

شناسایی و تعیین ژنو گروه نوروویروس در بیماران بزرگسال با موارد حاد گاستروانتریت

سارا رومانی^۱، سید رضا محبی^۲، سید مسعود حسینی^۳، پدرام عظیم زاده^۴، سجاد مجیدی زاده بزرگی^۵، محسن واحدی^۶، محمد رضا زالی^۷

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، محقق ویروس شناسی مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دکترای ویروس شناسی پزشکی، محقق ویروس شناسی مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، (مؤلف مسؤول)

تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۵ | srmohbbi@rigld.ir

۳- استادیار ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۶- دانشجوی دکتری آمار زیستی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۷- استاد گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: نوروویروس‌های انسانی (NoVs) یکی از مهمترین عوامل شایع گاستروانتریت‌های حاد هستند. نوروویروس‌ها بسیار عفونی‌اند و انتقال آنها به صورت فرد به فرد و از راه مدفوعی- دهانی می‌باشد. نوروویروس‌ها را می‌توان به پنج ژنوگروه تقسیم‌بندی کرد که ژنوگروه‌های I و II به عنوان عامل عمده عفونتهای نوروویروسی در انسان شناخته شده است. اطلاعات کافی در رابطه با اسهال‌های نوروویروسی مربوط به افراد بزرگسال در تهران وجود ندارد. هدف این مطالعه تعیین میزان عفونت نوروویروسی در افراد بالای ۱۸ سال با مشکلات گوارشی و اسهال‌های حاد که به بیمارستان شهدا تجریش در تهران مراجعه کرده‌اند است.

روش بررسی: ۶۷ نمونه مدفوعی از بیماران بالای ۱۸ سال که دچار اسهال‌های حاد بودند، در تهران بین خرداد ماه ۱۳۸۷ تا بهمن ۱۳۸۷ جمع‌آوری شد. RNA استخراج و RT-PCR به وسیله پرایمرهایی که طراحی شده بودند و می‌توانستند بین ژنوتایپ I و II نوروویروس تمایز قائل شوند انجام گردید.

یافته‌ها: RNA نوروویروس در ۳ نمونه مدفوعی بیمار (۴/۵٪) ردیابی گشت. هر سه نمونه مثبت متعلق به ژنوگروه I بود و در فصل پائیز شناخته شد. متوسط سن افراد مبتلا $32 \pm 8/7$ سال بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نقش نوروویروس را به عنوان یک عامل ویروسی مسؤول در موارد گاستروانتریت در افراد بزرگسال آشکار می‌کند. همچنین این نتایج نشان دهنده برتری ژنوتایپ I نوروویروس در گاستروانتریت‌های حاد افراد بزرگسال در تهران است.

کلید واژه‌ها: نوروویروس، گاستروانتریت، تهران

وصول مقاله: ۸۸/۱۲/۳ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۳/۲ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۱۷

مقدمه

نوروویروس‌های انسانی (NoVs) یکی از مهمترین عوامل شیوع گاستروانتریت‌های حاد غیر باکتریایی هستند و اغلب به عنوان عامل مشکلات و التهاب گوارشی تک گیر در همه گروه‌های سنی در سرتاسر جهان شناخته می‌شوند. در کنار نوروویروس می‌توان به سایر ویروس‌های روده‌ای مانند روتاویروس،

آسایشگاه‌های سالمندان و کشتی‌ها و ... می‌باشد. به گزارش CDC در اغلب همه‌گیری‌های گاستروانتریت نوروویروسی عوامل اصلی انتقال شامل: خوردن غذای آلوده، نوشیدن آب آلوده و تماس مستقیم با فرد عفونی بوده است (۱۰).

همچنین مطالعات دیگر نشان دادند که منشاء آلودگی این ویروس می‌تواند صدف‌های خوراکی، میوه‌ها، سبزیجات خام، آب، یخ، همچنین ساندویچ و سالاد باشد که صدف‌های خوراکی در این رابطه از اهمیت بیشتری برخوردار هستند، زیرا آنها می‌توانند ویروس‌هایی موجود در محیط را تغلیظ کند. به عبارت دیگر صدف‌های خوراکی به صورت Filter-Feeders عمل می‌کنند که مصرف خام این ماده غذایی می‌تواند باعث افزایش احتمال آلودگی شود (۱۱).

علائم بیماری ۲۴-۴۸ ساعت بعد از ورود ویروس آشکار می‌شود و در بعضی افراد این زمان تا ۱۲ ساعت نیز تقلیل می‌یابد و به صورت ملایم و خود محدود شونده اتفاق می‌افتد. علائم بیماری ۱۲ تا ۶۰ ساعت ادامه می‌یابد. در بعضی افراد تا ۲ هفته بعد از بهبودی نیز ویروس از مدفوع آنها قابل جداسازی است.

با توجه به این که تاکنون گزارشی مبنی بر میزان سهم نوروویروس در ایجاد عفونت‌های گاستروانتریتی در ایران نشده است، هدف این مطالعه شناسایی میزان شیوع عفونت نوروویروسی و همچنین تعیین ژنوتیپ‌های I و II این ویروس در بین بیماران بالای ۱۸ سال با اسهال‌های حاد مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدای تجریش در تهران می‌باشد. در این مطالعه همچنین اثر فاکتورهای سن، جنس، توزیع جغرافیایی، توزیع فصلی، منبع آب آشامیدنی و وضعیت بستری بودن بیماران بر روی حضور ژنوم ویروس، مورد بررسی قرار گرفت.

آدنوویروس و آستروویروس اشاره کرد که از این میان روتاویروس به عنوان عامل عمده اسهال در نوزادان و کودکان زیر ۵ سال با شیوع ۹/۲٪ شناخته می‌شود (۴-۱). سهم آدنوویروس و آستروویروس در عفونت‌های گاستروانتریتی‌های به ترتیب ۲٪ و ۲/۷٪ گزارش شده است (۴). گزارش‌ها از کشورهای مختلف حاکی از آن است که ۵٪ تا ۱۷٪ از کل اسهال‌ها عامل نوروویروسی دارند (۵). به گزارش CDC (مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها)، ۲۳ میلیون گاستروانتریت حاد هر ساله در اثر عفونت نوروویروسی در ایالات متحده اتفاق می‌افتد و هر ساله ۵۰۰۰۰ نفر در اثر این بیماری بستری می‌شوند (۶). نوروویروس در هر دو گروه سنی افراد بالغ و کودکان ایجاد بیماری می‌کند (۷) که نقش عفونت‌های نوروویروسی در ایجاد اسهال‌های حاد در افراد بالغ نسبت به بقیه عوامل ویروسی و باکتریایی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است.

این ویروس‌ها کوچک و فاقد پوشش با اندازه ۲۷-۴۰nm است که حاوی یک RNA تک رشته مثبت به طول ۷/۷-۷/۵ Kb با سه ناحیه ORF است. ORF1 و ORF2 به ترتیب پروتئین‌های غیر ساختاری و پروتئین‌های کپسید (VP1) را کد می‌کنند. ORF3 کدکننده پروتئین کوچکی است که در ارتباط با VP1 عمل می‌کند (۸).

نوروویروس دارای ۵ ژنوتیپ (G I - G V) مختلف است. ژنوتیپ I، II و IV در انسان، III در گاو و V در موش بیماریز است. ژنوتیپ I و II مسئول موارد عمده عفونت در انسان شناخته شده است (۹).

نوروویروس‌ها نسبتاً به آسانی در اماکن عمومی منتشر می‌شوند. انتقال آنها به صورت دهانی مدفوعی در محیط‌های بسته مانند بیمارستانها، مدرسه‌ها،

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی-تحلیلی (مقطعی) به شمار می‌رود.

۶۷ نمونه مدفوعی از بیماران بالای ۱۸ سال دچار مشکلات گوارشی و اسهال‌های حاد مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدای تجریش در تهران طی خرداد ماه ۱۳۸۷ تا بهمن ۱۳۸۷ جمع‌آوری شد. کلیه نمونه‌ها پس از جمع‌آوری از بیمارستان، تحت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا انجام آزمایشات مولکولی در دمای ۲۰- ذخیره شدند.

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

استخراج RNA و CDNA سازی: استخراج RNA

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

انجام PCR: به وسیله دو جفت پرایمر جهت تکثیر N/S domain که ناحیه میانی بین ORF1 و ORF2 است، مطابق سه مطالعه مربوط به کایاما و همکاران (۱۲)، کوچیما و همکاران (۱۳) و گالیمور و همکاران (۱۴) انجام شد. (جدول ۱). این پرایمرها قادر به ایجاد تمایز بین ژن‌گروه I و II نورویروس بودند. علت استفاده از این روش حساسیت بالای آن در شناسایی ویروس است (۱۷-۱۵).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام پرایمر	توالی پرایمر	ژن‌گروه
Noro GI Forwar - PCR	5- ATH GAA CGY CAA ATY TTC TGG AC -3	GenogroupI
Noro GI Reverse - PCR	5- CCA ACC CAR CCA TTR TAC A -3	GenogroupI
Noro GII Forwar - PCR	5- CNT GGG AGG GCG ATC GCA A -3	GenogroupII
Noro GII Reverse - PCR	5- CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT -3	GenogroupII
Noro GI Forwar -Nested PCR	5- GGA GAT CGC AAT CTC CTG CCC -3	GenogroupI
Noro GI Reverse - Nested PCR	5- CCA ACC CAR CCA TTR TAC A -3	GenogroupI
Noro GII Forwar - Nested PCR	5- TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT -3	GenogroupII
Noro GII Reverse -Nested PCR	5- CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT -3	GenogroupII

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 جدول ۲ و ۳ گذاشته شد.

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 با غلظت ۱X، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۱/۵ میلی مول، ۲/۵ واحد Taq DNA Polymerase، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط حاوی ۰/۲ میلی مول از هر dNTP و ۵ پیکو مول از هر پرایمر تهیه شد که در نهایت ۵ میکرولیتر از CDNA به

اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver. 11.5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در آنالیز توصیفی از فراوانی و درصد فراوانی و نیز شاخص مرکزی میانگین و در آنالیز تحلیلی از تست آماری Chi-square و Mann-Whitney U استفاده شد.

یافته‌ها

از بین ۶۷ نمونه مدفوعی بیمار ۳۶ (۵۳٪) نمونه مرد و ۳۱ (۴۷٪) زن بودند. متوسط سن مردان $35 \pm 11/0$ سال و زنان $40 \pm 14/7$ سال بود. حضور نورویروس در ۳ (۴/۵٪) نمونه تأیید شد که همگی متعلق به ژنوگروه I بودند. متوسط سن افراد مبتلا $32 \pm 8/7$ سال بود، که از این تعداد ۲ نفر مرد و یک نفر زن بودند.

۳۱ (۴۷٪) نمونه در شش ماهه ابتدای سال و ۳۶ نمونه (۵۳٪) نیز در شش ماهه دوم سال اخذ شد که نمونه‌های مثبت نورویروس همگی متعلق به فصل پائیز (۲ نمونه در آذر ماه و ۱ نمونه در آبان ماه) بودند.

توزیع جغرافیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده در جدول ۵ آورده شده است، همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین تعداد نمونه مربوط به غرب تهران (۳۴٪) و کمترین آن مربوط به جنوب تهران (۱۲٪) می‌باشد. از بین ۳ نمونه‌ای که حضور نورویروس در آن تأیید شد ۲ (۶۶/۶٪) نمونه مربوط به جنوب تهران و یک نمونه (۳۳/۳٪) مربوط به شرق تهران بود.

جدول ۲: برنامه PCR

مراحل برنامه	دما C°	زمان	تعداد سیکل‌ها
دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۱۰ min	۱
دنا تورا سیون	۹۵	۳۰s	
اتصال پرایمرها	۴۸	۳۰s	۴۰
ساخت رشته مکمل و طویل شدن	۷۲	۲ min	
طویل شدن نهایی	۷۲	۷ min	۱

جدول ۳: برنامه Nested PCR

مراحل برنامه	دما C°	زمان	تعداد سیکل‌ها
دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۲min	۱
دنا تورا سیون	۹۵	۳۰s	
اتصال پرایمرها	۴۸	۳۰s	۳۰
ساخت رشته مکمل و طویل شدن	۷۲	۲ min	
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ min	۱

محصولات واکنش توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از شناساگر اتیدیوم برآید مورد ارزیابی قرار گرفتند.

طول قطعه DNA حاصل از RT-PCR و Nested PCR برای ژنوگروه I و II در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴: اندازه طول قطعات DNA بر روی ژل آگاروز

	Genogroup I	Genogroup II
PCR	597 bp	468 bp
Nested PCR	324 bp	300 bp

جدول ۵: توزیع مناطق جغرافیایی

	غرب تهران	شرق تهران	شمال تهران	جنوب تهران	مراجعه کنندگان از شهرستانها
کل نمونه‌ها	۲۳(۳۴٪)	۹(۱۳٪)	۱۷(۲۵٪)	۸(۱۲٪)	۱۰(۱۵٪)
نمونه‌های مثبت	۰	۱	۰	۲	۰

کشورهایی که الگوی تغذیه‌ای متفاوت نسبت به ما دارند این آمار تغییراتی می‌یابد. شیوع نوروویروس در سوئیس ۱۷/۹٪ (۲۳)، تایوان ۲۱/۹٪ (۲۴)، نیکاراگوئه ۱۲٪ (۲۵)، برزیل ۱۲٪ (۲۲)، ایتالیا ۴۸/۴٪ (۱۹) و هند ۱۱/۹٪ (۲۱) است. این افزایش آمار می‌تواند به علت رژیم غذایی متفاوت نسبت به کشورهای خاور میانه باشد. به عنوان مثال مصرف خام محصولات دریایی مانند؛ صدف خوراکی یکی از راه‌های اصلی انتشار این ویروس است (۱۱) که این الگوی تغذیه‌ای در کشورهای خاورمیانه از جمله ایران بسیار نادر است، در نتیجه شیوع این ویروس را در این کشورها کمتر می‌کند.

گاستروانتریت‌های نوروویروسی در تمام گروه‌های سنی دیده می‌شود و محدودیت سنی در ابتلا به این بیماری وجود ندارد (۲۶). یافته‌های حاصل از این مطالعه نیز هیچگونه ارتباطی بین گروه سنی خاص و ابتلا به این بیماری را نشان نمی‌دهد.

گرچه احتمال ابتلاء به گاستروانتریت نوروویروسی در تمام طول سال وجود دارد، اما اوج پیک عفونت‌زایی نوروویروس در فصل سرما است (۲۳)، تا جایی که از این بیماری تحت عنوان اسهال و استفراغ فصل سرد یاد می‌شود (۲۷) که نشان دهنده رابطه ابتلاء به گاستروانتریت نوروویروسی در نیمه دوم سال (فصول سرد) است. با توجه به اینکه نوروویروس یک RNA ویروس است، ناپایداری RNA در برابر افزایش دما می‌تواند علت شیوع بیشتر این ویروس را در نیمه دوم سال توجیه کند. همان طور که انتظار می‌رفت در این مطالعه نیز این رابطه تایید شد به طوری که کلیه نمونه‌های مثبت مرتبط با آبان و آذر بود که کاملاً با سایر مطالعات مشابه مطابقت دارد (۳۱-۲۸ و ۲۴ و ۲۰).

در میان ۶۷ نمونه، ۴۱ نمونه (۶۱٪) مربوط به بیماران بستری شده و ۲۶ نمونه (۳۹٪) متعلق به بیماران سرپایی بود که کلیه نمونه‌های مثبت به بیماران سرپایی تعلق داشت.

در این مطالعه منبع آب آشامیدنی بیماران نیز مورد بررسی قرار گرفت که ۵۹ بیمار (۸۸٪) از آب شهری، ۴ بیمار (۶٪) از آب چاه و ۲ بیمار (۳٪) از آب تانکر و ۲ بیمار (۳٪) نیز از آب معدنی استفاده کرده بودند. با توجه به این که منبع آب آشامیدنی تمامی بیمارانی که دچار عفونت نوروویروسی شده بودند آب شهری بوده است، ارتباط مشخصی میان آب مصرفی و عفونت نوروویروسی مشاهده نگردید ($p > 0.05$). همچنین رابطه معنی‌داری بین گروه‌های سنی و ابتلا مشاهده نشد ($p > 0.05$).

بحث

از نوروویروس‌ها به عنوان یکی از مهمترین عوامل گاستروانتریت‌های حاد غیر باکتریایی یاد می‌شود. این ویروس بسیار عفونی است و انتشار آن به راحتی امکان پذیر است. با این وجود، تا به حال هیچ گزارشی مبنی بر تعیین میزان شیوع این ویروس در ایران ارائه نشده است، این در حالی است که این ویروس عامل ۴۰٪ بیماری‌های ناشی از غذا در ایالات متحده است (۱۸). میزان شیوع این ویروس در ایتالیا در طی یک شیوع در بیمارستان کودکان ۴۸/۴٪ (۱۹)، پاکستان ۹/۹٪ (۲۰)، در هند ۱۱/۹٪ (۲۱) و در برزیل ۱۲٪ (۲۲) گزارش شده است.

در این مطالعه از بین ۶۷ نمونه‌ای که بررسی شد ۳ نمونه مثبت تشخیص داده شد که این مقدار برابر ۴/۵٪ از کل نمونه‌های مدفوعی اسهالی است. در مقایسه با سایر

استفاده بیماران نیز مورد بررسی قرار گرفت. هیچ کدام از بیمارانی که دچار عفونت بودند سابقه‌ای از مصرف منابع آب غیر شهری مانند آب چاه، تانکر و آب معدنی را ذکر نمودند و بنابراین به نظر می‌رسد عامل انتقال نوروویروس در بیماران مورد مطالعه از راههای دیگر به غیر از آب آلوده بوده است.

همان طور که اشاره شد نوروویروس دو ژنوگروه عمده بیماریزا در انسان دارد که در این تحقیق ژنوگروه غالب آن در بیماران بالای ۱۸ سال ژنوگروه I تشخیص داده شد.

این نتایج نقش نوروویروس را به عنوان یک عامل ویروسی مسؤول در موارد گاستروانتریت در افراد بزرگسال خصوصاً در فصول سرد آشکار می‌کند.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خصوصاً سرکار خانم سیده مینا سیدی به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای این طرح تشکر و قدردانی نمایند.

بررسی دیگری که در این مطالعه صورت گرفت ارتباط بین توزیع جغرافیایی و عفونت نوروویروسی است. بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدا از نظر محل سکونت مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۳). همان طور که در بالا آمده است ۲ نمونه مثبت (۶۶/۶٪) از ۳ نمونه مدفوعی مثبت نوروویروس از جنوب تهران بود که این آمار اهمیت شیوع نوروویروس در محیط‌های شلوغ با سطح پائین‌تر زندگی را آشکار می‌کند و زمینه را برای بررسی بیشتر شیوع نوروویروس در این ناحیه هموار می‌سازد.

همانگونه که در بالا نیز آمده است گاستروانتریت نوروویروسی یک بیماری خود محدود شونده با مدت زمان کوتاه دوره بیماری است و اغلب بیماران خصوصاً بزرگسالان بدون درمان خاصی بهبود می‌یابند و در نهایت بیماران نیاز به بستری شدن ندارند. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز هیچ کدام از بیمارانی که گاستروانتریت با عامل نوروویروسی داشتند به صورت بلند مدت در بیمارستان بستری نشده بودند که این نتایج کاملاً با مطالعات قبلی که در سایر کشورها انجام شده مطابقت دارد (۳۲ و ۲۷).

با در نظر گرفتن این موضوع که آب آشامیدنی آلوده یکی از موارد انتقال این بیماری است، احتمال انتقال عفونت نوروویروسی از راه آب آشامیدنی مورد

References

1. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 565-72.
2. Liu C, Grillner L, Jonsson K, Linde A, Shen K, Lindell AT, and et al. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. *J Clin Virol* 2006; 35: 69-72.
3. Tzee-Chung Wu, Hsiao-Hui Liu, Yann-Jang Chen, Ren-Bin Tang, Be-Tau Hwang, Han-Chih Yuan. Comparison of clinical features of childhood norovirus and rotavirus gastroenteritis in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2008; 11: 566-570.
4. G BASU, J ROSSOUW, TK SEBUNYA, BA GASHE, M DE BEER, JB. DEWAR, and et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in gaborone, Botswana. *East African Medical Journal* 2003; 12: 652-655.

5. Infectious disease epidemiology section office of public health, Louisiana Dept of Health & Hospitals. *Norovirus Infections* 2009; 800; 256-2748.
6. Mead PS, L Slutsker, V Dietz, LF McCaig, JS Bresee, C Shapiro, PM and et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 607-625.
7. Johan Nordgren. *Norovirus epidemiology: prevalence, transmission, and determinants of disease susceptibility*. Linkoping Medical Dissertations 2009; 1111: 0345-0082.
8. K Katayama, GS Hansman, T Oka, S. Ogawa, and N. Takeda. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 2006; 151: 1291-1308.
9. Preeti Chhabra, Shobha D Chitambar. *Norovirus genotype IIb associated acute gastroenteritis in India*. *Journal of Clinical Virology* 2008; 42: 429-432.
10. Alice C Thornton, Karen S, Jennings-Conklin, Malkanthie I, McCormick. *Noroviruses: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis Disaster Manage Response* 2004; 2: 4-9.
11. Keith R Schneider, Renée Goodrich Schneider, Mike Hubbard, and Riya Shukla. *Preventing foodborne illness: Norovirus*. *FSHN* 2005; 0518: 01-03.
12. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, and et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1548-1557.
13. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, and et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1548-1557.
14. Gallimore CI, Cheesbrough JS, Lamden K, Bingham C, Gray JJ. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. *Int J Food Microbiol* 2005; 103: 323-330.
15. Yuen LKW, Catton MG, Cox BJ, Wright PJ, Marshall JA. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2690-2694.
16. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK, Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2529-2534.
17. Jan Vinjé, Raditijo A Hamidjaja, Mark D Sobsey. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods* 2004; 116: 109-117.
18. Witlox KJ, Nguyen TN, Bruggink LD, Catton MG, Marshall JA. A comparative evaluation of the sensitivity of two automated and two manual nucleic acid extraction methods for the detection of norovirus by RT-PCR. *J Virol Methods* 2008; 150: 70-72.
19. Claudia Colomba, Laura Saporito, Giovanni M Giammanco, Simona De Grazia, Stefania Ramirez, Serenella Arista and et al. *Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy*. *Emerg Infect Dis* 2007; 9: 1389-1391.
20. Tung Gia Phan, Michio Okame, Tuan Anh Nguyen, Niwat Maneekarn, Osamu Nishio, Shoko Okitsu and et al. *Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children With diarrhea*. *J Med Virol* 2004; 73: 256-261.
21. Preeti Chhabra, Shobha D Chitambar. *Norovirus genotype IIb associated acute gastroenteritis in India*. *J Clin Virol* 2008; 42: 429-432.
22. T Nakagomi, JB. Correia, O Nakagomi, FMU Montenegro, LE Cuevas, NA Cunliffe and et al. *Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis*. *Arch Virol* 2008; 153: 957-960.
23. R Fretz, L Herrmann, A Christen, P Svoboda, O Dubuis, EH Viollier and et al. *Frequency of norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 214-216.
24. Tzee-Chung Wu, Hsioa-Hui Liu, Yann-Jang Chen, Ren-Bin Tang, Be-Tau Hwang, Han-Chih Yuan. *Comparison of clinical features of childhood norovirus and rotavirus gastroenteritis in Taiwan*. *J Chin Med Assoc* 2008; 11: 566-570.

25. Filemon Bucardo, Johan Nordgren, Beatrice Carlsson, Margarita Paniagua, Per-Eric Lindgren, Felix Espinoza and et al. Pediatric norovirus diarrhea in nicaragua. *J Clin Microbiol* 2008; 8: 2573-2580.
26. Raphael Dolin. Noroviruses-Challenges to control. *N ENGL J MED*. 2007; 11: 1072-1073.
27. Caroline C Soares, Norma Santos, Rachel Suzanne Beard, Maria Carolina M Albuquerque, Adriana G Maranhao, Ludmila N Rocha and et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007; 8: 1244-1246.
28. 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.
29. Fruhwirth M, Karmaus W, Moll-Schuler I, Brosi 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: 393-7.
30. Chiu TF, Lee CN, Lee PI, Kao CL, Lin HC, Lu CY, and et al. Rotavirus gastroenteritis in children: 5-year experience in a medical center. *J Microbiol Immunol Infect* 2000; 33: 181-6.
31. Medici MC, Martinelli M, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Dodi I, and et al. Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. *Acta Biomed* 2004; 75:100-6.
32. Beatrix Kele, Marianna Papp Abrok, Judith Deak. Sporadic norovirus infections among hospitalized and non-hospitalized 0-3-year-old infants. *Scandinavian J Infect Dis* 2009; 1: 67-69.