مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره اول ـ بهار ۹۰
صفحات ۳۷ الی ٤٤

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی فراوانی پاراکوویروس انسانی نوع یک در نمونه‌های کلینیکی کودکان مبتلا به گاستروآنتریت با روش RT-PCR

فریده قاضی[۱]، زهره عطائی[۲]، بهاره دبیرمنش[۳]، مرتضی تقی‌زاده[٤]

[۱]دانشیار زیست‌شناسی مولکولی، دانشکد پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۲]کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، دانشکد پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۳]دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۴]دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، دانشکد پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: پاراکوویروس انسانی نوع یک (HPeV-1) دارای ژنوم RNA تک‌رشته با قطبیت مثبت بوده و در خانواده پیکورناویروس‌ها قرار دارد. این ویروس عامل ایجاد گاستروآنتریت، عفونت‌های تنفسی و به‌ندرت سندرم‌های سیستم عصبی است. از آنجایی که تشخیص بین اسهال‌های پاراکوویروسی و باکتریایی از نظر ممانعت از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها حایز اهمیت است. لذا این پروژه با هدف تعیین فراوانی پاراکوویروس انسانی نوع یک در نمونه‌های کلینیکی کودکان مبتلا به گاستروآنتریت با روش RT-PCR انجام شد.

روش بررسی: RNA ویروسی از نمونه‌های مدفوع ۴۷۲ کودک زیر ۴ سال مبتلا به اسهال استخراج گردید. CDNA پس از تهیه با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده از ناحیه ترجمه‌نشدنی (5'UTR)، به روش RT-Nested-PCR تکثیر گردید. اندازه محصول RT-PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪، ۲۶۵ جفت باز بود. برای مقایسه ۲ روش کشت سلولی و RT-PCR در تشخیص HPeV-1، ۲۰ نمونه از نمونه‌های مثبت در سلول (Vero) کشت داده شد که پس از یک هفته فقط ۳ نمونه دارای CPE بودند.

یافته‌ها: از ۴۷۲ نمونه دریافت‌شده در مدت ۲ سال، ۱۱۲ نمونه با تست اختصاصی RT-PCR مثبت (۲۳/۷٪) بودند. نتایج این مطالعه نشان داد بالاترین فراوانی این ویروس در فصل بهار و پاییز می‌باشد ($p<0/001$). گروه سنی ۱۲-۶ ماه به‌طور معنی‌داری ($p<0/34$) بیشترین موارد مثبت را نسبت به گروه‌های سنی دیگر داشتند. موارد مثبت نیز در پسران به‌طور معنی‌داری ($p<0/001$) نسبت به دختران بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: این ارزیابی نشان داد با استفاده از روش RT-PCR اختصاصی می‌توان پاراکوویروس‌های انسانی را مستقیماً از نمونه‌های کلینیکی با سرعت و حساسیت بالا تشخیص داد که در بررسی اپیدمیولوژی با ارزش می‌باشد، در ضمن مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و هزینه را نیز کاهش خواهد داد.

کلید واژه‌ها: گاستروآنتریت؛ اپیدمیولوژی؛ پاراکوویروس؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس؛ 5' مناطق ترجمه نشده.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکد پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛
تلفن: ۸۲۹۴۳۲۵۲-۰۲۱ آدرس پست الکترونیکی: rfrida@iums.ac.i

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۱۵

مقدمه

پاراکوویروس انسانی نوع یک (نام قبلی، اکوویروس ۲۲) بدون غشا و دارای ژنوم RNA تک رشته با قطبیت مثبت و به طول تقریباً ۷۴۰۰ نوکلئوتید است. این ویروس در تابستان سال ۱۹۵۶ در کشور ژاپن از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال جدا شد (۱) و جزء گروه آنتروویروس‌ها از خانواده پیکورناویریده گروه‌بندی گردید (۲،۱)، اما مطالعات مولکولی و بیولوژیکی نشان داد پاراکوویروس‌ها با آنتروویروس‌ها متفاوت هستند، از جمله این تفاوت‌ها، اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

سیتوپاتولوژیک غیرمعمول در کشت سلولی (اختلافات فاحش در نوکلئولوس و تغییرات نوکلئولوس و کروماتین هسته) می‌باشد (۱). پاراکوویروس‌ها سنتز پروتئین میزبان را متوقف نمی‌کنند (۲،۱)؛ درصورتی‌که سایر آنتروویروس‌ها با شکستن p220 مانع سنتز پروتئین میزبان می‌شوند. همانندسازی پاراکوویروس‌ها برخلاف آنتروویروس‌ها با ۲-α- هیدروکسی بنزیل- بنزی میدازول مهار نمی‌شود. پاراکوویروس‌ها فاقد برش پروتئین کپسیدی VP0 به ۲ پروتئین کپسیدی VP2, VP4 بوده و در نتیجه دارای ۳ پروتئین کپسیدی هستند، درحالی‌که سایر آنتروویروس‌ها ۴ پروتئین کپسیدی (VP1-VP4) دارند. کمتر از ۳۰٪ شباهت بین اسیدهای آمینه پاراکوویروس‌ها و سایر آنتروویروس‌ها وجود دارد که با PCR آنتروویروس‌ها منفی می‌شود. با توجه به این اختلافات، این ویروس‌ها جزء یکی از جنس‌های جدید خانواده پیکورناویریده به‌نام پاراکوویروس‌های انسانی شامل پاراکوویروس انسانی نوع یک (HPeV1) و پاراکوویروس انسانی نوع ۲ (HPeV2) نامگذاری شده‌اند (۴،۱). اغلب بالغین دارای آنتی‌بادی HPeV1 هستند. ۲۰٪ کودکان بعد از یک‌سالگی با این ویروس آلوده می‌شوند. ۹۰٪ نوزادان دارای آنتی‌بادی مادری علیه ویروس HPeV1 می‌باشند (۱). آلودگی با این ویروس اغلب منجر به گاستروآنتریت و با درصد کمتری سندرم‌های تنفسی و به‌ندرت سندرم‌های سیستم عصبی (انسفالیت، فلج و غیره) می‌شود (۳،۲).

روش مرسوم برای تشخیص ویروس‌ها استفاده از کشت سلولی و بعد نوترالیزاسیون با آنتی‌سرم است، ولی به‌علت رشد کند و کم پاراکوویروس‌ها در کشت سلولی (روی سلول‌های کلیه میمون Vero) و پاسخ منفی کاذب (۲) و به‌علت دسترس نبودن آنتی‌سرم پاراکوویروس‌ها مخصوصاً انواع جدید، معمولاً با تکثیر اسید نوکلئیک (PCR) مشخص می‌شوند (۱۲-۱۰). با توجه به اینکه HPeV1 بیشتر از انواع دیگر در نمونه‌های کلینیکی به‌خصوص نمونه‌های اطفال مشاهده شده، و عامل ایجاد اسهال شدید در نوزادان است که از نظر کلینیکی مهم می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف تعیین فراوانی پاراکوویروس نوع یک در نمونه‌های مدفوع اطفال مبتلا به اسهال با استفاده از روش RT-PCR انجام گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، ۴۷۲ نمونه مدفوع کودکان زیر ۴ سال با علائم اسهال آبکی از سال ۱۳۸۸-۱۳۸۶ بررسی گردید.

برای جلوگیری از آلودگی احتمالی میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها به آنزیم RNase، این وسایل از قبل در محلول ۱٪ (حجمی-حجمی) DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند، سپس اتوکلاو شدند. برای تهیه سوسپانسیون از نمونه‌های مدفوع، ابتدا محلول‌های A: PBS (pH=۷/۴)، محلول B: $MgCl_2.6H_2O$ (1g/L) و محلول C: $CaCl_2$ (1g/L) تهیه و به‌طور جداگانه به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. برای تهیه محلول کار مورد نیاز، ۱ حجم از محلول B با ۱ حجم از محلول C و ۸ حجم از محلول A مخلوط گردید. سپس ۹cc از محلول کار با ۱cc کلروفرم در لوله فالکون ۱۵cc مقاوم به کلروفرم مخلوط و حدود ۲g مدفوع به آن افزوده شد. لوله‌ها به مدت ۲۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در $4^{\circ}C$ دور ۱۵۰۰g سانتریفوژ شدند. محلول رویی حاوی ویروس و بخشی از آن (براساس دستور کار مربوطه)، برای استخراج RNA به سرعت به میکروتیوب ۱/۵cc منتقل گردید و بقیه در فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری شد. برای جداسازی RNA و ساخت cDNA، ۲۵۰µl از سوسپانسیون تهیه‌شده در بالا، به‌منظور استخراج RNA توسط کیت استخراج RNA شرکت کیاژن [IAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagene Inc)] مورد استفاده قرار گرفت. جذب نوری RNA استخراج شده با دستگاه Gene Quant اندازه‌گیری شد. متوسط غلظت RNA برای نمونه‌های مختلف، ۱۲۰µg/ml بود. از این غلظت RNA استخراجی میزان ۱۰µl برای ساخت cDNA توسط کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز (FermentascDNA Synthesis kit) استفاده گردید (۱۲).

با توجه به اینکه پاراکوویروس انسانی نوع یک RNA ویروس است، بنابراین از روش RT-PCR استفاده شد، بدین منظور در اولین مرحله، جداسازی RNA و استفاده از آن به‌عنوان الگو برای ساخت cDNA انجام گرفت. سپس مقداری از cDNA تهیه‌شده برای تکثیر به روش PCR به میکروتیوب دیگری منتقل گردید (۱۲). برای تأیید جواب PCR و اجتناب از پاسخ‌های مثبت کاذب از روش Nested PCR استفاده شد. بدین منظور ۲ جفت پرایمر براساس توالی ناحیه ترجمه‌نشدنی (5/UTR) ژنوم پاراکوویروس نوع یک انسانی موجود در بانک ژنی به شرح زیر طراحی گردید.

F1 primer: 5' ATAGTGAGATACCACGCTTG 3'
R1 primer: 5'GGGGATCCCTGGTTTCC-T-T-T
F2 primer: 5' TCACACAGCCATCCTCTAGT3'
R2 primer: 5'ACGGGTACCTTCTGGGCATC3'

www.SID.ir

Archive of SID

توالی پرایمرهای طراحی‌شده در سایت نوکلئوتید NCBI، Blast انجام شد؛ تا اطمینان حاصل شود که با انواع غیرپاراکوویروس‌ها واکنش متقاطع ندارند. جهت PCR در مرحله اول ۳µl از cDNA تهیه‌شده با ۰/۵µM پرایمر F1، ۰/۵µM پرایمر R1 و ۱۲/۵µl از مخلوط Master Mix PCR (Cinnagene) با آب دیونیزه DNase Free به حجم ۲۵µl رسانده شد. کنترل مثبت و منفی نیز در میکروتیوب‌های جداگانه تهیه و طبق برنامه زیر PCR انجام شد.

۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل با دماهای دناتوره ۹۵°C یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۹۵°C یک دقیقه، دمای سنتز ۷۲°C یک دقیقه و دمای سنتز نهایی ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه.

محصول PCR مربوط به نمونه‌ها، کنترل مثبت و کنترل منفی در کنار هم روی ژل آگارز ۱٪ و همزمان با سایز مارکر ۱Kbp (یک جفت باز) الکتروفورز شده و توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و بررسی گردید. اندازه محصول PCR به طول ۴۱۲ جفت باز می‌باشد (شکل).

برای PCR مرحله دوم ۱µl از محصول PCR مرحله اول با ۰/۵µM پرایمر F2، ۰/۵µM پرایمر R2 و ۱۲/۵µl از مخلوط Master Mix PCR (Cinnagene) با آب دیونیزه DNase Free به حجم ۲۵µl رسانده شد، سپس طبق برنامه زیر PCR انجام گردید.

۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل با دماهای دناتوره ۹۵°C یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۵۵°C یک دقیقه، دمای سنتز ۷۲°C یک دقیقه، دمای سنتز نهایی ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ و همزمان با سایز مارکر ۱Kbp الکتروفورز شده و توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و بررسی گردید. محصول PCR به طول ۲۶۵ جفت باز می‌باشد (شکل).

ضمناً برای تأیید اختصاصی بودن RT_PCR پاراکوویروس انسانی نوع یک، ۲۰ عدد از نمونه‌هایی که با پرایمرهای HPeV1 مثبت بودند مجدداً با پرایمرهای عمومی آنتروویروس‌ها RT-PCR شدند که در تمام موارد جواب منفی بود (۱۲).

از پرایمرهای عمومی آنتروویروس‌ها

ENT-F primer: 5' CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG 3'

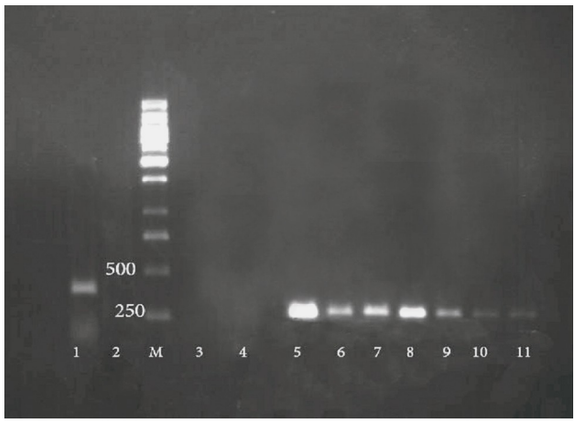
ENT-R primer: 5' ATTGTCACCATAAGCAGCCA 3'

در این مطالعه استفاده گردید.

نتایج به دست آمده به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد و به‌منظور یافتن ارتباط معنی‌دار بین داده‌ها از آزمون تی‌تست استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۴۷۲ نمونه که در طی ۲ سال از اطفال مبتلا به اسهال در فصول مختلف گرفته شده بود، بررسی گردید. از این تعداد ۱۱۲ نمونه (۲۳/۷٪) با تست RT-PCR اختصاصی مثبت بودند (جدول شماره ۲). از مجموع ۴۷۲ نمونه، تعداد ۲۸۲ نمونه از کودکان دختر (با فراوانی ۵۹/۷٪) و ۱۹۰ نمونه پسر (با فراوانی ۴۰/۳٪) بودند (جدول شماره ۱). پسران به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) موارد مثبت بیشتری نسبت به دختران داشتند (جدول شماره ۲). دامنه سنی نمونه‌های مورد بررسی، حداقل ۲ روز و حداکثر ۴ سال بود. گروه سنی ۱۲-۶ ماه به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۳۴$) بیشترین موارد مثبت را نسبت به گروه‌های سنی دیگر داشت (جدول شماره ۲). درصد موارد مثبت از نظر PCR جهت بررسی پاراکوویروس به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) در فصول بهار و پاییز بیشتر بود (جدول شماره ۲).



شکل: نتایج PCR :M: سایز مارکر 1Kbp، شماره ۱ نتیجه PCR مرحله اول (قطعه‌ای به طول ٤١٢bp)، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳ و ٤ نمونه‌های بیمار (منفی)، شماره‌های ۱۱-۵ نتیجه PCR دوم: شماره ۵ کنترل مثبت، شماره‌های ۱۱،۱۰،۹،۸،۷،٦ نمونه بیمار (مثبت)، شماره ۷ کنترل مثبت (محصول PCR دوم قطعه‌ای به طول ٢٦٥ bp می‌باشد).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱: توزیع کودکان مبتلا به اسهال براساس متغیرهای دموگرافیک

متغیر		اندازه تعداد (درصد)
سن (خطای معیار از میانگین)		۶/۴۸±۰/۳۱
جنس	پسر	۱۹۰(٪۴۰/۳)
	دختر	۲۸۲(٪۵۹/۷)
تعداد نمونه‌ها درفصول مختلف	بهار	۱۰۰(۲۱/۲)
	تابستان	۸۴(٪۱۷/۸)
	پائیز	۱۷۲(٪۳۶/۴)
	زمستان	۱۱۶(٪۲۴/۶)
تعداد نمونه‌ها در گروه‌های سنی مختلف	۶> ماه	۲۷۴(٪۵۸/۱)
	۱۲-۶ ماه	۱۴۶(٪۳۰/۹)
	۲۴-۱۲ماه	۳۸(٪۸/۱)
	۴۸-۲۴ماه	۱۴(٪۳)

جدول شماره ۲: توزیع کودکان مبتلا به اسهال پاراکوویروسی براساس متغیرهای دموگرافیک

متغیر		اندازه تعداد (درصد)
موارد مثبت از نظر PCR		۱۱۲ (٪۲۳/۷)
موارد مثبت از نظر PCR به تفکیک فصل ابتلا	بهار	۳۴ (٪۳۰/۴)
	تابستان	۱۲ (٪۱۰/۷)
	پائیز	۵۸ (٪۵۱/۸)
	زمستان	۸ (٪۷/۱)
موارد مثبت از نظر PCR به تفکیک سن	۶> ماه	۵۶ (٪۵۰)
	۱۲-۶ ماه	۴۶ (٪۴۱/۱)
	۲۴-۱۲ ماه	۹ (٪۸)
	۴۸-۲۴ ماه	۱ (٪۰/۹)
موارد مثبت از نظر PCR به تفکیک جنس	دختر	۴۵(٪۱۶)
	پسر	۶۷ (٪۳۵/۳)

بحث

علائم کلینیکی عفونت‌های پاراکوویروس‌ها شبیه آنتروویروس‌های انسانی است که در سراسر دنیا دیده می‌شود، و در کودکان عامل گاستروآنتریت، عفونت‌های تنفسی و به‌ندرت سندرم‌های سیستم عصبی مرکزی (منتژیت، انسفالیت، فلج) و سپتی‌سمی می‌باشند (۱۱). به‌طور معمول کشت سلولی، روش انتخابی برای جدا کردن ویروس‌ها است. با توجه به اینکه این نوع اسهال محدودشونده بوده و نیاز به درمان با آنتی‌بیوتیک ندارد، بنابراین تشخیص سریع ویروس‌ها برای جلوگیری از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها حایز اهمیت است. امروزه با اطلاعات کافی از توالی ژنوم، استفاده از روش‌های مولکولی از قبیل رونویسی معکوس واکنش زنجیره پلیمراز (RT-PCR)، یک وسیله جایگزین برای تشخیص تایپینگ و مطالعات اپیدمیولوژیکی پاراکوویروس‌ها می‌باشد (۱۳). با در نظر گرفتن اینکه PCR یک روش سریع، حساس و اختصاصی در تشخیص ژنوم ویروس‌ها بوده و قادر است تعداد زیادی از ژن‌های موردنظر از ویروس را تکثیر کند. لذا با این روش می‌توان اعضای یک جنس یا یک فامیل، همچنین انواع جدید را نیز با طراحی پرایمرهای اختصاصی جدا نمود (۱۴،۱۳). از طرفی، با توجه به اینکه ژنوم پاراکوویروس‌ها RNA می‌باشد، در این مطالعه برای تشخیص HPeV1، مستقیماً نمونه‌های کلینیکی RT-PCR اختصاصی طراحی گردید. این روش، مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی پاراکوویروس انسانی را نیز میسر می‌کند (۱۵،۱۴). مقایسه نتایج مطالعات انجام شده برای تشخیص مولکولی و بررسی فراوانی این ویروس در کشورهای دیگر، با یافته‌های به دست آمده در این پروژه تحقیقاتی به شرح زیر می‌باشد.

با تعیین توالی محصول RT-PCR با پرایمرهای تهیه‌شده از ناحیه 5′UTR می‌توان انواع مختلف پاراکوویروس‌ها را به‌طور مستقیم از نمونه‌های کلینیکی تشخیص داد، همچنین تشخیص پاراکوویروس‌های انسانی جدید را امکان‌پذیر می‌کند. این روش ۱۰۰ برابر حساس‌تر از کشت سلولی است و تشخیص نمونه‌های کلینیکی را نیز میسر می‌کند (۱۵).

WHO در سال ۱۹۷۴-۱۹۶۷ با بررسی ۵۸۱ نمونه از عفونت HPeV1، گزارش نمود که ۲۹٪ سندرم گاستروآنتریت، ۲۶٪ سندرم تنفسی، ۱۲٪ سندرم سیستم عصبی مرکزی، ۶٪ علائم قلبی، پوستی یا عضلانی و ۲۷٪ علائم دیگر را داشتند. ۶۰٪ عفونت‌های پاراکوویروس‌ها در کودکان زیر یک‌سال دیده شده است (۱۶). در هلند (سال ۲۰۰۸) مطالعه اپیدمیولوژی پاراکوویروس در نمونه‌های کلینیکی نشان داد این ویروس اغلب عامل گاستروآنتریت می‌باشد و به‌ندرت ایجاد منتژیت و عفونت خونی (Sepsis) می‌کند. HPeV1 فراوان‌ترین نوع بوده و بالاترین فراوانی آن در اواخر فصل تابستان و اوایل فصل پاییز است که محدود به کودکان ۶ ماه تا ۵ سال (میانگین سن ۹ ماهگی) می‌شود. استفاده از روش RT-PCR برای تشخیص این ویروس در عفونت‌های مختلف به‌خصوص بیماری‌های سیستم عصبی و منتژیت با ارزش است (۱۸،۱۷). در هلند پاراکوویروس‌ها به‌صورت اندمیک بوده و در ۸ سال گذشته بیشتر همراه با

www.SID.ir

Archive of SID

آنتروویروس‌ها جدا شدند (۶)، بیشترین نسبت پاراکوویروس جداشده در آزمایشگاه‌های تشخیصی آنتروویروس‌ها در کشور هلند، مربوط به نوع ۱ و ۳ می‌باشد. در هلند از ۳۰۳ نمونه جدا شده، ۱۲٪ HPeV مثبت بود که ۲۷ نمونه به‌صورت HPeV1 و ۱۰ نمونه به‌صورت HPeV3 گزارش گردید که همه از کودکان زیر ۳ سال جدا شده بودند (۱۷،۲۰). مطالعه‌ای که در آلمان (سال ۲۰۰۸) بر روی کودکان مبتلا به گاستروآنتریت انجام گرفت، برای اولین بار نشان داد بین گروه‌های مختلف پاراکوویروس‌ها نوترکیبی وجود دارد که در تکامل پاراکوویروس‌ها و تغییر در نوع پروتونوع پاراکوویروس نوع یک (Harris) حایز اهمیت است (۱۸،۲۱). با استفاده از RT-PCR می‌توان انواع جدید HPeV1 را نشان داد. در مطالعه حاضر، بین پاراکوویروس جداشده از بیماران با اسهال شدید و گروه کنترل اختلاف قابل توجهی وجود نداشت. ۱۱/۶ (۷/۶۵٪) از کودکان زیر ۲ سال HPeV1 مثبت بودند (۱۲). تاکنون ۶ سرونوع از پاراکوویروس انسانی جدا شده است. بررسی فیلوژنیک نشان داد نوع HPeV1 جداشده در بیماران، متفاوت از نوع اصلی HPeV1 بوده، یعنی توالی ژنوم پاراکوویروس نوع ۶، نوترکیبی بین HPeV1 و HPeV3 را نشان می‌دهد (۲۲). بررسی توالی VP1/2A نشان داد که اختلاف بین انواع پاراکوویروس‌های انسانی مربوط به لوپ متفاوت انتهای کربوکسیلی (C– ترمینال) پروتئین کپسیدی VP1 می‌باشد که ایمونوژنیک است. تشخیص این ویروس‌ها توسط پروتئین کپسیدی به‌خصوص VP1 نیز انجام شده است (۲۳). از سال ۲۰۰۴–۱۹۸۵ در کانادا، ۲۸ مورد HPeV به‌وسیله RT-PCR جدا شد (۲۰ مورد HPeV1، ۳ مورد HPeV2 و ۵ مورد HPeV3) که به‌جزء یک مورد همگی کودک (با متوسط سن ۷ ماه) بودند، و اغلب نمونه‌های جداشده نیز HPeV1 بود (۲۴). انواع HPeV1 جداشده در کانادا، اروپا و ژاپن از نظر ژنتیکی متفاوت از نوع رفرانس (Harris) می‌باشند. در بررسی‌ها نشان داده شد که تشخیص مولکولی به تشخیص اختصاصی و بالا بردن اطلاعات در مورد اپیدمیولوژی و خصوصیات کلینیکی می‌افزاید (۲۴). تحقیقاتی که اخیراً در فنلاند روی ۱۲۰ کودک انجام شد، نشان داد متوسط سن آلودگی با HPeV1، ۱۸ ماهگی است، و ۹۵٪ نوزادان دارای آنتی‌بادی مادری HPeV1 هستند؛ درصورتی‌که فقط در ۲۰٪ کودکان بین ۱۲–۲ ماهگی سرم مثبت بوده است و سرم مثبت‌ها در سال بعد زندگی به سرعت افزایش یافته‌اند و ۸۷٪ عفونت نیز در پاییز اتفاق افتاده است. بنابراین عفونت پاراکوویروس نوع یک بسیار بالا می‌باشد (۲۵،۹). مطالعه دیگری در سوئد (سال ۲۰۰۸) بر روی ۶۲ سوش رفرانس و نمونه‌های کلینیکی به روش RT-PCR نشان داد همه با موفقیت جدا شده و هیچ نوع آلودگی با غیر HPeV با تعیین توالی ندارند، همچنین در این بررسی با روش مولکولی توانستند انواع پاراکوویروس‌ها را جدا کنند؛ درصورتی‌که کشت سلولی غیراختصاصی بود و امکان جداشدن تعداد زیادی از ویروس‌ها با هم در کشت سلولی وجود داشت، در حالی‌که PCR خیلی اختصاصی است و می‌توان انواع سرونوع‌ها را با این روش جدا نمود (۱۳). با وجود اینکه این ویروس برای اولین بار در اوهایوی آمریکا در سال ۱۹۵۶ جدا شد، ولی بر روی اپیدمیولوژی این ویروس کار زیادی صورت نگرفته است و فقط چند مطالعه در ارتباط این ویروس با دیابت نوع یک انجام شده که در نتایج هیچ‌گونه رابطه‌ای بین عفونت پاراکوویروس و دیابت مشاهده نشده است (۲۵). در جنوب آفریقا از ۱۹۴۱ نمونه مدفوع، ۱۱/۳٪ به روش Real-Time PCR، HPeV مثبت بود که اغلب در نوزادان مشاهده گردید و نوع HPeV4 نیز اولین بار در جنوب آفریقا جدا شد (۲۶). در سال ۲۰۰۴ محققین در نروژ دریافتند عفونت پاراکوویروس بیشتر در سن ۱۸–۶ ماهگی، به‌علت از دست دادن آنتی‌بادی مادری دیده می‌شود و اغلب این عفونت در فصل پاییز اتفاق می‌افتد که پاراکوویروس نوع یک فراوان‌تر از انواع دیگر است (۷۶٪ نوع ۱، ۱۳٪ نوع ۳، ۹٪ نوع ۶ و انواع دیگر ۲٪) (۲۶). در مطالعه دیگری در ژاپن، پاراکوویروس جداشده (۳٪) از ۱۳۵۶ نمونه کلینیکی، در ۱۴ مورد HPeV1، ۱۰ مورد HPeV6، و ۱ مورد HPeV4 گزارش گردید و اغلب عفونت HPeV در اطفال زیر ۳ سال مشاهده شد (۲۷). در سالوادر برزیل به روش RT-PCR، ۱۶/۱٪ از ۳۳۵ نمونه مدفوع نوزادان و کودکان زیر ۶ سال مبتلا به گاستروآنتریت، HPeV تشخیص داده شد و تعیین توالی گردید. توالی یک نمونه از توالی نوع‌های قبلاً جداشده، متفاوت بود که نوع جدید (HPeV8) نامیده شد. در ضمن نشان داده شد نوع‌های مختلف، ایجاد علائم کلینیکی مختلف می‌کنند. در بررسی دیگر فقط ۱۱ مورد از ۵۴ نمونه مدفوع HPeV مثبت بود که ۱۰ نمونه مثبت از انواع پاراکوویروس‌های شناخته شده بودند (۷،۶،۵،۲،۱)، ولی توالی

www.SID.ir

Archive of SID

VP1 یک نمونه با بقیه انواع شناخته‌شده متفاوت بود که پس از تعیین توالی کامل ژنوم، نوع HPeV4 تأیید گردید و این نوع از نظر مکانیسم آلودگی شباهت به نوع ۳ داشت (۲۸). در مطالعه‌ای در پاکستان، ۹٪ نمونه‌های مدفوع (۶/۶۵) حاوی پاراکوویروس‌های نوع (۱،۵،۶،۷) بودند که با روش حساس RT-Nested PCR انجام شد، در این بررسی میانگین سن بیماران ۳ سال برآورد گردید (۱ ماه تا ۱۵ سال). نمونه‌های HPeV مثبت همگی زیر یک‌سال قرار داشتند. در این مطالعه نمونه‌های مثبت جزء ۶ نوع پاراکوویروس بودند که قبلاً جدا شده بود و فقط یک نمونه جداشده از مدفوع یک کودک آلوده، بعد از تعیین توالی متفاوت از بقیه گزارش شد که پاراکوویروس نوع ۷ نامگذاری گردید (۲۹). در سریلانکا از ۳۶۲ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاستروآنتریت حاد در طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۵، ۳۰ نمونه (۸/۳٪) با تست RT-PCR پاراکوویروس مثبت بود که ۲ نمونه از آنها پس از بررسی توالی، نوع HPeV10 تشخیص داده شد (۳۰) و از نظر ژنتیکی نزدیک به HPeV3 بود. نتایج این تحقیق که از سال ۱۳۸۸-۱۳۸۶ روی نمونه‌های کلینیکی کودکان مبتلا به گاستروآنتریت ارسالی به آزمایشگاه تحقیقات گروه بیولوژی مولکولی دانشکده پزشکی انجام گرفت، نشان داد فراوانی این ویروس فصلی بوده و بالاترین فراوانی در فصل بهار و پاییز می‌باشد ($p<0/001$، جدول شماره ۲). در مطالعه حاضر، آلودگی با پاراکوویروس در کودکان پسر بیشتر از دختران مشاهده شد ($p<0/001$، جدول شماره ۲). نتایج مربوط به سن آلودگی در گروه سنی ۱۲-۶ ماهگی به‌طور معنی‌داری ($p<0/034$، جدول شماره ۲) بیشترین موارد مثبت را نسبت به گروه‌های سنی دیگر داشت که مطالعات قبلی را تأیید می‌کند، و شاید علت آن را بتوان وجود آنتی‌بادی در کودکان بالای یک‌سال و یا به دلیل وجود آنتی‌بادی مادری در نوزادان دانست (۹)؛ زیرا تعداد زیادی از نمونه‌های مطالعه حاضر مربوط به نوزادان و کودکان زیر ۶ ماه بود، درصورتی‌که درصد بالایی از نمونه‌های مثبت مربوط به اطفال بالای ۶ ماه تا یک‌سال گزارش گردید (جدول شماره ۲). فقدان عفونت HPeV1 در اطفال بزرگتر در مقایسه با تحقیقات سرواپیدمیولوژی که قبلاً انجام‌شده، نشان می‌دهد که ۷۲٪ افراد در ۲ سالگی دارای آنتی‌بادی بر علیه این ویروس هستند که این تعداد در بالغین به ۹۹٪ می‌رسد (۳۱،۲۱). همچنین در این تحقیق مشاهده گردید که عفونت پاراکوویروس‌ها اغلب در فصل پاییز و بهار و در اطفال زیر یک‌سال (بین ۱۲-۶ ماه) اتفاق می‌افتد که این نتایج با سایر مطالعات در کشورهای دیگر مطابقت داشت (۳۲،۱۲،۸). برای اطمینان از اینکه عامل گاستروآنتریت آنتروویروس‌ها نمی‌باشد، در ۲۰ عدد از نمونه‌های مثبت با پرایمرهای اختصاصی آنتروویروس‌ها، RT-PCR انجام شد که در تمام موارد جواب منفی بود. مطالعات قبلی نشان داد پاراکوویروس‌ها به‌علت اختلافات ژنتیکی با آنتروویروس‌ها، به روش PCR آنتروویروس‌ها منفی می‌شوند (۲۰). در این مطالعه و دیگر تحقیقات نشان داده شد که در مقایسه ۲ روش کشت سلولی و RT-PCR برای تشخیص HPeV-1 از نمونه مدفوع (۱۲)، روش RT-PCR سریع‌تر و حساس‌تر است، درصورتی‌که کشت سلولی وقت‌گیر و غیرحساس بوده و اغلب منجر به منفی کاذب می‌شود (در این مطالعه از ۲۰ نمونه مثبت پس از یک هفته فقط ۳ نمونه دارای CPE بود).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از روش RT-PCR اختصاصی می‌توان پاراکوویروس‌ها را مستقیماً از نمونه‌های کلینیکی با سرعت و دقت بالا تشخیص داد که در بررسی اپیدمیولوژی با ارزش می‌باشد، همچنین از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌کاهد. با در نظر گرفتن نتایج این تحقیق و سایر مطالعات امید است در آینده این روش به‌طور معمول در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران (شماره قرارداد ۴۹۹۸۲۴ مورخ ۸۶/۲/۹) انجام گردید که بدین وسیله مجری و همکاران طرح مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن معاونت ابراز می‌دارند، در ضمن از همکاری مرکز تحقیقات عفونی اطفال بیمارستان حضرت رسول (ص) و جناب آقای دکتر بهار عضو محترم هیئت علمی گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی در تهیه نمونه‌های مورد نیاز و همچنین از جناب آقای دکتر علی کبیر در تجزیه و تحلیل آماری کمال تشکر را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan, Nalkking N, Auvineu P, Stanway G. A Distinct Picornavirus Group Identified by Sequence Analysis. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:8847-8851.

2. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete Sequence of Echovirus 23 and Relationship to Echovirus 22 and Other Human Enteroviruses. Virus Res 1998;56:217-223.

3. Racaniello VR. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffine DE, Lamb RA, Martin MA, Roizma B, Straus SE, editors. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 685-722.

4. Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, et al. Molecular and Biological Characteristics of Echovirus 22, a Representative of a New Picornavirus Group. J Viro 1994;68(12):8232-8238.

5. Ghazi F, Hughes PJ, Hyypia T, Stanway G. Molecular Analysis of Human Parechvirus Type2 Formerly Echovirus 23. J Gen Virol 1998;79:2641-50.

6. Joki-Korpela P, Hyypia T. Diagnosis and Epidemiology of Echovirus 22 Infections. Clin Infect Dis 1998;27:129-136.

7. Legay VJ, Chomel J, Fernandez E, Lina B, Aymard M, Khalfan S. Encephalomyelitis Due to Human Parechovirus Type 1. J Clin Virol 2002;25:193-195.

8. Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human Parechoviruses-Biology and Clinical Significance. Rev Med Virol 2000;10:57-69.

9. Lim KA, Benyesh-Melnick M. Typing of Viruses by Combinations of Antiserum Pools. Application to Typing of Enteroviruses (Coxsackie and ECHO). J Immunol 1960;84:309-317.

10. Karsten H, Huppertz I, Drosten C. Prevalence, Types, and RNA Concentrations of Human Parechoviruses in Patients with Acute Enteritis, Including a Sixth Parechovirus Type. J Clin Microbiol 2008;46:242-248.

11. Benschop K, Molenkamp R, Van der Ham A, Wolthers K, Beld M. Rapid Detection of Human Parechoviruses in Clinical Samples by Real-Time PCR. J Clin Virol 2008;41:69-74.

12. Benschop KSM, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HCB. Human Parechovirus Infections in Dutch Children and the Association between Serotype and Disease Severity. Clin Infect Dis 2006;42:204-210.

13. Nix A, Kaija M, Oberste S. Detection of all Known Parechoviruses by Real- Time PCR. J Clin Micro 2008;46:2519-2514.

14. Baumgarte S, Luciano L, Grywna K, Panning M, Drexler J, Karsten C. Prevalence, Types, and RNA Concentrations of Human Parechoviruses, Including a Sixth Parechovirus Type, in Stool Samples from Patients with Acute Enteritis. J Clin Micro 2008;46:242-248.

15. Harvala H, Robertson I, Mc William Leitch EC, Benschop K, Simmonds P. Epidemology and Clinical Association of Human Parechovirus Respiratory Infections. J Clin Micro 2008;46(10):3446-53.

16. Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enterovirus in Human Disease. Prog Med Virol 1978;24:114-157.

17. Van der Sanden S, de Ruin E, Vennema H, Swanink H, Van der Avoort H. Prevalence of Human Parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. J Clin Micro 2008;46(9):2884-9.

18. Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. Analysis of a New Human Parechovirus Allows the Definition of Parechovirus Types and the Identification of RNA Structural Domains. J Virol 2007;81:1013-1021.

19. Noordhoek GT, Weel L, Poelstra E, Hooghiemstra M, Brandenburg AH. Clinical Validation of a New Real-Time PCR Assay for Detection of Enteroviruses and Parechoviruses, and Implications for Diagnostic Procedures. Clin Virol 2008;41(2):75-80.

20. Legay V, Chomel J, Bruno L. Specific RT-PCR Procedure for the Detection of Human Parechovirus Type 1 Genome in Clinical Samples. J Virol Methods 2002;102:157-160.

21. Benschop KS, Schinkel J, Luken ME, Beld MG, Wolthers KC. Forth Human Parechovirus Serotype. Emerge Infect Dis 2006;12:1572-1575.

22. Benschop KS, William CH, Wolther KC, Stanway G, Simmonds P. Widespread Recombination Within Human Parechoviruses: Analysis of Temporal Dynamics and Constrains. J Gen Virol 2008;89:1030-1035.

23. Boonyakiat, Y, Hughes PJ, Ghazi F, Stanway G. Arginine-Glycine-Aspartic Acid is Critical for Human Parechovirus - 1 Entry. J Virol 2001;75:1000-1004.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Abed y, Boivin G. Human Parechovirus Types 1, 2 and 3 Infections in Canada. Emerg. Infect Dis 2006;12:969-975.

25. Tauriainen S, Martiskainen M, Oikarinen S, Lönnrot M, Hyöty H. Human Parechovirus 1 Infection in Young Children - no Association with Type 1 Diabetes. Journal of Medical Virology 2007;79:457-462.

26. Tapia G, Cinek O, Witso E. Longitudinal Observation of Parechovirus in Stool Samples from Norwegian Infants. J Med Virol 2008;80(10):1835-1842.

27. Ito M, Yamashita T, Tsuzuk H, Takeda N, Sakae K. Isolation and Identification of a Novel Human Parechovirus. J Gen Viro 2004;l(85):391-398.

28. Drexler JF, Grywna K, Stöcker A, Almeida PS, Drosten C. Novel Human Parechovirus from Brazil. Emerg Infect Dis 2009;15:310-313.

29. Li L, Victoria J, Alam MM, Angez M, Zaidi SZ, Delwart E. Genomic Characterization of Novel Human Parechovirus Type. Emerg Infect Dis 2009 February; 15(2):288-291.

30. Kim Pham NT, Trinh QD, Takanashi S, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Ushijima H. Novel Human Parechovirus, Sri Lanka. EID Journal Home 2010 January; 16(1):130-132.

31. Alho A, Morttila J, Ilonen J, Hyypia T. Diagnostic Potentioal of Parechovirus Caspid Proteins. J clin Micro 2003;41(6):2294-2299.

32. Ehrnst A, Eriksson M. Epidemiologyical Features of Type22 Echovirus Infection. Scand J Infect Dis 1993;25:275-81.

www.SID.ir