پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۶۸ تا ۷۳

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی فراوانی عفونت نورویروسی و ژنوگروه غالب آن در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد مراجعین به دو بیمارستان تخصصی کودکان تهران در ۱۳۸۷-۱۳۸۸

سارا رومانی[۱،۲]، دکتر سید رضا محبی[۱]، دکتر سید مسعود حسینی[۲]، پدرام عظیم زاده[۱]، محسن واحدی[۱]، دکتر فرزانه جدلی[۳]، دکتر محمدرضا زالی[۱]

[۱] مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش وکبد، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
[۳] گروه پاتولوژی و علوم آزمایشگاهی، بیمارستان کودکان مفید، تهران

چکیده

سابقه و هدف: *یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین پاتوژن های مسئول در ایجاد گاستروانتریت‌های حاد غیرباکتریایی نورویروس‌های انسانی(NoVs) هستند. از آنجایی که اطلاعات محدودی در رابطه با اسهال‌های نورویروسی در کودکان تهران وجود دارد، در این مطالعه میزان شیوع عفونت نورویروسی و همچنین ژنوگروه های I و II این ویروس در بین کودکان زیر ۱۰ سال با اسهال‌های حاد مراجعه کننده به بیمارستان کودکان مفید و مرکز طبی کودکان تهران درسال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷ بررسی شد.*

روش بررسی: *تحقیق به روش توصیفی روی ۲۰۴ نمونه مدفوعی ازکودکان زیر ۱۰ سال که دچار اسهال‌های حاد بودند، در طی یک سال جمع‌آوری شدند. استخراج RNA و RT-PCR به وسیله پرایمرهایی که طراحی شده بودند و توانایی ایجاد تمایز بین ژنوگروه I و IIنورویروس را داشتند، انجام گردید. شیوع عفونت نورویروسی و ژنوگروه غالب در نمونه‌ها تعیین و میزان واقعی آن در جامعه برآورد گردید.*

یافته‌ها: *RNA نورویروس در ۲۳ (۱۱/۳ درصد) نمونه مدفوعی کودک ردیابی شد که از این تعداد ۶ نمونه به ژنوگروه I و ۱۷ نمونه به ژنوگروه II متعلق بود. بیشترین تعداد کودکان مبتلا به عفونت نورویروسی در آذر ماه شناسایی شدند و میانگین سنی آنها ۲/۸±۴ سال بود.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که نورویروس در اسهال‌های کودکان ایرانی مطرح است و احتمالا" عفونت نورویروسی در ماه های سرد شیوع بیشتری دارد. همچنین ژنوگروه IIاین ویروس ژنوگروه غالب کودکان ایرانی است.*

واژگان کلیدی: *نورویروس، گاستروانتریت،کودکان، تهران.*

مقدمه

گاستروانتریت ویروسی یکی از عوامل مهم مطرح در بستری شدن کودکان در بیمارستان و مرگ و میر آنها در سراسر جهان به شمار می‌آید (۱). گاستروانتریت ویروسی هم‌چنین دومین بیماری شایع در ایالات متحده نیز محسوب می‌شود. البته این بیماری در صورتی شکل جدی به خود می‌گیرد که مایعات کافی جایگزین آب از دست رفته بدن نشود (۲). از مهم‌ترین پاتوژن‌های مسئول در ایجاد گاستروانتریت‌های حاد غیرباکتریایی نورویروس‌های انسانی(NoVs) هستند که باعث التهاب معده، روده کوچک و بزرگ می‌شوند و به عنوان عامل

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش وکبد، دکتر سید رضا محبی (**e-mail:** srmohebbi@rigld.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۵/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۹/۱۶

مشکلات و التهاب گوارشی در تمامی مقاطع سنی شناخته می‌شوند. بر طبق گزارش های رسیده از کشورهای مختلف ۵ تا ۱۷ درصد از کل اسهال‌ها عامل نورویروسی دارند (۳). همچنین این ویروس عامل بیش از ۸۵ درصد گاستروانتریت‌های غیرباکتریایی در اروپا بوده است (۴). طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط گلاس و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که ۵ تا ۳۱ درصد از کل بیماران بستری شده در بیمارستان و همچنین ۵ تا ۳۶ درصد از بیماران سرپایی مراجعه کننده به درمانگاه پزشکی به علت اسهال حاد، گاستروانتریت نورویروسی داشته‌اند (۵).

نورویروس دارای سه ژنو گروه بیماری‌زا (I، II وIV) در انسان است که ژنوگروه‌های I و II مسئول موارد عمده عفونت در انسان شناخته شده‌اند (۶). نورویروس حاوی یک RNA تک‌رشته مثبت با طول ۷/۷-۷/۵ Kb و سه ناحیه ORF است. ORF1 و ORF2 به ترتیب پروتئین‌های غیرساختاری و پروتئین‌های کپسید (VP1) را کد می‌کنند. ORF3 کد کننده پروتئین کوچکی است که در ارتباط با VP1 عمل می‌کند. این ویروس کوچک و فاقد پوشش با اندازه‌ای در حدود ۴۰-۲۷ نانومتر است (۷).

انتشار نورویروس‌ها در اماکن عمومی به سهولت امکان‌پذیر می‌باشد. انتقال آنها به صورت دهانی- مدفوعی در محیط‌های پرجمعیت و بسته صورت می‌گیرد. به گزارش مرکز پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) در اغلب همه‌گیری‌های گاستروانتریت نورویروسی، عوامل اصلی انتقال شامل خوردن غذای آلوده، نوشیدن آب آلوده و تماس مستقیم با فرد عفونی بوده است (۸). از میان مواد غذایی آلوده می‌توان به صدف‌های خوراکی، میوه‌ها، سبزیجات خام، آب و یخ و همچنین ساندویچ و سالاد اشاره کرد که در این میان صدف‌های خوراکی در بین سایر مواد غذایی از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۹).

گاستروانتریت ناشی از نورویروس ملایم و به صورت خود محدود شونده است (۱۰). علائم بیماری با استفراغ آغاز می‌شود و منتهی به اسهال آبکی می‌شود (۲). طول مدت بیماری ۱ تا ۲ روز است و بیشتر علائم ۱۲ ساعت بعد از خوردن غذا و یا نوشیدنی آلوده آشکار می‌شود که البته گاهی این علائم ۴۸ ساعت بعد از قرار گرفتن در معرض ویروس نیز ظاهر می‌گردد (۹). جهت تشخیص گاستروانتریت نورویروسی تنها بررسی علائم بالینی کفایت نمی‌کند، زیرا تظاهرات بالینی این عفونت مشابه سایر اسهال‌های ویروسی است. طبق مطالعه‌ای که توسط پاتل و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت، RT-PCR به عنوان یک روش استاندارد با دقت بالا جهت شناسایی نورویروس گزارش شده است. از Real-time-PCR کمّی جهت تشخیص نورویروس در اپیدمی‌های این ویروس استفاده می‌شود و همچنین روش‌های مختلف EIA پیشنهاد شده است که از دقت کمتری نسبت به روش‌های فوق الذکر برخوردار هستند (۱۱).

اهمیت مطالعه حاضر با دقت در شیوع قابل توجه نورویروس در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد در سایر نقاط دنیا، بیش از پیش مشخص می‌گردد و از سوی دیگر باید به این نکته توجه نمود که تاکنون هیچ‌گونه بررسی و مطالعه‌ای بر روی نورویروس و سهم آن در ایجاد اسهال حاد کودکان تهرانی نشده است. هدف این مطالعه، تعیین میزان شیوع عفونت نورویروسی و همچنین تعیین ژنوگروه‌های I و II این ویروس در بین کودکان زیر ۱۰ سال مبتلا به اسهال‌های حاد مراجعه کننده به بیمارستان کودکان مفید و مرکز طبی کودکان تهران از خرداد ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸ می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی مقطعی (Cross-Sectional)، ۲۰۴ نمونه مدفوعی مورد بررسی قرار گرفت. شرایط ورود به مطالعه سن کمتر از ۱۰ سال و ابتلا به گاستروانتریت حاد به مدت کمتر از ۳ روز بود. از ۲۰۴ کودک زیر ۱۰ سال مبتلا به گاسترو انتریت حاد (اسهال آبکی، استفراغ و تب) بعد از کسب اجازه از والدین آنها و گرفتن شرح حال دقیق، اطلاعات مربوط به هر بیمار شامل سن، جنس، محل سکونت، زمان ابتلا به بیماری، منبع آب آشامیدنی و طول مدت بستری شدن بررسی و در پرسش‌نامه‌ای ثبت شد. سپس از هر کودک یک نمونه مدفوعی تازه جهت انجام آزمایشات مولکولی بعدی گرفته شد. انتقال کلیه نمونه‌ها از بیمارستان به آزمایشگاه، تحت زنجیره سرد انجام گرفت و تا انجام آزمایشات مولکولی در دمای ۲۰- ذخیره گردیدند.

رقیق سازی نمونه‌های مدفوعی توسط محلول ۰/۸۹ درصد NaCl انجام شد و در ادامه با استفاده از فیلترهای ۰/۲ میکرومتری فیلترگردیدند. محلول فیلتر شده حاصل جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA از نمونه مدفوعی توسط QIAamp viral RNA kit (QIAGEN، آلمان) طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت و CDNA سازی با استفاده از RevertAid^{TM} M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas، کانادا) بلافاصله انجام شد.

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) به وسیله دو جفت پرایمر که طراحی شده بودند، انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱– پرایمرهای مورد استفاده

ژنوگروه	توالی پرایمر	نام پرایمر
GenogroupI	5- ATH GAA CGY CAA ATY TTC TGG AC -3	Noro GI Forward
GenogroupI	5- CCA ACC CAR CCA TTR TAC A -3	Noro GI Reverse
GenogroupII	5- CNT GGG AGG GCG ATC GCA A -3	Noro GII Forward
GenogroupII	5- CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT -3	Noro GII Reverse

این پرایمرها قادر به ایجاد تمایز بین ژنوگروه I و II نورویروس بودند. علت استفاده از این روش حساسیت بالای آن در شناسایی ویروس است. PCR طی دو مرحله RT-PCR و Nested PCR انجام شد. در هر دو مرحله PCR، مخلوطی که شامل ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر Taq Polymerase و ۰/۵ میکرولیتر dNTP تهیه شد که در نهایت ۵ میکرولیتر از CDNA به مرحله اول PCR و ۲ میکرولیتر از محصول مرحله اول PCR به Nested PCR اضافه گردید و توسط آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید و در ترموسایکلر طبق برنامه جدول‌های ۲ و ۳ گذاشته شد.

جدول۲– برنامهPCR

مراحل برنامه	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل‌ها
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵	۳۰ ثانیه	۴۰
اتصال پرایمرها	۴۸	۳۰ ثانیه	
ساخت رشته مکمل و طویل شدن	۷۲	۲ دقیقه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۷ دقیقه	۱

جدول ۳– برنامه Nested PCR

مراحل برنامه	دما(درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل‌ها
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۰
اتصال پرایمرها	۴۸	۳۰ ثانیه	
ساخت رشته مکمل و طویل شدن	۷۲	۲ دقیقه	
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

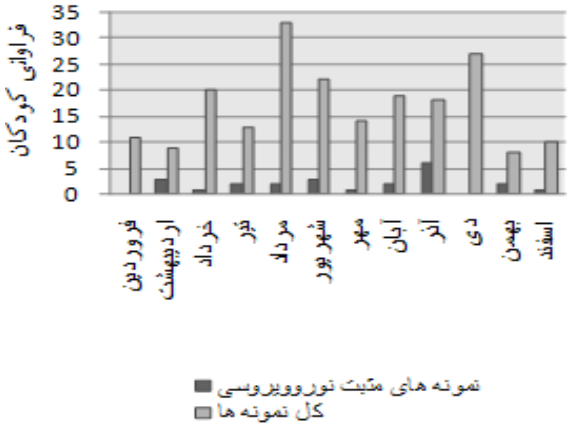
محصولات واکنش توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از شناساگر اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفتند. شیوع عفونت نورویروسی و ژنوگروه غالب آن در نمونه ها تعیین و میزان واقعی (Confidence. Interval= C.I) با احتمال ۹۵درصد در جامعه برآورد گردید و نقش سن و جنس با عفونت نورویروسی توسط آزمون کای‌دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۲۰۴ بیمار مورد بررسی، ۸۸ نفر (۴۳/۱ درصد) دختر و ۱۱۶ نفر (۵۶/۹ درصد) پسر بودند. سن دختران ۲/۸۷±۲/۹ سال و پسران ۲/۹±۳ بود.

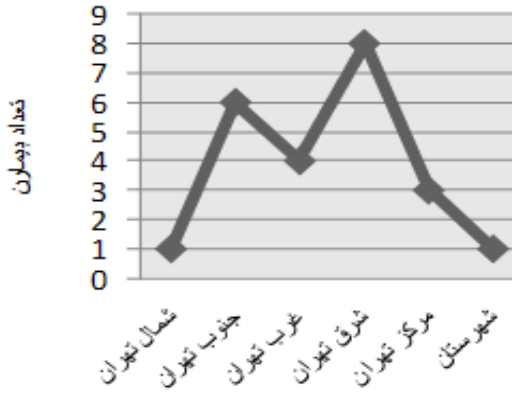
RNA نورویروس در ۲۳ نمونه مدفوعی کودکان معادل شیوع ۱۱/۳ درصد یافت شد. با توجه به این شیوع در نمونه‌ها، میزان واقعی با احتمال ۹۵ درصد از حداقل ۹/۱ تا ۱۳/۵ در صد برآورد می‌گردد. از این تعداد، ۱۰ کودک دختر (۱۱/۲ درصد)، ۱۳ کودک پسر (۱۱/۴ درصد) و سن آنها ۲/۸±۴ بود. از میان ۲۳ نمونه مدفوعی که حضور نورویروس در آنها تایید شدند، ۶ نمونه (۲/۹ درصد) به ژنوگروه I و ۱۷ نمونه (۸/۳ درصد) به ژنوگروه II تعلق داشت که سهم دختران و پسران در ابتلا به ژنوگروه I و II نورویروس به ترتیب ۳ دختر و ۳ پسر مبتلا به ژنوگروه I و ۷ دختر و۱۰ پسر مبتلا به ژنوگروه II بود. سن کودکان مبتلا به ژنوگروه I و II نیز به ترتیب ۲/۹۵±۴ و ۲/۹±۴ بود و ارتباط معنی‌داری بین ابتلا به این بیماری و جنس یافت نشد (P<۰/۷).

توزیع نمونه‌های مورد بررسی بر حسب درصد فراوانی و به تفکیک ماه‌های سال در نمودار شماره ۱ ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که شایع ترین موارد مثبت در آذر ماه بود.



نمودار ۱– توزیع نمونه‌ها در ماه‌های مختلف سال

پراکنش جغرافیایی بیماران مبتلا به اسهال‌های نورویروسی که به بیمارستان کودکان مفید و مرکز طبی کودکان در تهران مراجعه کرده اند، در نمودار ۲ آمده است.



نمودار ۲– پراکنش جغرافیایی بیماران مبتلا به اسهال نورویروسی

بدین ترتیب بیشترین تعداد بیماران مبتلا به اسهال‌های نورویروسی از مناطق جنوب و شرق و کمترین آنها از شمال تهران بودند.

از نظر تظاهرات بالینی همراه با اسهال نورویروسی به ترتیب تب در۷۸/۳ درصد و استفراغ در ۸۷ درصد بیماران دیده شد. در پی گیری بیماران مبتلا به اسهال نورویروسی، ۶۵/۲ درصد (۱۵ بیمار) با درمان‌های سرپایی و توصیه به استفاده از الکترولیت خوراکی (ORS) در منزل مرخص شدند و ۳۴/۸ درصد (۸ بیمار) به بستری شدن نیاز پیدا کردند.

بحث

نورویروس‌ها از مهم‌ترین ویروس‌های روده‌ای هستند که ایجاد مشکلات گوارشی حاد می‌کنند. انتشار این ویروس در محیط‌های بسته به سهولت امکان‌پذیر است و از این رو عفونت‌زایی بالایی دارند و باعث ایجاد اپیدمی‌های گسترده‌ای در نقاط مختلف جهان می‌شوند. میزان شیوع این ویروس در بین کودکان در پاکستان ۹/۹ درصد (۱۲)، در هند ۱۱/۹ درصد (۱۳) ، در برزیل ۱۲ درصد (۱۴) و در ایتالیا در طی یک شیوع در بیمارستان کودکان ۴۸/۴ درصد (۱۵) گزارش شده است که این میزان شیوع نشان دهنده اهمیت این ویروس در ابتلای کودکان به گاستروانتریت نورویروسی است. با توجه به این که تا به حال گزارشی در رابطه با میزان شیوع این ویروس در بین کودکان ایرانی نشده است، اهمیت درک میزان شیوع نورویروس بیش از پیش آشکار می شود.

در این تحقیق نشان داده شد که آلودگی RNA نورویروس در ۱۱/۳ درصد از موارد گاستروانتریت حاد وجود داشت و این آمار اهمیت اسهال ناشی از این ویروس را در میان کودکان مورد مطالعه بیان می‌کند. این میزان نزدیک به نتایجی است که در بین کودکان سایر کشورها مانند عربستان با ۹/۲ درصد (۱۶)، برزیل ۱۲ درصد (۱۴)، نیکاراگوئه ۱۲ درصد (۱۷)، هند ۱۱/۹ درصد (۱۳) و پاکستان با ۹/۹ درصد (۱۲) گزارش شده است.

بیشترین میزان عفونت‌های نورویروسی در ماه‌های سرد سال (اکتبر تا آوریل) مشاهده می‌گردند، اما احتمال ابتلا به عفونت نورویروسی در تمامی طول سال وجود دارد (۱۶). اپیدمی‌های گسترده نورویروسی با آغاز پاییز در نقاط مختلف دنیا ایجاد می‌شود تا جایی که از این بیماری تحت عنوان اسهال و استفراغ فصل سرد یاد می‌شود (۱۹) که نشان دهنده رابطه ابتلا به عفونت نورویروسی فصل سرد است. با ایجاد شرایط دمایی که موجب افزایش دوام ویروس می‌گردد، می‌توان علت افزایش شیوع این ویروس را در نیمه دوم سال توجیه کرد. همان طور که انتظار می‌رفت در این مطالعه نیز این رابطه تایید شد به طوری که بیشترین تعداد موارد مثبت در آذر ماه بود (۳۳/۳ درصد از کل اسهال‌ها در این ماه منشاء نورویروسی داشتند) که کاملا با مطالعات پیشین در نقاط دیگر دنیا مطابقت دارد (۱۲، ۲۴–۲۰).

از آنجایی که عفونت نورویروسی در اغلب مواقع نیاز به درمان خاصی ندارد و به صورت خود محدود شونده است (۱۰)، ۶۵/۲ درصد از کودکان مبتلا به این بیماری در این مطالعه نیز با درمان‌های سرپایی مرخص شدند و تنها ۳۴/۸ درصد از کودکان در پی ابتلا به عفونت نورویروسی بستری شدند. این آمار بیانگر این مطلب است که هرچند نورویروس عامل بیش از ۱۱ درصد از کل گاستروانتریت‌های کودکان در تهران محسوب می‌شود، اما در مرگ‌ومیر ناشی از اسهال در کودکان از اهمیت قابل توجهی برخوردار نیست.

در پی‌گیری که از لحاظ محل سکونت بیماران مراجعه کننده به بیمارستان کودکان مفید و مرکز طبی کودکان صورت گرفت (جدول۲)، مشخص شد که بیش از نصف موارد عفونت نورویروسی (۶۱ درصد) تنها از دو منطقه پر جمعیت جنوب و شرق تهران بود که این آمار نشانگر اهمیت سهولت انتشار نورویروس در مناطق پر ازدحام با سطح پایین‌تر زندگی است.

همان طور که اشاره شد نورووویروس دو ژنوگروه عمده بیماری-زا در انسان دارد که ژنوگروه غالب آن ژنوگروه II است. میزان شیوع ژنوگروه I و ژنوگروه II به ترتیب در تایوان ۱۱/۳ درصد و ۸۸/۷ درصد (۲۰) ، در برزیل ۴۸ درصد و ۵۲ درصد (۱۹) و در عراق ۲۳ درصد و ۷۴ درصد (۲۵) است. در ایران نیز نتایج به دست آمده از این پژوهش مؤید برتری ژنوگروه II (۷۴ درصد) به ژنوگروه I (۲۶ درصد) در کودکان است.

بر طبق مطالعاتی که تاکنون انجام شده، جهت پیشگیری و کنترل شیوع نورووویروس در میان کودکان، شستشوی دست‌ها با آب گرم و صابون بعد از تعویض پوشک بچه و استفاده از سرویس‌های بهداشتی پیشنهاد شده است. همچنین شستن دست ها قبل از تهیه مواد غذایی که با دست به صورت مستقیم در ارتباط هستند، مانند انواع سالادها و ساندویچ‌ها و پختن کامل مواد غذایی که معمولا به صورت خام و یا نیمه خام مصرف می‌شوند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵،۱۱).

از آنجایی که نمونه‌های جمع آوری شده از دو بیمارستان تخصصی کودکان در تهران بوده است که مراجعه کنندگان بسیاری از شهرستان‌ها را دارند (به علت فقدان چنین مراکز تخصصی در شهرستان ها)، این نتایج را می‌توان به عنوان الگویی از توزیع نورووویروس در مقیاس کوچک در بین کودکان ایرانی دانست، اما جهت به دست آوردن آمار دقیق‌تری از شیوع گاستروانتریت نورووویروسی در بین کودکان ایرانی در آینده می‌توان شیوع نورووویروس را در سایر شهرستان‌ها مورد بررسی قرار داد.

نتایج حاصل از این پژوهش مبین نقش آشکار نورووویروس در اختصاص دادن سهمی از اسهال‌های کودکان به خود می باشد که تاکنون اهمیت این ویروس در گاستروانتریت‌های کودکان از دید ما پنهان مانده بود. از دیگر یافته‌های بدست آمده در این مطالعه، تایید افزایش احتمال ابتلا به عفونت نورووویروسی در ماه‌های سرد و برتری ژنوگروه II در کودکان است.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند از همکاری صمیمانه خانمها لیلا کاشی و سیده مینا سیدی و آقای سجاد مجیدی زاده بزرگی تشکر نمایند

REFERENCES

1. Barari Savadkoohi R, Ahmadpour-Kacho M, Yahyapour Y. Prevalence of viral gastroenteritis in children with acute gastroenteritis in Babol, Iran. J Pediatr Infect Dis 2007; 4: 211-14.
2. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. U.S. Department of Health and Human Services. Viral gastroenteritis. Bethesda: NIH Publication No. 06–5103; 2006.
3. Norovirus Infections. Infectious Disease Epidemiology Section Office of Public Health, Louisiana Department of Health and Hospitals 2009; 800: 256-2748. Available from: www.infectiousdisease.dhh.louisiana.gov.
4. Lopman BA, Reacher MH, Van Duijnhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. Emerg Infect Dis 2003; 9: 90–96.
5. Glass Roger I, Parashar Umesh D, Estes Mary K. Norovirus gastroenteritis. N Engl J Med 2009; 361: 1776-85.
6. Yuen LKW, Catton MG, Cox BJ, Wright PJ, Marshall JA. Heminested multiplex revers transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. J Clin Microbiol 2001; 39: 2690–94.
7. Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N. Investigation of norovirus replication in a human cell line. Arch Virol 2006; 151: 1291–308.
8. Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. Disaster Manage Response 2004; 2: 4-9.
9. . Schneider KR, Schneider RG, Hubbard M, Shukla R. Preventing foodborne illness: norovirus. FSHN 2005; 0518: 1-3.
10. Tsang OTY, Wong ATY, Chow CB, Yung RWH, Lim WWL, Liu SH. Clinical characteristics of nosocomial norovirus outbreaks in Hong Kong. J Hosp Infect 2008; 69,: 135-40.
11. Patel Manish M, Halla Aron J, JanParashar V, Umesh D. Noroviruses: a comprehensive review. J Clin Virol 2009; 44: 1–8.
12. Gia Phan T, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, et al. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. J Med Virol 2004; 73: 256-61.
13. Chhabra P, Chitambar SD. Norovirus genotype IIb associated acute gastroenteritis in India. J Clin Virol 2008; 42: 429–32.

14. Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FMU, Cuevas LE, Cunliffe NA, et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. Arch Virol 2008; 153: 957–60.

15. Colomba C, Saporito L, Giammanco GM, Grazia SD, Ramirez S, Arista S, et al. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. Emerg Infect Dis 2007; 9: 1389-91.

16. Mamdoh MM, Thwiny IR. Prevalence of group a rotavirus, enteric adenovirus, norovirus and astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in Al-Qassim, Saudi Arabia. Pak J Med Sci 2007; 23: 551-55.

17. Filemon B, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F, Svensson L. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. J Clin Microbiol 2008; 46: 2573–80.

18. Fretz R, L Herrmann, Christen A, Svoboda P, Dubuis O, Viollier EH, et al. Frequency of norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 214–16.

19. Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MCM, Maranhão AG, Rocha LN, et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. Emerg Infect Dis 2007; 8: 1244-46.

20. Wu TC, Liu HH, Chen YJ, Tang RB, Hwang BT, Yuan HC. Comparison of clinical features of childhood norovirus and rotavirus gastroenteritis in Taiwan. J Chin Med Assoc 2008; 11: 566-70.

21. Froggatt PC, Vipond IB, Ashley CR, Lambden PR, Clarke IN, Caul EO. Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales during one winter season (1999–2000). J Med Virol 2004; 72: 307–11.

22. Fruhwirth M, Karmaus W, Moll-Schuler I, Brosl S, Mutz I. A prospective evaluation of community acquired gastroenteritis in paediatric practices: impact and disease burden of rotavirus infection. Arch Dis Child 2001; 84: 393–97.

23. Chiu TF, Lee CN, Lee PI, Kao CL, Lin HC, Lu CY, et al. Rotavirus gastroenteritis in children: 5-year experience in a medical center. J Microbiol Immunol Infect 2000; 33: 181–86.

24. Medici MC, Martinelli M, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Dodi I, et al. Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. Acta Biomed 2004; 75: 100–106.

25. Najim AMM, Nakagomi O, Dove W, Ahmed H, Nakagomi T, Hart CA, et al. Norovirus gastroenteritis among children in Iraqi Kurdistan. J Med Virol 2008; 80: 506–509.