

上海地区 2009 至 2011 年儿童诺如病毒 腹泻病的监测研究

姚玮蕾 蔡洁皓 王相诗 葛艳玲 朱启榕 曾玫

【摘要】 目的 监测 2009 至 2011 年上海地区儿童诺如病毒腹泻的流行病学及流行株的基因型特征。**方法** 2009 年 1 月至 2011 年 12 月我们连续采集 2 288 份门诊急性腹泻患儿的粪便标本,采用实时荧光 RT-PCR 检测诺如病毒 G I 和 G II 基因组,对部分 G II 基因组阳性标本经 RT-PCR 扩增诺如病毒部分衣壳蛋白 (VP1) 和多聚酶蛋白 (RdRp) 序列,对核苷酸序列进行基因分型。**结果** 在 2 288 份门诊急性腹泻患儿的粪便标本中,531 份 (23.2%) 标本系诺如病毒阳性,G I 和 G II 基因组阳性标本分别有 4 份 (0.75%) 和 527 份 (99.25%)。诺如病毒每月检出率 7.7% ~ 47.3%, 每年 7 至 10 月份检出率高于年平均检出率。4 岁以下儿童累积病例数占 95.2%, 4 岁以下腹泻患儿的诺如病毒检出率明显高于 ≥4 岁儿童 (24.4% vs. 10.7%, $\chi^2 = 10.66, P < 0.05$)。239 株诺如病毒的 VP1 分型包括 7 种基因型,依次为:154 株 (64.4%) 为 G II. 4 [9 株为 2009 (New Orleans), 145 株为 2006b 变异株], 66 株 (27.6%) 为 G II. 3, 7 株 (2.9%) 为 G II. 2, 6 株 (2.5%) 为 G II. 6, 4 株 (1.7%) 为 G II. 12, G II. 7 和 G II. 14 各 1 株 (0.4%)。244 株 RdRp 分型包括 7 种基因型,依次为:189 株 (77.5%) 为 G II. 4 [14 株为 2009 (New Orleans) 变异株, 175 株为 2006b 变异株], 47 株 (19.3%) 为 G II. 12, G II. 16, G II. b 和 G II. g 各 2 株 (0.8%), G II. 2 和 G II. 6 各 1 株 (0.4%)。G II. 4-2010 变异株自 2010 年 6 月被首次检测到,随后散发流行。198 株诺如病毒的 VP1 和 RdRp 同时测序分型, 56 株 (28.3%) 存在不同的 RdRp/VP1 基因型组合,以 G II. 12/G II. 3 (69.6%) 和 G II. 4/G II. 3 (8.9%) 常见。**结论** 诺如病毒是上海地区儿童腹泻常见的病原,诺如病毒腹泻全年流行。上海地区诺如病毒流行株具有多种基因型,存在不同基因型间重组株。G II. 4-2006b 型变异株仍然为优势流行株,并未被新的变异株 G II. 4-2009 (New Orleans) 所取代。

【关键词】 腹泻; 儿童; 基因型; 诺如病毒

Surveillance of norovirus-associated diarrhea in children in Shanghai, 2009 – 2011 Yao Weilei, Cai Jiehao, Wang Xiangshi, Ge Yanling, Zhu Qirong, Zeng Mei. Department of Infectious Diseases, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China
Corresponding author: Zeng Mei (Email: zengmeigao@aliyun.com)

【Abstract】 Objective To monitor the epidemiology of norovirus infection in diarrheal children in Shanghai between 2009 and 2011 and characterize the genotypes of norovirus strains. **Method** The stool samples were collected from children visiting outpatient clinic for acute non-dysenteric diarrhea between 2009 and 2011. One step real-time RT-PCR was used for screening norovirus genogroups G I and G II. The genotypes of norovirus genogroup G II were classified based on the nucleotide sequences of both partial capsid and polymerase fragments. **Result** A total of 2 288 outpatient children with acute diarrhea were included in this study, out of whom, 531 (23.1%) were positive for norovirus in the fecal specimens based on real-time RT-PCR test. Norovirus was prevalent throughout the year and an increased activity of norovirus infection was usually observed between July and October. Children < 4 years of age accounted for 95.2% of norovirus-infected cases, and the detection rate of norovirus was significantly higher in diarrheal children < 4 years than in those ≥ 4 years (24.4% vs. 10.7%, $\chi^2 = 10.66, P < 0.05$). Of 531 norovirus-positive specimens, 4 (1.7%) were positive for genogroup G I and 527 (98.3%) positive for genogroup G II. Seven distinct capsid genotypes were identified in 234 norovirus strains, including 153 (64.4%) G II. 4 (9 belonging to

DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.05.005

基金项目:益普生腹泻基金(IDF-2010-03)

作者单位:201102 上海,复旦大学附属儿科医院感染传染科

通信作者:曾玫 (Email: zengmeigao@aliyun.com)

2010 variants and 145 belonging to 2006b variants), 66 (27.6%) G II. 3, 7 (2.9%) G II. 2, 6 (2.5%) G II. 6, 4 (1.7%) G II. 12, 1 (0.4%) G II. 7 and G II. 14 in each. Seven polymerase genotypes were identified in 244 norovirus strains, including 189 (77.5%) G II. 4 (14 belonging to 2010 variants and 175 belonging to 2006b variants), 47 (19.3%) G II. 12, 2 (0.8%) G II. 16, G II. b and G II. g in each, 1 (0.4%) G II. 2 and G II. 6 in each. A new G II. 4-2010 (New Orleans) variant was first detected in June 2010 and sporadically circulated afterwards. Of 198 norovirus strains in which both polymerase and capsid genotypes were determined, 56 showed discordant results, indicating potential norovirus recombinants. The common discordant combinations of the polymerase and capsid genotypes were G II. 12/G II. 3 (69.6%) and G II. 4/G II. 3 (8.9%). **Conclusion** Norovirus is a common causative agent responsible for diarrhea in Shanghai children over the three years and norovirus-associated diarrhea was epidemic year round with high activity in late summer and autumn in Shanghai. Infants and young children are susceptible to norovirus infection. The circulating norovirus showed genetic diversity. The G II. 4-2006b variant continued to predominate in Shanghai during the period of 2009 - 2011 despite the emergence of the novel G II. 4-2010 (New Orleans) variant.

【Key words】 Diarrhea; Child; Genotypes; Norovirus

人类诺如病毒(norovirus, NoV)是第一个被发现的引起人类急性胃肠炎的病毒病原,1972年Kapikian等^[1]首次报道用免疫电镜发现具有小圆结构形态特征的NoV原型株-诺瓦克病毒。NoV为单股正链RNA病毒,基因组由3个开放的读码框(openreading frames, ORFs)组成,ORF1编码非结构蛋白包括核苷酸三磷酸酶、蛋白酶和RNA依赖的RNA多聚酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), ORF2编码主要结构衣壳蛋白(capsid protein, VP1), ORF3编码次要结构VP2。基于VP1氨基酸序列的差异, NoV可被分为6个基因组(G I ~ VI)^[2-3], G I、G II和G IV可感染人。目前有14种G I和29种G II RdRp基因型,8种G I和23种G II VP1基因型^[4]。自20世纪90年代,全球62%~80%的NoV暴发系G II. 4变异株引起,变异株通常每2~3年出现1次,包括1996年US 1995/96株、2002年Farmington Hills株、2004年Hunter株和2007至2008年2006b株,以及最近出现的2009年New Orleans株和2012年Sydney株^[5-7]。NoV不断在人群持续流行主要与G II. 4基因型优势流行并不断发生变异有关^[8-9]。持续监测各地区易感人群NoV的流行病学将有助于制定合理的防控策略,为疫苗设计和研制提供必要的科学依据。我们对上海地区2009至2011年儿童NoV腹泻的流行趋势和NoV流行株的基因型做报道。

对象与方法

一、研究对象

2009年1月至2011年12月连续3年在我院门诊因急性腹泻就诊患儿。急性腹泻定义标准:(1)大便性状较平时改变,呈水样或稀糊状,次数较平时增多,伴或不伴呕吐和发热,或24 h内解稀便≥

3次,伴或不伴呕吐和发热;(2)病程不超过14 d。门诊患儿入选需符合以下标准:(1)因为急性腹泻就诊;(2)腹泻呈水样或者糊状,肉眼无黏冻和(或)血丝;(3)必须送标本常规做大便镜检:白细胞<5个/高倍视野,并且无巨噬细胞和红细胞。每周有2次采样日,分别采集5~10份不同患儿的标本。

二、方法

1. 标本采集和核酸抽提:采集入选患儿粪便置1.5 ml 无菌 eppendorf 小管, -20 °C 冰箱, 每月进行1次病毒核酸RNA抽提。粪使用无菌生理盐水稀释成20%悬液,离心后取粪便上清液200 μl,采用TIANGEN公司的TIANamp@Virus DNA/RNA Kit试剂盒进行抽提病毒核酸,核酸使用50 μl 无RNA酶的水溶解,具体方法按照说明书进行操作。每一批标本抽提时设一份无菌水作为阴性对照来监测抽提过程可能的污染。

2. NoV G I型和G II型的检测:采用实时荧光RT-PCR方法检测NoV^[10]。扩增NoV G I基因组的引物为Cog1F flap/Cog1R flap,探针为Ring1a和Ring1b,扩增G II基因组的引物为Cog 2F flap/Cog 2R flap,探针为Ring 2。引物由上海生物工程技术有限公司合成。实时荧光RT-PCR采用Bio-Rad公司的iCycler iQTM 荧光实时多波长PCR检测仪,试剂盒采用Invitrogen生产的SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative Kit一步法定量试剂盒,实验用无RNA酶96孔PCR板及透明贴膜购于美国Axygen公司。实验条件按说明书进行:5 μl RNA模板加入20 μl PCR反应液,50 °C 逆转录15 min,95 °C 变性2 min,接着进行40次PCR循环,每一次循环95 °C 15 s,60 °C 30 s,实验结果判断:扩增循环阈值(Cycle threshold, CT) < 40 被判断为阳性。每一批PCR实验设阴性对照(水)和阳性对照

(经测序证实 G I 和 G II 型的核酸样本), 阴性对照检测结果阴性且阳性对照株检测阳性被视为实验有效。

3. PCR 扩增 G II 基因型 NoV 和测序: 对实时荧光 RT-PCR 扩增中 CT 值 < 30 的阳性标本进一步做 RT-PCR 扩增, PCR 产物 cDNA 用于测序分型。随机六聚体引物用于逆转录反应, 逆转录酶采用 Invitrogen 公司 SuperScript™ III RT。引物对 JV12/JV13 用于扩增 NoV 的多聚酶区, 扩增片段为 327 bp^[11]。扩增 NoV ORF1-ORF2 结合区的正链引物为 3 条兼并引物, 扩增 GII 基因组的引物为 Kageyama 等设计的 G2FF/G2SKR^[12]。为了使 PCR 产物直接用于测序且提高测序结果质量, 对 5' 引物做了修饰, 增加了 20 个碱基, 正链引物增加上游超级引物 (forward super primer, FSP) 20 个碱基 (CAGGCCACG TTTTGTTCATGCG), 负链引物增加下游超级引物 (reverse super primer, RSP) 20 个碱基 (TTCTTTGCGT TATGTCTCTG), 改良后引物扩增的 cDNA 片段长度为 508 bp^[13]。引物由上海生物工程技术有限公司合成, PCR 产物送上海桑尼生物有限公司进行测序, 测序引物为 FSP/RSP, 双向测序。

4. NoV G II 基因组分型和种系进化分析: 通过 NoroNet 分型工具 (www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool), 分别对 NoV 的 RdRp (327 bp) 和 VP1 的 N/S 区的核苷酸序列 (282 bp) 进行基因型分型。从 GenBank 下载所有 G II 基因型和 G II. 4 变异株的代表株序列, 用于构建进化树。所有序列用 Clustal X 进行比对, 用 MRGA4.0 软件进行序列拼接比对及进化树分析, 建进化树用邻接法 (Neighbor-Joining), 自引导 (bootstrap) 检验重复 1 000 次。我们将 22 株 NoV 的核苷酸序列递交至 GenBank, 获取序列号, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 率的比较采用卡方检验。

结 果

一、NoV 的检出率及季节分布

共收集 2 288 例符合入选标准患儿的粪便标本各 1 份。2 227 例患儿有明确的年龄和性别信息, 男 1 363 例 (61.2%), 女 864 例 (38.8%), 年龄 1 ~ 192 个月, 中位数为 12 个月。

在 2 288 份腹泻患儿的粪便标本中, NoV 阳性的标本有 531 份, 检出率为 23.2%。531 株 NoV 包括 4 株 (0.8%) G I 基因组和 527 株 (98.2%) G II 基因组。如图 1 所示, NoV 全年检出, 每月检出率在

7.7% ~ 47.3%。2009 年全年 NoV 检出率 19.0% (171/899), 其中 7 至 9 月检出率在 24.6% (8 月) ~ 39.3% (7 月); 2010 年全年 NoV 检出率 24.1% (183/760), 其中 7 至 10 月检出率在 27.8% (10 月) ~ 43.7% (8 月); 2011 年全年 NoV 检出率 28.1% (177/629), 其中 3 至 5 月、9 至 10 月检出率在 27.1% (3 月) ~ 47.3% (8 月)。总体看来, 7 至 10 月 NoV 检出率相对较高, 在上海地区呈现较强的流行趋势。

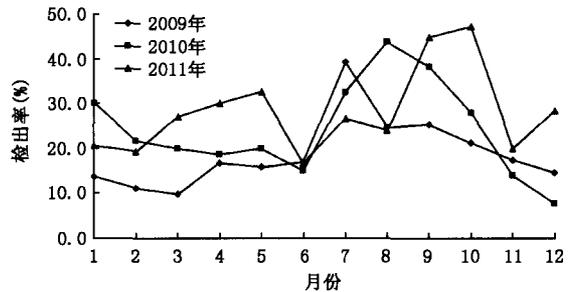


图 1 2009 至 2011 年上海地区儿童诺如病毒腹泻的流行季节分布趋势

二、NoV 腹泻患儿的年龄和性别特征

531 例 NoV 阳性患儿中, 520 例有明确的性别和年龄信息, 男 343 例 (66.0%), 女 177 例 (34.0%); 年龄 1 ~ 132 个月 (11 岁), 中位数为 12 个月。NoV 在不同年龄组儿童中检出率及构成比见表 1。4 岁以下婴幼儿发生 NoV 腹泻最常见, 累积病例数占 95.2%, 4 岁以下儿童的 NoV 检出率明显高于 ≥ 4 岁儿童 (24.4% vs. 10.7%, $\chi^2 = 10.66, P < 0.05$)。

表 1 不同年龄组腹泻患儿粪便标本中诺如病毒阳性检出率及病例构成比

年龄组段 (岁)	例数	诺如病毒阳性数 (例)	诺如病毒检出率 (%)	诺如病毒阳性病例累计构成比 (%)
<1	622	130	20.9	25.0
~1.9	937	253	27.0	73.6
~2.9	296	80	27.0	89.0
~3.9	139	32	23.0	95.2
~4.9	56	6	10.7	96.3
≥5	177	19	10.7	100.0

三、NoV G II 基因型分布

239 株 NoV VP1 扩增测序成功, 共有 7 种基因型, 依次为: 154 株 (64.4%) G II. 4 [145 株为 2006b 变异株, 9 株为 2009 (New Orleans) 变异株, 分布在 2010 年 6 月 (1 株) 和 7 月 (1 株), 2011 年 1 月

(1 株)、4 月(5 株)和 8 月(1 株)。2009 年 52 株为 2006b, 2010 年 65 株为 2006b, 2 株为 2009 (New Orleans), 2011 年 28 株为 2006b, 7 株为 2009 (New Orleans)], 66 株 (27.6%) G II. 3, 6 份 (2.5%) G II. 6, 4 株 (1.7%) G II. 12, 7 株 (2.9%) G II. 2, 1 株 (0.4%) 分别为 G II. 7 和 G II. 14。244 株 RdRp 扩增测序成功, 共有 7 种基因型, 依次为: 189 株 (77.5%) G II. 4 [175 株为 2006b 变异株; 14 株为 2010 变异株, 分布在 2010 年 7 月(1 株)和 8 月(1 株), 2011 年 1 月(1 株)、2 月(1 株)、3 月(1 株)、4 月(3 株)、5 月(1 株)、8 月(4 株)和 9 月(1 株)。2009 年 53 株为 2006b, 2010 年 87 株为 2006b, 2 株为 2009 (New Orleans), 2011 年 35 株为 2006b, 12 株为 2009 (New Orleans)], 47 株 (19.26%) G II. 12, 2 株 (0.82%) 分别为 G II. 16、G II. P21 (G II. b) 和 G II. Pg, 1 株 (0.4%) 分别为 G II. 2 和 G II. 6。

198 株 NoV 的 VP1 和 RdRp 区序列同时测序分型成功, 共有 14 种不同的基因型组合。142 株 (71.7%) VP1/RdRp 区的基因型一致, 包括 4 种相同的 VP1/RdRp 基因型组合: 139 株 (70.2%) 为 G II. 4/G II. 4, 1 株 (0.5%) 分别为 G II. 2/G II. 2、G II. 6/G II. 6 和 G II. 12/G II. 12。56 株 (28.3%) VP1/RdRp 的基因型不同, 提示可能存在不同基因型间重组, 包括 10 种不同的 VP1/RdRp 基因型组合: 39 株 (19.7%) 为 G II. 12/G II. 3, 5 株 (2.5%) 为 G II. 4/G II. 3, 2 株 (1%) 分别为 G II. 4/G II. 2、G II. 12/G II. 4、G II. b/G II. 3 和 G II. g/G II. 12, 1 株 (0.5%) 分别为 G II. 4/G II. 6、G II. 4/G II. 7、G II. 7/G II. 6 和 G II. 16/G II. 2。

讨 论

连续 3 年的监测结果显示, NoV 与 23.2% 上海地区儿童非痢疾样腹泻有关, 且 2009 至 2011 年上海地区儿童 NoV 相关性腹泻有逐年增强的流行趋势, 说明 NoV 是引起上海地区儿童腹泻常见而重要的致病原。上海地区 NoV 在夏末和秋季更为流行, 有别于欧美和日本等发达国家 NoV 在冬春季流行的特征^[14-17]。由于 NoV 是食源性疾病的主要病原, 因此, 我们推测不同地区 NoV 的季节流行特征与不同人群的饮食结构和习惯可能有关。掌握 NoV 的季节流行特征有助于制定合理的防控策略, 及时预警暴发。

本组数据显示, NoV 腹泻以 2 岁以下婴幼儿占

多数, 这与我们以往的研究结果一致^[10]。日本连续 6 年的监测研究显示 2 岁以下儿童是 NoV 腹泻主要发病人群^[18]。观察性研究提示小年龄儿童是人群 NoV 感染重要的传播者, 接触症状性 NoV 感染的儿童是儿童和成人获得 NoV 感染的危险因素^[19]。英国 1 项研究社区人群的研究显示 NoV 在社区 5 岁以下儿童发病率最高达 21.4%^[20], 本组 NoV 在 4 岁以下腹泻患儿中检出率最高, 与前者有相似之处。因此, 应重视婴幼儿 NoV 的防治, 以有效干预 NoV 病毒在社区人群中广泛的传播和流行。

NoV G II 依然是上海地区儿童中绝对优势的流行株, 与国内和全球的研究报告一致^[10, 21]。测序结果发现分别有 7 种不同的 RdRp 基因型和 VP1 基因型, 其中 G II. 4 占 64.4% (VP1) ~ 77.5% (RdRp)。G II. 4 也是全球儿童 NoV 流行株最常见的基因型^[21]。其次, 上海地区常见的流行株包括 G II. 12 RdRp 基因型 (19.3%) 和 G II. 3 VP1 基因型 (27.6%)。然而, 全球儿童 NoV 流行株第 2 位常见的基因型为 G II. b RdRp 基因型, 另外, 在欧洲 G II. Pe、G II. Pg 和 G II. P7 基因型也较常见^[17, 21]。由此可见, 各地区 NoV 常见的基因型分布有差异, 监测各地区 NoV 优势基因型可为疫苗研制提供必要的依据。2009 至 2011 年期间上海地区仍以 G II. 4 变异株 2006b 占绝大多数, 值得关注的是, 2010 年 6 月上海地区儿童中检测到新型 G II. 4 变异株 2009 (New Orleans), 但是该变异株并未在 2010 年下半年至 2011 年取代 2006b 而成为优势流行株, 尽管 2011 年变异株检出数较多, 但是仍明显低于优势流行株 G II. 4-2006b。G II. 4-2009 (New Orleans) 于 2009 年 10 月在美国首次检测到, 此后相继在北美、欧洲、亚洲等国家流行, 自 2009 年底至 2011 年, 该变异株已取代 2006b 而成为全球优势流行株, 但是 G II. 4-2009 (New Orleans) 变异株并未在北美引起当季 NoV 暴发活动度的增加^[22-27]。我国广州地区在 2010 年 11 月至 2011 年 1 月也检测到 G II. 4-2010 (New Orleans) 变异株^[28]。病毒全基因序列分析显示, G II. 4-2009 (New Orleans) 变异株的 ORF1 基因来自父辈株 G II. 4-2006a, ORF2/3 基因来自父辈株 G II. 4-2008 (Apeldoorn), 通过基因型内重组而成^[7]。我们推测 G II. 4-2009 (New Orleans) 变异株未在上海地区成为优势流行株与本地区以往未出现父辈株 G II. 4-2006a 和 G II. 4-2008 (Apeldoorn) 的流行有关。

本组中, 28% G II 基因组 NoV 株多聚酶和 VP1

基因亚型不同,提示存在不同基因亚型的 NoV 发生 ORF1/ORF2 基因重组。在 10 种不同的 RdRp/VP1 区基因型组合中,最常见为 G II. 12/G II. 3,其次为 G II. 4/G II. 3。NoV 基因型间重组在分子流行病学中经常被发现^[29]。RNA 病毒基因重组是其进化的动力机制之一,病毒重组可使病毒毒力增加,对病毒的种系进化和基因分析产生影响,使疫苗研制更为复杂化。通常 NoV 重组株被定义为其 2 个不同的结构区(通常指 RdRp 和 VP1)分属于不同的基因亚型,重组位点通常位于或邻近 ORF1/2 重叠区,全球至少有 20 多种 G II 基因型 NoV 重组株^[29]。近年来随着对更多 NoV 株全基因序列的分析,提示 NoV 可发生 ORF1 和 ORF2 基因型内重组,并导致新型 G II. 4 变异株的出现^[7]。比如 2009 年全球出现的 G II. 4 变异株 G II. 4-2009 (New Orleans) 和 2012 年全球出现的 G II. 4-2012 (Sydney) 变异株,后者 ORF1 源自父辈株 Osaka-2007, ORF2/3 与 Apeldoorn-2008 和 New Orleans-2009 有关,而且导致全球 2012 年末 NoV 流行活动度上升^[7,30]。持续监测 NoV 重组株的类型及其对暴发流行造成的影响对于了解 NoV 在人群中进化机制是必要的。

本研究通过近 3 年连续的监测资料明确 NoV 感染在上海地区腹泻患儿中呈常态流行的规律,多种 G II 基因型在本地区流行,G II. 4 仍是优势流行的基因型,虽然新型 G II. 4-2009 (New Orleans) 变异株在 2010 年 6 月在本地儿童中出现,但并未成为优势株,而且不同基因型间重组株在儿童中流行。不仅人群的免疫压力可以导致 G II. 4 抗原漂移出现新的变异株流行,而且 NoV 基因型间和基因型内重组也可能影响病毒的抗原性,导致新的流行株出现。因此连续监测各地区 NoV 流行病学,有助于了解新型 G II. 4 变异株出现的机制和来源,而且为疫苗的研制和使用提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis [J]. *J Virol*, 1972, 10: 1075-1081.
- [2] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature [J]. *Virology*, 2006, 346:312-323.
- [3] Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, et al. 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 980-982.
- [4] Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses [J]. *J Clin Virol*, 2011, 51:121-125.
- [5] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, et al. Norovirus illness is a global problem; emergence and spread of norovirus G II. 4 variants, 2001-2007 [J]. *J Infect Dis*, 2009, 200:802-812.
- [6] Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, et al. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the G II. 4 lineage [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6:e1000831.
- [7] Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, et al. Recombination within the pandemic norovirus G II. 4 lineage [J]. *J Virol*, 2013, 87: 6270-6282.
- [8] Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, et al. Mechanisms of G II. 4 norovirus persistence in human populations [J]. *PLoS Med*, 2008, 5:e31.
- [9] Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8:231-241.
- [10] Zeng M, Xu X, Zhu C, et al. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in childhood diarrhea in China [J]. *J Med Virol*, 2012, 84:145-151.
- [11] Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands [J]. *J Infect Dis*, 1996, 174:610-615.
- [12] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:1548-1557.
- [13] Zeng M, Gong Z, Zhang Y, et al. Prevalence and genetic diversity of norovirus in outpatient children with acute diarrhea in Shanghai, China [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2011, 64:417-422.
- [14] Lopman B, Armstrong B, Atchison C, et al. Host, weather and virological factors drive norovirus epidemiology: time-series analysis of laboratory surveillance data in England and Wales [J]. *PLoS One*, 2009, 4:e6671.
- [15] Dey SK, Phathamavong O, Okitsu S, et al. Seasonal pattern and genotype distribution of norovirus infection in Japan [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29:e32-34.
- [16] Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, et al. Norovirus disease in the United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19:1198-1205.
- [17] Janko van Beek, Kroneman A, Vennema H, et al. Noronet report, April 2013 [EB/OL]. (2013-04-25) [2013-09-25]. http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Common_and_Present/Publications/Centre_for_Infectious_Disease_Control/NoroNet_update_april_2013.
- [18] Okame M, Akihara S, Hansman G, et al. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan [J]. *J Med Virol*, 2006, 78: 1318-1324.
- [19] de Wit MAS, Koopmans MP, Kortbeek LM, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands; incidence and etiology [J]. *Am J Epidemiol*, 2001, 154:666-674.
- [20] Phillips G, Tam CC, Conti S, et al. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis [J]. *Am J Epidemiol*, 2010, 171:1014-1022.
- [21] Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children; global distribution of genogroups, genotypes and G II. 4 variants [J]. *J Clin Virol*, 2013, 56: 185-193.
- [22] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, et al. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17:1389-1395.
- [23] Hasing ME, Lee BE, Preiksaitis JK, et al. Emergence of a new norovirus GII. 4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from

2008 to 2013 [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51:2204-2211.

[24] Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, et al. Novel norovirus recombinants and of G II.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium [J]. Virol J, 2011, 8:310.

[25] Tra My PV, Lam HM, Thompson CN, et al. The dynamics of G II.4 Norovirus in Ho Chi Minh City, Vietnam [J]. Infect Genet Evol, 2013, 18:335-343.

[26] Lim KL, Eden JS, Oon LL, et al. Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004-2011 [J]. J Med Virol, 2013, 85: 1842-1851.

[27] Yen C, Wikswo ME, Lopman BA, et al. Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States [J]. Clin Infect Dis, 2011, 53:568-571.

[28] Xue L, Wu Q, Dong R, et al. Genetic analysis of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis during winter in Guangzhou, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10: 888-895.

[29] Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination [J]. J Gen Virol, 2007, 88:3347-3359.

[30] van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012 [J]. Euro Surveill, 2013, 18:8-9.

(收稿日期:2013-11-02)

(本文编辑:付晓霞)

· 作者须知 ·

关于中华医学会系列杂志投稿网址的声明

为维护广大读者和作者的权益以及中华医学会系列杂志的声誉,防止非法网站假冒我方网站诱导作者投稿、并通过骗取相关费用非法获利,现将中华医学会系列杂志稿件管理系统网址公布如下,请广大作者加以甄别。

1. “稿件远程管理系统”网址

中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)首页的“业务中心”栏目、中华医学会杂志社网站(<http://www.medline.org.cn>)首页的“稿件远程管理系统”以及各中华医学会系列杂志官方网站接受投稿。作者可随时查阅到稿件处理情况。

2. 编辑部信息获取

登录中华医学会杂志社网站(<http://www.medline.org.cn>)首页,在《中华医学会系列杂志一览表》中可查阅系列杂志名称、编辑部地址、联系电话等信息。

3. 费用支付

中华医学会系列杂志视杂志具体情况,按照有关规定,酌情收取稿件处理费和版面费。稿件处理费作者在投稿时支付;版面费为该稿件通过专家审稿并决定刊用后才收取。

欢迎投稿,并与编辑部联系。

特此声明。

《中华儿科杂志》参考文献著录格式要求

《中华儿科杂志》参考文献著录格式,基本参照此行 GB/T7714-2005《文后参考文献著录规则》,采用顺序编码制著录,依照文献在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。将参考文献按引用先后顺序(用阿拉伯数字标出)全部排列于文末。参考文献中的作者,1~3名全部列出,3名以上只列前3名,后加“等”或其他与之相应的文字,如“et al.”。著录作者姓名时将姓放在前,名缩写放在姓后面。外文期刊名称用缩写,以《Index Medicus》中的格式为准;中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页码。文献题各项后需标注文献类型标志项目。作者必须将参考文献与其原文核对无误。举例如下:

[1] 周爱卿,王荣发,黄美容,等. 先天性主动脉缩窄球囊扩张术后疗效的探讨[J]. 中华儿科杂志, 1995, 33:72-74. (期刊格式)

[2] You CH, Lee KY, Chey WY, et al. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting [J]. Gastroenterology, 1980, 79:311-315. (期刊格式)

[3] 汪敏刚. 支气管哮喘[A]//戴自英. 实用内科学. 8版. 北京:人民卫生出版社, 1991:833-840. (书籍中析出文献格式)

[4] Sodeman WA Jr, Sodeman WA. Pathologic physiology: mechanisms of disease [M]. 8th ed. Philadelphia: Saunders, 1974:457-472. (书籍格式)