posticipare.

I pazienti colpiti dall'infezione sono stati complessivamente 19, tra il 26 gennaio ed il 7 febbraio mentre nessun operatore sanitario è risultato coinvolto. L'epidemia è rimasta circoscritta alla Struttura Chirurgica dal momento che non sono stati segnalati altri casi nell'Azienda Ospedaliera.

METODI MICROBIOLOGICI

Determinazione dell'antigene. La ricerca dell'antigene di Norovirus è stata eseguita su campioni di feci dai pazienti con sintomi di gastroenterite utilizzando il kit RIDASCREEN Norwalk-like Virus 2^a generazione (R-BioPharm). Si tratta di un test immunoenzimatico (ELISA) che permette la rilevazione degli antigeni del genogruppo I e II con un limite tra 10⁵ e 10⁶ particelle per ml. I genotipi rilevati dal kit sono i seguenti: GGI/1, GGI/3 e GGII/1-4.

Esame molecolare. Aliquote dei campioni raccolti sono state inviate al Dipartimento di Sanità alimentare ed animale presso l'Istituto Superiore di Sanità per essere sottoposti a procedure di estrazione ed analisi di acido nucleico secondo protocolli standardizzati in ambito europeo (FBVE, QLK1-CT-1999-00594) per la ricerca specifica del Norovirus.

La ricerca di RNA genomico virale è stata effettuata utilizzando tecniche di RT/PCR impiegando primer

diagnostici di gruppo (JV12 e JV13) sulla regione ORF1 (*pol*) secondo il metodo descritto da Vinje, et al. e successivi primer GIISKR e GIISKF che amplificano un frammento della regione capsidica (28).

RISULTATI

Le caratteristiche clinico-epidemiologiche dei 19 pazienti coinvolti nel cluster epidemico sono presentate nella tabella 1.

Le indagini microbiologiche routinarie dei campioni fecali sono risultate negative per: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, Rotavirus, Adenovirus e *Clostridium difficile*.

La ricerca di Norovirus è stata effettuata con metodo immunoenzimatico RIDASCREEN sui primi 11 pazienti contagiati (58%) con 3/11 campioni (27%) risultati positivi.

Le indagini molecolari tramite RT/PCR utilizzando primer diagnostici JV12 e JV13 su regione polimerasica, effettuate presso l'Istituto Superiore di Sanità, hanno dato esito negativo mentre l'RT/PCR eseguita con i primer GIISKR e GIISKF che amplificano un frammento della regione capsidica di Norovirus di genogruppo II è risultata positiva in 4/11 campioni (36%) con una concordanza di 2/4 campioni (50%) con il test immunoenzimatico RIDASCREEN (tabella 2).

Tabella 1. Caratteristiche clinico-epidemiologiche dei pazienti

CARATTERISTICHE	NUMERO PAZIENTI
Maschi	15
Femmine	4
Età media (range)	70.6 (32-86)
< 60 anni	2
60-69	5
70-79	8
>79	4
Febbre > 38°C	0
Vomito	0
Durata diarrea media (range)	3.9 (1-8)
Durata diarrea > 5 giorni	8

Tabella 2. Risultati delle indagini microbiologiche

CASO	TEST ELISA	RT/PCR	
		POLIMERASI	CAPSIDICA
1	negativo	negativo	negativo
2	negativo	negativo	negativo
3	negativo	negativo	POSITIVO
4	negativo	negativo	negativo
5	negativo	negativo	negativo
6	negativo	negativo	negativo
7	POSITIVO	negativo	POSITIVO
8	POSITIVO	negativo	POSITIVO
9	POSITIVO	negativo	neg
10	negativo	negativo	POSITIVO
11	negativo	negativo	negativo

DISCUSSIONE

Epidemie di gastroenteriti da Norovirus sono per lo più descritte nella stagione invernale, colpiscono spesso la popolazione anziana e/o confinata in ambienti semichiusi. La sintomatologia dei pazienti coinvolti nel focolaio gastroenterico presso l'USC di Urologia ha mostrato un decorso atipico, in quanto nessun malato ha presentato vomito, la durata della diarrea è risultata insolitamente lunga (4-6 giorni) ed è mancato il coinvolgimento degli operatori sanitari.

Il verificarsi di epidemie nelle strutture sanitarie può provocare notevoli interferenze con l'attività e richiedere decisioni rilevanti come la chiusura di interi reparti, di conseguenza gli sforzi per il controllo dell'infezione devono dare la priorità alla prevenzione della diffusione dell'agente virale all'interno del reparto e ad altri reparti della stessa struttura sanitaria.

Ciò si ottiene attraverso l'isolamento degli individui infetti/esposti all'interno del reparto coinvolto, prevenendo gli spostamenti del personale e dei malati a zone indenne dall'infezione, la decontaminazione ambientale efficace, lo scrupoloso rispetto delle norme igieniche, in particolare delle mani, e sul fatto che pazienti e personale indossino mascherine quando ci sia la possibilità di venire in contatto con feci o vomito infetti (1, 3).

L'indagine epidemiologica svolta dal personale del Dipartimento Prevenzione e Sorveglianza delle Infezioni (GO-DiPSI) non ha permesso di identificare o sospettare una fonte comune di contagio tra i pazienti ricoverati.

Il test immunoenzimatico RIDASCREEN ha fornito una diagnosi preliminare. Il fatto che solo 3/11 test (27%) siano risultati positivi conferma quanto da noi osservato in precedenti epidemie; la negatività di alcuni campioni può essere dovuta alla bassa carica virale e/o la scarsità di materiale fecale raccolto per le indagini microbiologiche.

La diagnosi è stata poi confermata dalle indagini molecolari in 4/11 casi (37), inizialmente negative con primer diagnostici JV12 e JV13 sulla regione polimerasica, positive invece amplificando frammenti della regione capsidica.

Un problema della RT-PCR è rappresentato dalla presenza nel campione da esaminare di sostanze che possono interferire con la reazione di amplificazione; è pertanto necessario mettere a punto protocolli di estrazione adeguati per evitare la presenza di falsi negativi dovuti agli inibitori della RT-PCR.

La performance dei metodi molecolari è inoltre compromessa dalla notevole variabilità genetica di Norovirus che si suddividono in differenti genogruppi e genotipi, basati sulla struttura del capsido (i genogruppi GI, GII e GV sono stati associati a casi di malattia umana) e che richiedo-

no pertanto l'accurata scelta dei primer di reazione. Attualmente vengono presi in considerazione primer che codificano per il gene della RNA polimerasi (ORF1) e per il gene della proteina capsidica (ORF2) che sono regioni del genoma sufficientemente conservate tra i ceppi (28).

Le nostre osservazioni confermano quindi l'utilità del test immunoenzimatico (rapido e di semplice esecuzione) e la necessità di estendere la ricerca ai metodi di biologia molecolare utilizzando diversi primer diagnostici.

In corso di focolai epidemici di gastroenterite, il microbiologo deve quindi considerare l'inclusione della ricerca di Norovirus accanto alle tradizionali per *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, Rotavirus, Adenovirus e *Clostridium difficile*.

Un'eventuale positività richiede, infatti, interventi di prevenzione che considerino anche la diffusione per via aerea, nei casi in cui è presente vomito.

BIBLIOGRAFIA

1. Aristolao R, Goglio A, Grigis A, et al. Le infezioni da Norovirus: nota informativa e sistemi di prevenzione. *GIIO* 2005; 12: 95-100.
2. Caracciolo S, Minini C, Colombrita D, et al. Detection of sporadic cases of Norovirus infection in hospitalized children in Italy. *New microbiol* 2007; 30: 49-52.
3. Center for Diseases Control (CDC). Revised guidelines for infection prevention in hospitals and health-care settings. 2007.
4. Center for Diseases Control (CDC). Norovirus activity - United States, 2006-2007. *MMWR* 2007; 56: 842-6.
5. Clark B, McKendrick MA. Review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 461-9.
6. De Bruin E, Duizer E, Vennema H, et al. Diagnosis of norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 2006; 137: 259-64.
7. Farina C, Gibelli M, Marini F, et al. Enteriti da astrovirus e norovirus in età pediatrica: un anno di sorveglianza. *Microbiologia Medica* 2006; 21: 224.
8. Goller JL, Dimitriadis A, Tan A, Kelly H, Marshall JA. Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *J Hosp Infect.* 2004; 58: 286-91.
9. Gonzalez GG, Liprandi F, Ludert JE. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for the detection of Norovirus antigen in fecal samples from children with sporadic acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2006; 136: 289-91.
10. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting Norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vac Immun* 2007; 14: 1349-55.
11. Iritani N, Seto T, Hattori H, et al. Humoral immune responses against norovirus infections of children. *J Med Virol* 2007; 79: 1187-93.
12. Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, et al. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Viro Met* 2008; 147: 360-3.
13. Kronema A, Vennema H, Harris J, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Eurosurveillance weekly*, 14 dic 2006, <http://www.eurosurveillance.org>.
14. Leuenberger S, Widdowson MA, Feilchenfeldt J, et al. Norovirus outbreak in a district general hospital - new strain identified. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 57-61.
15. Martinelli MC, Abelli LA, Aloisi A, et al. Episodio epidemico nosocomiale di enterite sostenuto da norovirus in pazienti pediatrici ricoverati. *Microbiologia Medica* 2004; 19: 251.
16. Martinelli M, Medici MC, Calderaro A, et al. Episodio epidemico di gastroenterite da norovirus di sospetta origine alimentare in una casa di riposo. *Microbiologia Medica* 2007; 22: 243.
17. Mattner F, Mattner L, Borck HU, et al. Evaluation of the impact of the source (patient versus staff) on nosocomial norovirus outbreak severity. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 268-72.
18. Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, et al. Caratterizzazione molecolare di ceppi di norovirus identificati a Parma nel corso del 2002. *Microbiologia Medica* 2004; 19: 140.
19. 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: 1486-92.
20. Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, et al. Prevalenza di infezioni da norovirus nell'area di Parma. *Microbiologia Medica* 2003; 18: 193.
21. Ministero della Salute. Direzione Generale per la sicurezza degli alimenti e della nutrizione. Raccomandazione relativa alla ricerca del Norovirus negli alimenti. Prot. DGSAN/VIII (EX VI) 3734, Roma 20-04-2007.
22. Okame M, Shiota T, Hansman G, et al. Anti-Norovirus polyclonal antibody and its potential for development of a antigen ELISA. *J Med Virol* 2007; 79: 1180-6.
23. Prato R, Lopalco PL, Chironna M, et al. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infect Dis* 2004; 21; 4: 37.
24. Rimoldi SG, Pagani C, Drago L, et al. Sporadica presenza di norovirus nei pazienti affetti da gastroenterite. *Microbiologia Medica* 2006; 22: 225.
25. Rizzo C, Di Bartolo I, Santantonio M, et al. Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreaks in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infect Dis* 2007; 19; 7: 135.
26. Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, et al. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for Norovirus detection and genogrouping. *J Clin Virol* 2007; 39: 318-21.
27. Tian P, Mandrell R. Detection of Norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 564-74.
28. Vinje J, Koopmans MP. Molecular detections and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174: 610-5.