

Strokovni prispevek/Professional article

S KALICIVIRUSI POVZROČENA EPIDEMIJA GASTROENTERITISA V DOMU ZA STAREJŠE OSEBE

HUMAN CALICIVIRUS OUTBREAK OF ACUTE GASTROENTERITIS IN AN AGED-CARE FACILITY

Iztok Štrumbelj¹, Mateja Poljšak-Prijatelj², Teodora Petraš¹, Janet Zimšek², Majda Lanjšček¹, Darja Barlič-Maganja³

¹ Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota, Arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

² Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

³ Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

Prispelo 2002-11-22, sprejeto 2003-01-14; ZDRAV VESTN 2003; 72: 279–82

Ključne besede: kalicivirusi; epidemija; dom za ostarele; elektronska mikroskopija; RT-PCR

Izvleček – Izhodišča. Človeški kalicivirusi, povzročitelji črevesnih okužb, predstavljajo genetsko in antigensko raznoliko skupino virusov s pozitivno usmerjeno enovijačno RNK. Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja v Sloveniji v zadnjih dveh letih narašča število prijavljenih epidemij virusnega gastroenteritisa, povzročenega s kalicivirusi. Do novembra 2002 je bilo potrjenih že 574 primerov. Do sedaj so bili kalicivirusi pri nas dokazani predvsem pri predšolskih in šolskih otrocih, epidemije pri starejših ljudeh v domovih za ostarele niso bile opisane.

Metode. V prispevku prikazujemo epidemijo gastroenteritisa v domu za starejše osebe, ki smo jo obravnavali z epidemiološkimi metodami poizvedovanja, anketiranja in pregleda na kraju samem. Z bakteriološkimi in virološkimi metodami smo iskali različne povzročitelje. Kaliciviruse smo dokazovali z metodo neposredne elektronske mikroskopije, izvedli verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) in produkte RT-PCR potrdili s hibridizacijo.

Rezultati. Epidemija se je začela eksplozivno v drugem nadstropju doma, kjer je zbolelo največ oskrbovancev, v ostalih nadstropjih doma so se bolezni pojavile kasneje in v manjšem številu. Skupaj je zbolelo 61 (40,1%) od 152 oskrbovancev doma in 15 (22,4%) od 67 zaposlenih. Uvedeni so bili ukrepi za preprečevanje širjenja bolezni. Epidemija je bila zaključena deseti dan. Kaliciviruse (rod *Norovirus*) smo našli v devetih iztrebkih od desetih pregledanih. Z metodo RT-PCR in hibridizacije z gensko specifičnimi sondami smo potrdili noroviruse genske skupine GG II, genskega svežnja 1 (virus *Hawaii*) in genskega svežnja 4 (virus *Lordsdale*).

Zaključki. Z opisanimi metodami smo dobili podatke, ki uvrščajo kaliciviruse v pomembne povzročitelje gastroenteritisa pri starejših ljudeh tudi v Sloveniji.

Key words: caliciviruses; outbreak; age-care facility; electron microscopy; RT-PCR

Abstract – Background. Human caliciviruses represent a genetically and antigenetically diverse group of single-stranded RNA viruses associated with acute gastroenteritis in humans. In last two years the number of notified gastroenteric cases in Slovenia is increasing. From January till November 2002 already 574 calicivirus cases have been confirmed. Majority of cases were observed in preschool and school children but no cases were described in the aged-care facility.

Methods. An outbreak of gastroenteritis in an aged-care facility occurred. After onset of the outbreak an epidemiological questionnaire and inspection of local conditions were realized. Stool samples from home residents were analysed to find out bacteriological and/or viral aetiology. Direct electron microscopy and RT-PCR assay was performed to detect caliciviruses. Viral RNA was amplified using specific primers and PCR products were identified in hybridisation test.

Results. The outbreak started suddenly on the second floor, where the attack rate was the highest. On the other floors the illness started later and the attack rate was lower. Sixty-one (40,1%) residents from 152 became ill and additionally 15 (22,4%) employees from 67. The outbreak ended after ten days. Electron microscopy or/and RT-PCR revealed Norovirus members of family *Caliciviridae* in 9 of 10 stool specimens. As determined by RT-PCR and hybridisation assay viruses corresponded to genogroup II, genetic cluster 1 (closely related to the *Hawaii* virus) and genetic cluster 4 (closely related to the *Lordsdale* virus).

Conclusions. Presented data support a significant role for caliciviruses as causative agents of gastroenteritis in elderly persons in Slovenia.

Uvod

Ob obvestilu o sumu na izbruh epidemije gastroenteritisa mora epidemiolog z zbranimi podatki usmeriti pot preiskav na smiselno iskanje možnih povzročiteljev bolezni, hkrati pa mora priporočiti ukrepe, ki bi zmanjšali nadaljnje širjenje bolezni. Možne povzročitelje najprej iščemo med bakterijami in virusi (1, 2).

Človeški kalicivirusi so pomembni povzročitelji nebakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh (3). Virusi so razdeljeni v dva rodova družine *Caliciviridae*. Rod Norovirus, s starim imenom »Norwalku podobni virusi (angl. Norwalk like viruses – NLVs)«, vključuje viruse z neznatno morfološko ter rod Sappovirus s starim imenom »Sapporu podobni virusi (angl. Sapporo like viruses – SLVs)«, z virusi, ki imajo značilno morfološko kalicivirusov (4). Rod norovirusov so nadalje razdelili še v dve genski skupini, vsako pa nadalje še v genske svežnje z nedoločeno biološko pomembnostjo (5). Kalicivirusi različnih genskih svežnjev lahko krožijo sočasno na istih geografskih področjih.

Epidemije, povzročene s kalicivirusi, lahko prizadenejo veliko število ljudi, ki se okužijo z oporečno hrano in vodo (6). Virusi se širijo med ljudmi tudi z neposrednim stikom (2). Klinična znamenja so navadno blaga, bolezen sama zamre, parenteralna rehidracija in hospitalizacija sta le redkokdaj potrebni. Okužba lahko resneje prizadene starejše ljudi – poročajo tudi o visoki smrtnosti pri osebah, starejših od 74 let (7). Kalicivirusi so v domovih za starejše pogost vzrok epidemičnega gastroenteritisa (8, 9).

Izhodišča

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja v Sloveniji v zadnjih dveh letih narašča število prijavljenih epidemij virusnega gastroenteritisa, povzročene s kalicivirusi. Do novembra 2002 je bilo prijavljenih že 574 primerov kalicivirusnih okužb. Do sedaj so bili kalicivirusi v Sloveniji dokazani predvsem pri predšolskih in šolskih otrocih in mlajših odraslih, epidemije pri starejših ljudeh v domovih za ostarele niso bile opisane. V Pomurju smo prvo epidemijo, povzročeno s kalicivirusi, ugotovili januarja leta 2002, v tem prispevku pa opisujemo oktobrsko epidemijo v domu za ostarele. V prispevku prikazujemo potek epidemije, pri kateri smo dokazali kalicivirusne povzročitelje.

Preiskovanci, material in metode

Dne 1. 10. 2002 nas je zdravnica, zadolžena za zdravstveno varstvo oskrbovancev enega od pomurskih domov za starejše osebe, obvestila, da ima več oskrbovancev doma prebavne motnje. Po takojšnjem poizvedovanju smo ugotovili, da so se prve težave pri številnih oskrbovancih in pri negovalnem osebju doma začele v večernih urah dne 30. 9. 2002 (prvi dan epidemije).

Preiskovanci

V domu je 152 oskrbovancev in 67 zaposlenih. Skupno je zbolelo 61 oskrbovancev in 15 zaposlenih.

Metode

Pri obravnavi epidemije v domu ostarelih smo opravili epidemiološko poizvedovanje, epidemiološko anketiranje zbolelih, skupaj z zdravstveno inšpektorico smo opravili sanitarnotehnični ogled kuhinjskega bloka. Odvzeli smo tri shranjene vzorce hrane in 12 brisov na snažnost. Vzorce smo preiskali s standardnimi bakteriološkimi metodami po določilih ustreznih pravilnikov (10, 11). Odredili smo kontrolni zdravstveni pregled osebja v kuhinji z odvzemom koprokultur na patogene črevesne bakterije ter odvzem brisov žrela in nosu na bak-

terijo *Staphylococcus aureus*. Naročili smo odvzem kužnin zbolelih. Skupaj smo zbrali 35 kužnin zbolelih. Triindvajset vzorcev iztrebkov in osem vzorcev izbruhanine obolelih smo s standardnimi metodami preiskali na pri nas verjetne patogene črevesne bakterije (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 H7, *S. aureus*, *Bacillus cereus*). Štiri iztrebke smo s kvantitativno metodo preiskali na bakterijo *Clostridium perfringens* (12). Pri izolatih vrste *S. aureus* smo določali prisotnost enterotoksinov z metodo reverzne lateksne aglutinacije (SET-RPLA – Staphylococcal Enterotoxin test kit, Oxoid, Anglija) po navodilih proizvajalca. V 19 iztrebkih smo iskali antigene rotavirusov in adenovirusov z imunokromatografsko metodo (Diarlex MB, Orion-Diagnostica, Finska) po navodilih proizvajalca. Navedene preiskave smo opravili na Zavodu za zdravstveno varstvo Murska Sobota.

Nadaljnje virološke preiskave smo opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Deset vzorcev iztrebkov smo z metodo neposredne elektronske mikroskopije pregledali na viruse, povzročitelje črevesnih okužb, in izvedli verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ter produkte RT-PCR potrdili s hibridizacijo.

Elektronska mikroskopija (EM): uporabili smo standardno metodo negativnega kontrastiranja. Vzorce smo pregledali v transmisijem elektronskem mikroskopu Jeol – JEM 1200EX pri 40.000- do 100.000-kratni povečavi.

Izolacija in ekstrakcija virusne RNK: za ekstrakcijo RNK smo pripravili 10% suspenzijo iztrebka v PBS pH 7,4. RNK kalicivirusov smo izolirali iz 250 µL vzorca s komercialnim izolacijskim sistemom (SV Total RNA Isolation System, Promega) po navodilih proizvajalca.

RT-PCR: izbrali smo začetna oligonukleotida JV12Y in JV13I (13), za pomnoževanje odseka virusnega genoma za encim polimerazo, s katerima lahko določimo vse doslej znane antigenske skupine kalicivirusov. Uporabili smo reagentne in encime proizvajalca Promega (Access RT-PCR), ki omogočajo, da poteka reverzna transkripcija in pomnoževanje nukleinske kisline v eni stopnji. K 5 µL izolirane RNK smo dodali 1 µL (20 pmol) obeh začetnih oligonukleotidov (JV12Y in JV13I) in denaturirali 5 min pri 90 °C ter nadaljevali po že opisanem postopku (14). Po pomnoževanju smo 326 bp dolge produkte analizirali z elektroforezo v 3% agaroznem gelu. Specifičnost in pripadnost genskim skupinam GG I in GG II smo potrdili s hibridizacijsko metodo (PCR-ELISA-DIG Detection, Roche) po navodilih proizvajalca z uporabo z biotinom označenih sond. **Statistična značilnost:** statistično značilnost razlike med deleži zbolelih oseb po nadstropjih smo izračunali s hi-kvadrat testom (15). Za statistično značilno vrednost smo vzeli $p < 0,01$.

Rezultati

Opis poteka epidemije in klinične slike

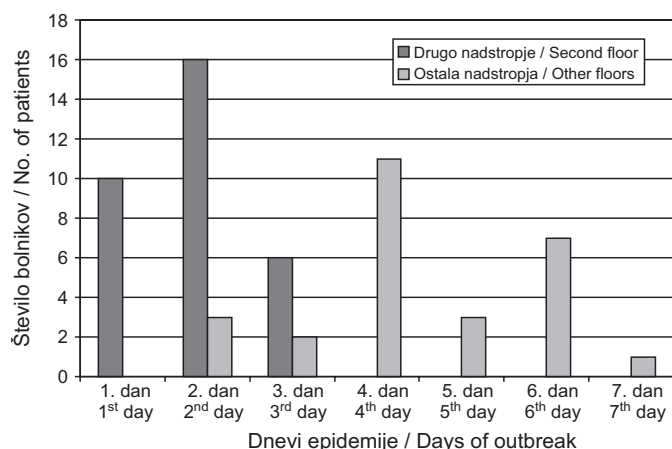
Epidemija je izbruhnila eksplozivno. V večernih in nočnih urah dne 30. 9. je zbolelo 14 oseb (10 oskrbovancev drugega nadstropja doma in štirje zaposleni). Skupaj je do konca epidemije zbolelo 76 oseb, od tega 61 od 152 oskrbovancev doma (40,1%) in 15 od 67 zaposlenih v domu (22,4%). Skupno je epidemija trajala 10 dni.

Pojavljanje bolezni pri oskrbovancih po dnevih in po nadstropjih doma je prikazano v razpredelnici 1, na sliki 1 pa je grafično prikazan prvi teden epidemije (ločeno so prikazani podatki za 2. nadstropje in združeni podatki za ostala nadstropja doma). Zbolelo je 55,2% oskrbovancev v 2. nadstropju doma (32 od 58 oseb) in 25,7% oskrbovancev iz drugih nadstropij doma (29 od 113 oseb). Razlika je statistično značilna ($\chi^2 = 8,89$, $p < 0,01$). Pri oskrbovancih 2. nadstropja je število zbolelih doseglo vrh drugi dan epidemije, na preostalih nadstropjih pa je število zbolelih doseglo prvi vrh četrti in drugi

Razpr. 1. Oskrbovanci v domu starejših, skupno število in delež zbolelih ter razporeditev bolnikov po dnevih epidemije in po nadstropjih.

Table 1. Number of residents in the aged-care facility, number and percentage of cases and days of onset of cases on different floors of the facility.

	Število oskrbovancev No. of residents	Število zbolelih No. of patients	Delež zbolelih (%) Percentage of patients (%)	Število zbolelih po dnevih epidemije No. of cases on each day of the outbreak									
				1. dan 1 st day	2. dan 2 nd day	3. dan 3 rd day	4. dan 4 th day	5. dan 5 th day	6. dan 6 th day	7. dan 7 th day	8. dan 8 th day	9. dan 9 th day	10. dan 10 th day
Pritličje / Ground floor	19	5	26,3			1	1		2		1		
I. nadstropje / I floor	48	16	33,3		1		8	2	3	1			1
II. nadstropje / II floor	58	32	55,2	10	16	6							
III. nadstropje / III floor	27	8	29,9		2	1	2	1	2				
Skupaj / All floors	152	61	40,1	10	19	8	11	3	7	1	1		1



Sl. 1. Prikaz števila bolnikov po dnevih epidemije, prikazano ločeno za drugo nadstropje in za ostala nadstropja.

Figure 1. Number of patients from the second floor and from all other floors on consecutive days of the outbreak.

vrh šesti dan. Od 61 zbolelih je v prvih štirih dneh zbolelo 78,6%, v prvih sedmih dneh pa 96,7% oseb. Bolezen oskrbovancev je trajala od 3 do 4 dni, vse bolnike je pregledala zdravstvena, ki v domu skrbi za zdravstveno varstvo. Nihče od 61 bolnikov ni potreboval napotitve v bolnišnico, nekateri bolniki so zaradi dehidracije dobili infuzije. Od znakov bolezni se je pri osmih bolnikih pojavilo bruhanje, pri 26 driska, pri 25 se je pojavilo oboje, driska in bruhanje, pri dveh pa le povišana temperatura. Večina zbolelih je občutila slabost in krče v trebuhu, 12 bolnikov je imelo povišano temperaturo. Skupaj je bruhalo 54%, drisko je imelo 84%, povišano temperaturo pa 20% od 61 bolnih oskrbovancev.

Bolezen zaposlenih je bila kratkotrajna, trajala je od 1 do 2 dni, pet oseb je iskalo zdravniško pomoč, nihče ni potreboval bolnišničnega zdravljenja. Razporeditev zbolevanja zaposlenih v prvih sedmih dneh epidemije je bila večinoma enakomerna.

Rezultati mikrobioloških preiskav

Rezultati bakterioloških preiskav hrane in brisov na snažnost. Odvzeti so bili trije vzorci hrane. Dva sta ustrezala pravilniku (10), iz enega pa smo osamili bakterijo *Clostridium perfringens*. Iz brisov na snažnost patogenih bakterij nismo osamili, rezultati so ustrezali pravilniku.

Rezultati bakterioloških preiskav vzorcev oseb iz kuhinje. Rezultati vseh preiskav so bili negativni, le pri eni osebi smo iz nosa osamili *S. aureus*. Preiskava na enterotoksine pri tem sevu je bila negativna.

Rezultati bakterioloških preiskav vzorcev bolnikov. Osamili smo en sev vrste *S. aureus*, vendar je bila pri njem preiskava

na enterotoksine negativna. V treh od štirih iztrebkov, ki smo jih preiskali na bakterijo *C. perfringens*, smo iskano vrsto našli, vendar je bila prisotna le v majhni koncentraciji (10^3 enot, ki tvorijo kolonije na gram vzorca). Ker je za dokaz etiološke vloge potrebna tisočkrat večja koncentracija te bakterije (1, 12), smo to izolacijo ocenili kot nepomembno. Drugih patogenih bakterij nismo našli.

Rezultati viroloških preiskav. Preiskava na rotaviruse in adenoviruse je bila negativna pri vseh vzorcih. S pregledom desetih iztrebkov smo v devetih našli kaliciviruse. V enem vzorcu smo kaliciviruse našli le z EM, v enem vzorcu le z RT-PCR, v sedmih vzorcih pa smo kaliciviruse našli z obema metodama. Z metodo RT-PCR in hibridizacije z gensko specifičnimi sondami smo v osmih vzorcih potrdili noroviruse genske skupine GG II, genskega svežnja 1 (virus Hawaii) in genskega svežnja 4 (virus Lordsdale).

Razpravljanje

Potek epidemije in uvedeni ukrepi

Varovanci v domu starejših so razporejeni v štirih nadstropjih, v vsakem je jedilnica, nekaterim varovancem s slabšim zdravjem obroke strežejo v sobi, nekaterim pa negovalno osebje pomaga pri hranjenju.

Ker je bil začetek epidemije eksploziven, naenkrat je zbolelo 14 oseb, z znaki bruhanja, driske ter s povišano telesno temperaturo, smo posumili na možnost okužbe s hrano. Ob začetnem epidemiološkem poizvedovanju drugi dan epidemije smo pregledali jedilnike poprejšnjih treh dni. Ker je bilo na jedilniku večkrat piščančje meso v različnih oblikah, smo posumili na okužbo s salmonelo, ki je po pri nas zbranih podatkih v Pomurju na prvem mestu med prijavljenimi povzročitelji gastroenteritisa (sledita kampilobakter in rotavirus v podobnem številu). Salmoneloza povzroča pri starejših osebah visoko smrtnost (8%), bolnišnično zdravljenje je pogosto, zato je diagnostika nujna (2). Sum smo kmalu skoraj opustili, saj je bolezen eksplozivno izbruhnila le v 2. nadstropju, tri vrste diete, ki jih imajo oskrbovanci na izbiro, pa so enakomerno delili po vseh štirih nadstropjih. Ker pa je bilo zanesljivo anamnezo o zaužitih posameznih živilih od oskrbovancev nemogoče dobiti (kar so v podobni ustanovi ugotovili tudi avstralski avtorji – 9), nekaj časa te možnosti nismo dokončno zavrgli. Bolezenski znaki so se pojavljali med oskrbovanci ne glede na to, ali so uživali obroke v sobi ali v jedilnicah po nadstropjih.

Nadaljnji potek epidemije, razviden iz razpredelnice 1 in slike 1, je kazal značilnosti neposrednega prenosa in ne prenosa s skupnim virom. Od osebja je zbolevalo medicinsko in negovalno osebje ne glede na to, v katerem nadstropju so delali (isto osebje občasno dela v različnih nadstropjih).

Glede na potek epidemije (relativno blag in kratkotrajen potek, bruhanje pri več kot polovici zbolelih in odsotnost drugih

povzročiteljev po dveh dneh preiskav) smo posumili na kaliciviruse kot možne povzročitelje epidemije (3). Rezultati pregledov postopkov s hrano, rezultati brisov na snaznost in sanitarno-tehnični pregled kuhinje niso pokazali nobenih pomembnejših nepravilnosti, kljub temu pa je zaposleno osebje takoj poostrilo higienski režim tako v kuhinji kot v jedilnici ter v bolniških sobah pri negi in hranjenju bolnikov. Ker so se drugi in tretji dan pojavljali primeri bolezni tudi na ostalih nadstropjih, smo od tretjega dneva epidemije naprej priporočili tudi omejitev gibanja oseb, kar je z ostalimi ukrepi verjetno bistveno pripomoglo k preprečevanju nadaljnega širjenja okužbe.

Iskanje povzročitelja

Kot je prikazano pri rezultatih, pomembnih patogenih bakterij nismo našli. Odsotnost rotavirusov in adenovirusov je pomembna, saj so pri obvladovanju rotavirusnih epidemij potrebni posebni ukrepi (2). Pozitiven rezultat preiskav na kaliciviruse je diagnostičen, saj teh virusov pri normalnih zdravih osebah ni, možni so le nosilci kalicivirusov v času prebolevanja asimptomatske okužbe in nekaj dni po njej (3, 9).

Posebnosti kalicivirusov in prikazana epidemija

Kalicivirusi so virusi, ki se prenašajo fekalno-oralno, njihova posebnost pa je pogost prenos z neposrednim stikom in tudi aerogeno, tako da tudi v primeru epidemij s hrano ali vodo sledijo še sekundarni primeri (3, 9). Menimo, da je preprečitev nadaljnega širjenja epidemije v domu v veliki meri posledica kratkotrajne omejitve stikov med varovanci doma. Etiološko neprepoznane bolezni s kalicivirusi v domovih za starejše lahko potekajo več tednov in zajamejo do 73% populacije, saj klasični ukrepi za preprečitev fekalno-oralnega širjenja povzročiteljev pri kalicivirusih niso zadostni (9). Etiološka diagnostika epidemije, ki jo povzročijo kalicivirusi pri starejših, je še posebej pomembna, saj so stari ljudje populacija, pri kateri ta navadno neogrožajoča bolezen lahko poteka tudi s smrtnim izidom (7).

Preprosto dostopnih diagnostičnih metod za dokazovanje kalicivirusov ni, zato je nujen transport vzorcev do diagnostičnih centrov, kjer jih pregledajo z elektronsko mikroskopijo in molekularnimi metodami. Vzorcev pred preiskavo ne smemo zamrzniti (3). Izbor tekočih vzorcev iztrebkov in pravičen transport vzorcev v hladilni torbi pripomoreta k uspešnosti obeh metod za dokazovanje kalicivirusov (3).

RT-PCR s hibridizacijo z gensko specifičnimi sondami je omogočila prvi dokaz epidemije s kalicivirusi v domovih za starejše v Sloveniji. Z metodo smo dokazali prisotnosti kalicivirusov iz dveh različnih genskih svežnjev v isti epidemiji, kar v Sloveniji še ni bilo opisano.

Zaključki

Po hitrem obveščanju zdravnice, ki je epidemijo zaznala, je epidemiološka služba na osnovi pridobljenih epidemioloških značilnosti epidemije in etioloških mikrobioloških preiskav uspela pravočasno uvesti specifične ukrepe in omejiti epidemijo, ki v tovrstnih kolektivih neprepoznana lahko traja več tednov. Z identifikacijo povzročitelja s specifičnimi molekularnimi metodami smo dobili podatke, ki uvrščajo kaliciviruse genske skupine II med pomembne povzročitelje gastroenteritisa pri starejših ljudeh tudi v Sloveniji.

Zahvala

Zahvaljujemo se Adi Hočevar-Grom, dr. med., spec. med. dela, prometa in športa, z Oddelka za epidemiologijo nalezljivih bolezni Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije, za posredovanje epidemioloških podatkov za leto 2002.

Literatura

- Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and management of foodborne illnesses: a primer for physicians. MMWR 2001; 50 (No. RR-2): 1-123.
- Radšel-Medvešček A. Črevesne okužbe. In: Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Tangram, 2002: 83-166.
- Centers for Disease Control and Prevention. »Norwalk-like viruses:« public health consequences and outbreak management. MMWR 2001; 50 (No. RR-9): 1-17.
- Pringle CR. Virus taxonomy. Arch Virol 1999; 144: 421-9.
- Green KY, Ando T, Balayan MS et al. Taxonomy of caliciviruses. J Infect Dis 2000; 181: Suppl 2: S322-30.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5: 607-25.
- Lew JF, Glass RI, Gangarosa RE, Cohen IP, Bern C, Moe CL. Diarrheal deaths in the United States, 1979 through 1987: a special problem for the elderly. JAMA 1991; 265: 3280-4.
- Green KY, Belliot G, Taylor JL et al. A predominant role for Norwalk-like viruses as agent of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. J Infect Dis 2002; 185: 133-46.
- Milazzo A, Tribe IG, Ratcliff R, Doherty C, Higgins G, Givney R. A large, prolonged outbreak of human calicivirus infection linked to an aged-care facility. Commun Dis Intell 2002; 26: 261-4.
- Pravilnik o higieni živil. Ur. l. RS 60/02.
- Pravilnik o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in o njihovem preprečevanju. Ur. l. SRS 24/81.
- Collins HE, Lyne PM, Grange JM. Collins and Lyne's microbiological methods. 7th ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1995: 270-410.
- Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimisation of generic primers used for Norwalk-like viruses detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Virol 2002; 25: 233-5.
- Poljšak-Prijatelj M, Frelih T, Zimšek J, Berce I, Barlič-Maganja D. Kalicivirusi - povzročitelji epidemičnega gastroenteritisa pri otrocih - izkušnje v Sloveniji. Zdrav Vestn 2001; 70: 619-22.
- Knapp RG, Miller MC. Clinical epidemiology and biostatistics. Baltimore: Williams Wilkins, 1992: 187-424.