

Molekularbiologischer Nachweis von „Norwalk“-Virus bei sporadischer nichtbakterieller Gastroenteritis

Detection of Norwalk-like Virus RNA in Cases of Sporadic Nonbacterial Gastroenteritis

S. Burggraf^{1,2}, S. Gambihler¹, S. Feyerabend¹, B. Olgemöller¹

Zusammenfassung: Aus insgesamt ca. 5.000 Stuhlproben aus dem südbayerischen Raum wurden 89 Proben von Patienten mit Gastroenteritissymptomen (wäßrige Stühle), bei denen andere bakterielle und virale Erreger von Gastroenteritiden nicht nachweisbar waren, mit Reverser Transkriptions (RT)-PCR auf das Vorhandensein von „Norwalk-like“-Viren (NLV) untersucht. 11% dieser Proben waren positiv. Das entspricht einer NLV-Prävalenz von mindestens 0,2% im Gesamtkollektiv. Wir schließen aus unseren Ergebnissen, daß NLV nicht nur bei epidemischen Gastroenteritisausbrüchen zu finden sind, sondern auch für einzeln auftretende Gastroenteritiden verantwortlich sein können. Es ist anzunehmen, daß NLV in diesen Fällen mindestens die Prävalenz von Yersinien oder Verotoxin-produzierende Escherichia coli aufweisen.

Schlüsselwörter: Calicivirus; Norwalk-like virus; Small round-structured virus; RT-PCR; Gastroenteritis.

Summary: From about 5,000 stool specimens from southern Bavaria (Germany) 89 from patients with symptoms of gastroenteritis (watery stool), which were negative for other common bacterial and viral gastroenteritis pathogens, were examined for Norwalk-like viruses (NLV) by reverse transcription (RT)-PCR. 11% of these samples were positive. Relating to the total number of samples the prevalence of NLVs was at least 0.2%. We conclude that NLVs can be detected not only in epidemic outbreaks of gastroenteritis but also as a causative agent in sporadic cases of gastroenteritis. It can be assumed that in these cases NLVs at least show the prevalence of Yersinia or Verotoxin-producing Escherichia coli.

Keywords: Calicivirus; Norwalk-like virus; small round-structured virus; RT-PCR; gastroenteritis.

Vertreter der „Norwalk“-Virusgruppe (Norwalk-Like Viren; NLV), früher aufgrund ihrer Morphologie als „Small Round-Structured Viruses“ (SRSV) bezeichnet, sind einzelsträngige RNA-Viren, die zur Familie der Caliciviridae gehören [1-3]. Sequenzunterschiede im RNA-Polymerase-Gen führten zu einer Einteilung der NLV in zwei Untergruppen bzw. Genogruppen. Die Genogruppe 1 enthält das eigentliche „Norwalk Virus“, das erste „Small Round-Structured Virus“, das als Ursache eines akuten Gastroenteritisausbruchs beschrieben wurde [4]. Auch das „Desert Shield Virus“ und das „Southampton Virus“ werden dieser Gruppe zugeordnet. Zur Genogruppe 2 gehören Viren, die eine hohe Sequenzhomologie der RNA Polymerase z. B. zum „Snow Mountain Agens“ und den sogenannten „Hawaii-Virusstämmen“ aufweisen. Man nimmt an, daß NLV die häufigste Ursache für Ausbrüche nichtbakterieller akuter Gastroenteritiden insbesondere in Gemeinschaftseinrichtungen wie z. B. Krankenhäusern [5], Altenheimen [6] oder Kreuzfahrtschiffen [7] sind [8]. Bei Kleinkindern stellen sie nach Rotaviren die zweithäufigste Ursache akuter Gastroenteritiden dar [8-11].

Der Nachweis von NLV ist durch das Fehlen von Methoden zur Viruszucht und von kommerziell erhältlichen Tests zum Antigennachweis erschwert [12]. Daher wird häufig die Elektronenmikroskopie (Solid Phase Immune Electron Microscopy; SPIEM) zur Diagnose eingesetzt. Allerdings ist diese Methode für Routineuntersuchungen kaum geeignet und weist zudem eine verhältnismäßig geringe Sensitivität auf [12].

In jüngster Zeit konnte die Diagnostik durch die Entwicklung von Tests zum Nachweis viraler Ribonukleinsäure mittels Reverser Transkriptions-(RT)-PCR verbessert werden [12,17].

Hier beschreiben wir die Untersuchung von einzeln auftretenden, unzusammenhängenden Gastroenteritidenfällen auf das Vorliegen von NLV mittels RT-PCR.

Material und Methoden

Patienten

Von August bis September 1998 und von November 1998 bis Februar 1999 wurden insgesamt etwa 5000 Stuhlproben von ca. 1000 Arztpraxen und 50 Krankenhäusern aus Südbayern in das Labor eingesandt, die mittels Kultur oder Enzymimmunoassay (EIA) auf

¹Labor Becker, Olgemöller und Kollegen, Führichstr. 70, D-81671 München

²Korrespondenzadresse: Dr. Siegfried Burggraf, Labor Becker, Olgemöller und Kollegen, Führichstr. 70, D-81671 München. Fax: +49-89-450917-300, Tel.: +49-89-450917-461.

E-mail: burggraf@labor-bo.de

Eingegangen: 29. Mai 2000/Angenommen: 2. Oktober 2000

das Vorliegen verschiedener Gastroenteritis-assoziiierter viraler und bakterieller Erreger bzw. Toxine untersucht wurden. 89 Stuhlproben wurden aufgrund ihrer flüssigen Konsistenz, die auf eine akute Gastroenteritis hindeutete, weiter untersucht. Diese Proben hatten ein negatives Untersuchungsergebnis für Salmonellen, Shigellen, Campylobacter, Verotoxin-produzierende Escherichia coli (VTEC), Yersinien, Rotavirus, Adenovirus und Clostridium-difficile-Toxin. Mehrfachproben eines Patienten waren nicht enthalten bzw. wurden ausgeschlossen.

RNA-Extraktion

Die Stuhlproben wurden ca. 1:5 in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und eine Minute bei 4.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und die RNA aus 140 µl Filtrat mit dem „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Oligonukleotide für die RT-PCR, Sequenzierung und Hybridisierung

Die Oligonukleotide „NVni“ (5' GAA TTC CAT CGC CCA CTG GCT 3') oder „NVp36“ (5' ATA AAA GTT GGC ATG AAC A 3') und „NVp110“ (5' ACD ATY TCA TCA TCA CCA TA 3') wurden als PCR-Primer verwendet [13-15, 18]. Die PCR-Primer wurden auch für die Sequenzierung der PCR Produkte eingesetzt. Für die Hybridisierung wurden zwei verschiedene Gemische von 5'-Biotin markierten Oligonukleotiden verwendet. Das Sondengemisch zur Detektion von NLV der Genogruppe 1 beinhaltet die Oligonukleotide SR65d 5' ACA TCA GGT GAT AAG CCA GT 3' und SR67d 5' ACA TCT GGT GAG AGA CCT GA 3' [14]. PCR-Produkte von NLV der Genogruppe 2 wurden durch Hybridisierung mit einem Gemisch der Oligonukleotide SR47d 5' ATG TCA GGG GAC AGG TTT GT 3' und SR61d 5' ATG TCG GGG CCT AGT CCT GT 3' [14] nachgewiesen.

RT-PCR

5 µl RNA wurde durch Inkubation bei 25 °C für 10 Minuten und bei 42 °C für 30 Minuten in DNA inkubiert. In einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt der Ansatz 1,5 mM MgCl₂, jeweils 0,1 mM dGTP, dATP, dCTP und dTTP, 1 mM Dithiothreitol, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 1 Unit RNase Inhibitor, 1 Unit MuLV Reverse Transkriptase und 2,5 µM Zufalls-Hexamere (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA und Roche Diagnostics, Mannheim).

Nach Denaturierung für 5 Minuten bei 99°C wurde 40 µl eines PCR Gemisches mit jeweils 20 pmol der beiden Primer, dGTP, dATP, dCTP (jeweils 0,25 mM), 0,75 mM dUTP, 2 mM MgCl₂, 0,5 Units hitze-labile Uracil-DNA Glykosylase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1,25 Units Hot StarTaq DNA-Polymerase (QIAGEN GmbH, Hilden) zugegeben. Für die Hybridisierung wurden die Nukleotide durch einen Nukleotidmix ersetzt, der Digoxigenin-markiertes dUTP enthält (PCR DIG Labeling Mix^{PLUS}, Roche Diagnostics,

Mannheim). Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (PE 9600; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit folgendem Temperaturprofil: 30 °C für 10 Minuten, 95 °C für 15 Minuten und 40 Zyklen mit 94 °C für 30 Sekunden, 50 °C für 40 Sekunden und 72 °C für 30 Sekunden.

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese auf 3%igem Agarose-Gel aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid in UV-Licht sichtbar gemacht.

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde ein PCR ELISA Kit verwendet (Roche Diagnostics, Mannheim). 4 µl Digoxigenin-markiertes PCR-Produkt wurden mit 36 µl Denaturierungslösung (PCR ELISA; Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 pmol Sondengemisch in 200 µl Hybridisierungspuffer (PCR ELISA; Roche Diagnostics, Mannheim) wurde 3 Stunden bei 37 °C in mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten hybridisiert. Die weitere Detektion erfolgte gemäß Herstellerprotokoll (PCR ELISA; Roche Diagnostics, Mannheim).

Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden über Zentrifugationssäulen (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt. In einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt der Sequenzierungsansatz 50 ng PCR-Produkt, 10 pmol Primer und 1 µl BigDye Terminator RR Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Inkubation erfolgte für 25 Zyklen mit 96 °C für 10 Sekunden, 55 °C für 5 Sekunden und 60 °C für 4 Minuten in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler. Der Sequenzierungsansatz wurde durch Ethanolpräzipitation gereinigt und für 2 Minuten bei 95 °C in 20 µl „template suppression reagent“ (TSR, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) denaturiert. Die Auftrennung der Sequenzfragmente erfolgte mit einem Kapillar-Sequenziergerät (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter Standardbedingungen (Kapillare 45 cm x 50 µm, „Performance Optimized Polymer 6“, Injektionszeit 30 Sekunden, Injektionsspannung 2 kV, Laufspannung 15 kV, Laufzeit 20 Minuten). Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme „Sequencing Analysis Version 3.0“ und „MT Navigator“ (beide Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die erlangte Sequenz wurden mit Sequenzen aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, USA, verglichen (Programm „blastn“ [19]).

Ergebnisse

Bei 17 von 89 für die NLV-RT-PCR ausgewählten Proben, wurde bei Anwendung des NVni-NVp110 Primerpaars ein PCR Produkt mit der richtigen Größe von 117 Basenpaaren gefunden. Eine Probe (Patient

Tabelle 1 Durch Sequenzierung und/oder Hybridisierung bestätigt PCR-positive Proben (PCR-Primer NVni und NVp110). Aufgeführt sind die Patienten-Identifikationsnummer mit Alter des Patienten, die Stärke des PCR-Produkts auf dem Agarose-Gel nach Ethidiumbromid-Färbung, die bei der Genbanksuche gefundene Sequenz mit der höchsten Ähnlichkeit (Genbanknummer und Prozent der übereinstimmenden Nukleotide), die Stärke des Hybridisierungssignal der Gengruppen-spezifischen Sondengemische sowie die durch Sequenzierung und/oder Hybridisierung ermittelte Genogruppe.
G1/2: Genogruppe 1/2. n.d.: nicht durchgeführt.

Patienten-Nummer (Alter)	Gel	Vergleichssequenz	Hybridisierung		Genogruppe
			G1	G2	
900317 (25)	+++	NLU87652 (97%) AF178968 (93%)	+++	-	G1
900737 (25)	++	n.d.	+++	+++	?
901138 (4)	+++	X81879 (81%)	+	+++	G2
901370 (47)	+++	AB046339 (100%)	++	+++	G2
910979 (37)	+++	L25111 (97%)	-	-	G2
912668 (74)	++	n.d.	+	+++	G2
913853 (49)	+++	n.d.	-	+++	G2
914923 (5)	+	n.d.	-	+	G2
915139 (69)	+++	n.d.	+	+++	G2
949731 (25)	++	AB046339 (97%)	n.d.	n.d.	G2

901138) ergab mit der Primerkombination NVp36-NVp110 ein positives PCR-Ergebnis. Diese Probe war jedoch auch mit den NVni-NVp110 Primern positiv.

Bei 10 von den 17 Proben konnte das positive PCR-Resultat durch Sequenzierung und/oder Hybridisierung bestätigt werden (Tabelle).

In der Sequenzanalyse mit Hilfe der NCBI-Datenbank ergaben die Proben 901370, 910979 und 949731 mit 97 bis 100% Sequenzübereinstimmung nah verwandte Vergleichssequenzen der Genogruppe 2 (Tabelle). Die Probe 901138 zeigte nur 81% Sequenzhomologie zu der am nächsten verwandten Vergleichssequenz mit der Genbanknummer X81879 (Tabelle). Diese wiederum ist zu 97% identisch mit dem „Snow Mountain Agens“ (HCU70059), ebenfalls einem Vertreter der Genogruppe 2. Eine exakte Einteilung der Probe 901138 wird erst durch genauere phylogenetische Analysen möglicherweise unter Zuhilfenahme der Gensequenz des „small basic protein“ möglich sein [17]. Eine Probe (Patient 910979) konnte durch Sequenzvergleich als NLV der Genogruppe 2 identifiziert werden (Tabelle 1), ergab jedoch bei der Hybridisierung mit keinem der beiden Sondengemische ein Signal. Als Ursache fand sich in dieser Probe eine Sequenzvariation der Bindungsregion der Sonden. Insgesamt ließen sich 8 von 10 Proben durch Sequenzierung und/oder Hybridisierung der Genogruppe 2 zuordnen.

Bei der Probe 900317 ergab der Sequenzvergleich eine Zugehörigkeit zur Genogruppe 1 (Tabelle). Diese Sequenz ist nah verwandt mit der Sequenz BAV/2.1/98/DEU (AF178968), die bei einem Gastroenteritisausbruch in einem Altersheim in Bayern im Februar 1998 detektiert wurde [17].

Die Probe des Patienten 900737 ergab bei der Hybridisierung mit beiden Sondengemischen ein gleich

starkes Signal. Da auch die Sequenzierung dieser Probe aufgrund zusätzlicher unspezifischer Banden in der RT-PCR nicht erfolgreich war, konnte diese Probe keiner Genogruppe zugeordnet werden.

Diskussion

Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob NLV in Bayern auch für einzeln auftretende, unzusammenhängende Gastroenteritisfälle verantwortlich sind. Bislang wurden NLV hauptsächlich als Erreger von Gastroenteritisausbrüchen in Gemeinschaftseinrichtungen beschrieben [z. B. 20, 21]. Zwar gibt es inzwischen auch einige Veröffentlichungen mit Daten, die die Bedeutung von NLV in einzeln auftretenden, unzusammenhängenden Gastroenteritisfällen bei Kindern [z. B. 9, 10] und bei Erwachsenen u. a. in Japan, Kanada und den Niederlanden aufzeigen [z. B. 22, 23], die bisher einzige uns bekannte deutsche Studie beschäftigt sich jedoch mit der Epidemiologie von NLV-Gastroenteritisausbrüchen [17].

Gegenüber früher verwendeten Nachweisverfahren weist die für unsere Studie verwendete Methode der RT-PCR Vorteile auf. So ist sie im Vergleich zur Elektronenmikroskopie sensitiver [12]. Da die RT-PCR vergleichsweise einfach durchgeführt werden kann, ist eine Integration in ein schnelles Routine-Untersuchungsprogramm für Gastroenteritiserreger möglich. Kürzlich beschriebene RT-PCR Primer erfassen einen breiten Bereich verschiedener NLV [13, 15, 18].

Im Rahmen unserer Studie wurde die RT-PCR mit zwei verschiedenen Primersystemen durchgeführt, deren Ziel die RNA Polymerase Region im Virus Genom [1, 2] darstellt, die bei verschiedenen NLV-Stämmen stark konserviert ist. Das Oligonukleotid

NVp110 [15] wurde in beiden Testansätzen verwendet. Im ersten Ansatz wurde „NVp110“ zusammen mit „NVni“ [13] eingesetzt. Diese Kombination ist vor allem zur Detektion von NLV der Genogruppe 2 geeignet. Jede Probe wurde mit einem zweiten Primerpaar, bestehend aus „NVp110“ und „NVp36“ [18] untersucht. Der Primer „NVp36“ eignet sich besser zur Detektion von NLV der Genogruppe 1 [15]. Es zeigte sich, daß alle positiven Proben mit dem ersten Primerpaar erfaßt wurden. Nur eine Probe ergab zusätzlich ein Produkt mit dem zweiten Primerpaar. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer englischen Studie, die zeigte, daß das Primerpaar NVp110 / NVni die überwiegende Mehrheit der NLV Stämme erfaßt [13].

Insgesamt 17 Stuhlproben ergaben ein RT-PCR Amplikon mit der korrekten Größe, aber nur 10 dieser Proben konnten durch Hybridisierung und/oder Sequenzierung als virusspezifisch bestätigt werden. Die anderen 7 Proben hatten bereits in der ersten RT-PCR Produkte ergeben, die nur als schwache Bande bei der Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung erkennbar waren. Eine Wiederholung der PCR, um mehr Produkt für einen Sequenzierungsansatz oder um Digoxigenin als Markierung für eine Hybridisierung einzubauen, war nicht erfolgreich. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in einem Abbau der RNA in der ursprünglichen Probe. Ein falsch positives Ergebnis in der ersten PCR erscheint aufgrund der eingesetzten Maßnahmen zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen, wie z.B. strikte räumliche Trennung von Probenaufarbeitung und Analyse der PCR-Produkte sowie Verwendung von Uracil-DNA-Glykosylase zur Zerstörung von PCR-Kontaminationen [24], unwahrscheinlich.

Die in mehreren Veröffentlichungen nachgewiesene Dominanz von NLV der Genogruppe 2 in Europa konnte auch durch unsere Arbeit bestätigt werden (80% NLV der Genogruppe 2) [13, 17].

Die Prävalenz von NLV in unserem Probenkollektiv lag bei 11%, wenn man nur die durch Sequenzierung und/oder Hybridisierung bestätigten Ergebnisse wertet.

Das Auftreten der positiven Proben war in unserer Studie über den ganzen Untersuchungszeitraum verteilt. Auch wurden die 10 bestätigt positiven Proben von verschiedenen Arztpraxen (8 Fälle) und Krankenhäusern (2 Fälle) eingesandt. Daraus ist zu schließen, daß die positiven Proben einzeln auftretende Gastroenteritisfälle repräsentieren und nicht einem Ausbruch zugeordnet werden können. Dies zeigte sich auch darin, daß die 5 erlangten Sequenzen (Tabelle 1) unterschiedlich waren.

Die Bedeutung von NLV bei sporadischen Gastroenteritiden bei Kindern wurde bereits gezeigt [9, 10]. Von den positiven Proben in unserer Studie stammten jedoch nur 2 von Kindern (Tabelle).

Wenn man die Zahl der Patienten mit positivem NLV-Ergebnis (10 bestätigt positive Proben) auf die Gesamtzahl der im Studienzeitraum eingesandten Gastroenteritis-Untersuchungsanforderungen bezieht

(ca. 5.000 Proben), würde sich eine NLV-Häufigkeit von 0,2% ergeben. Dies liegt im Bereich anderer bekannter Gastroenteritis-Erreger, wie VTEC oder Yersinien.

Da nur Stühle nach eng gefaßten Auswahlkriterien auf NLV untersucht wurden, ist anzunehmen, daß die detektierten 0,2% positiven Proben bezogen auf das Gesamtkollektiv die unterere Prävalenzgrenze repräsentieren.

Einige Gründe sprechen für eine NLV-Prävalenz über 0,2%. Für die vorliegende Untersuchung wurden nur wäßrige Stühle ausgewählt. Es ist aber bekannt, daß NLV noch einige Zeit nach Infektion ausgeschieden werden können, auch dann wenn keine Symptome mehr vorhanden und die Stuhlproben der Patienten nicht mehr wäßrig sind [3, 8]. Auch wurden nur Stuhlproben untersucht, in denen keine anderen Gastroenteritiserreger nachweisbar waren. Eine Doppelinfektion von NLV mit anderen Gastroenteritiserregern ist jedoch nicht auszuschließen. Schließlich besteht aufgrund der hohen Sequenzvariabilität der NLV die Möglichkeit, daß einige NLV-Stämme aufgrund von Sequenzvariationen in den Primerbindungsstellen nicht erfaßt wurden.

Zusammenfassend kann man aus unseren Ergebnissen schließen, daß NLV nicht nur Erreger epidemischer Ausbrüche nichtbakterieller Gastroenteritiden in Gemeinschaftseinrichtungen sind, sondern auch für einzeln auftretende Fälle in allen Altersgruppen verantwortlich sein können. Die Prävalenz liegt mindestens bei der von VTEC- oder Yersinien-Infektionen. Die genaue Häufigkeit einzeln auftretender NLV-Infektionen wird sich durch die Einführung des NLV-Nachweises in die Routinediagnostik ergeben.

Danksagung

Wir bedanken uns bei *Edith Schuhmacher* und *Naeem Malik* für die hervorragende Mitarbeit.

Literatur

1. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993;259:516-9.
2. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993;195:51-61.
3. Hardy ME. Norwalk and „Norwalk-like viruses“ in epidemic gastroenteritis., in *Clinics in laboratory medicine*, J.C.H. Steele, Editor. 1999, W.B.Saunders Company: Philadelphia. p. 675-690.
4. 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.
5. Chadwick PR, McCann R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* 1994;26:251-259.
6. Jiang X, Turf E, Hu J, Barrett E, Dai XM, Monroe S, Humphrey C, Pickering LK, Matson DO. Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses. *J Med Virol* 1996;50:335-41.
7. McEvoy M, Blake W, Brown D, Green J, Cartwright R. An outbreak of viral gastroenteritis on a cruise ship. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1996;6:R188-92.
8. Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric

- caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2):S254-61.
9. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, Pothier P, Kohli E. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol* 1999;37:3055-8.
 10. Pang XL, 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. *Paediatr Inf Dis J* 1999;18:420-426.
 11. Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2):288-94.
 12. Maguire AJ, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in East Anglia, United Kingdom, during the 1996-1997 season. *J Clin Microbiol* 1999;37:81-9.
 13. Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DWG. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995;47:392-398.
 14. Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995;33:64-71.
 15. Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, Atmar RL. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol* 1996;141:2225-35.
 16. RKI. Erkrankungen durch Norwalk-Ähnliche-Viren. *RKI-Epidemiologisches Bulletin* 2000; 11. Folge.
 17. Schreier E, Doring F, Kunkel U. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol* 2000;145:443-53.
 18. Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY, Estes MK. Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol* 1994;68:5982-90.
 19. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
 20. Vinjé J, Koopmans MPG. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000;38:2595-2601.
 21. Green KY. The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* 1997;13:153-65.
 22. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2):284-7.
 23. Koopmans M, Vinje 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(Suppl 2):262-9.
 24. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990;93:125-8.