

تعیین توزیع عفونت‌های پارائفلوانزا، آدنوویروس و ویروس سینسیشیال تنفسی به روش Multiplex PCR

در کودکان زیر دو سال مبتلا به برونشیت مراجعه کننده به مرکز درمانی آموزشی

افضلی پور کرمان در سال ۱۳۸۵

دکتر سید علیمحمد عربزاده^۱، دکتر محمدحسین داعی پاریزی^۲، حمیدرضا ملایی^۳، عباس آقایی افشار^۴، دکتر امیر عباس سالاری^{۵*}

خلاصه

مقدمه: عفونت‌های حاد تنفسی از بیماری‌های شایع و مهم‌ترین علل مرگ و میر دوران کودکی به شمار می‌روند. با توجه به همه‌گیری‌های وسیعی که هر سال در فصول سرد اتفاق می‌افتد و نامعلوم بودن میکروارگانیسم مسؤول این عفونت‌ها به خصوص انواع ویروسی، در نواحی و شرایط مختلف، این مطالعه با هدف بررسی ملکولی علت برونشیت از نظر ویروس‌های آدنوویروس، پارائفلوانزا و ویروس سینسیشیال تنفسی به روش Multiplex PCR انجام شد.

روش: در این مطالعه ۱۶۸ کودک زیر ۲ سال با تشخیص بالینی بیماری برونشیت بررسی شدند. بعد از اقدامات بالینی و درمانی از هر بیمار نمونه‌ای از ترشحات ته حلق یا نازوفارنکس به وسیله سواب گرفته و درون محیط ترانسپورت (VTM) قرار داده شد و DNA و RNA ویروسی پس از استخراج تحت آزمایش Multiplex PCR قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که از ۱۶۸ نمونه مورد بررسی ۳۳ مورد (۱۹/۶٪) از بیماران آلوده به ویروس پارائفلوانزا، ۱۸ مورد (۱۰/۷٪) مبتلا به ویروس آدنوویروس و ۶۳ مورد (۳۷/۵٪) مبتلا به ویروس سینسیشیال تنفسی بودند و بقیه از نظر این سه ویروس منفی بودند که احتمالاً ویروس‌های دیگر و یا مایکوپلازما عاملین بیماری بوده که در این بررسی مشخص نشده‌اند. بین نتایج حاصل از آزمایش‌هایی مثل تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC)، سرعت رسوب گلبول‌های قرمز (ESR)، پرهوایی قفسه سینه در رادیوگرافی، آبریزش از بینی، تب، سرفه، توکسیدگی عضلات قفسه سینه، صداهای خشن ریوی، صداهای ویز مانند، سن، جنس و وضعیت حال عمومی با نتایج حاصل از سه عامل ویروسی مسبب بیماری ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: عامل برونشیت‌های ویروسی در کودکان زیر ۲ سال مورد بررسی حاضر به ترتیب ویروس سینسیشیال تنفسی، پارائفلوانزا و آدنوویروس بودند.

واژه‌های کلیدی: برونشیت، ویروس سینسیشیال تنفسی، پارائفلوانزا، آدنوویروس، Multiplex PCR

۱- استادیار گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- کارشناس

ارشد ویروس‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- دستیار کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* نویسنده مسؤول، آدرس: گروه اطفال، بیمارستان افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: alik1981@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۲/۲۰ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۷/۴/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۱۹

مقدمه

ویروس‌های درگیرکننده دستگاه تنفس یکی از مهم‌ترین عوامل پاتوژن عفونت‌های تنفسی ناحیه تحتانی در نوزادان و کودکان هستند که با افزایش سن از میزان شیوع و شدت بیماری کاسته می‌شود. برخی از پارامترهای اپیدمیولوژیکی در شدت بیماری مؤثر بوده و حتی ممکن است سبب مرگ و میر در بیماران شود. با توجه به همه‌گیری‌های ناشی از این ویروس‌ها در فصل سرما، شناخت صحیح این ویروس‌ها می‌تواند از مصرف بی‌مورد آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری نماید (۱).

این ویروس‌ها هر سال سبب همه‌گیری در فصل زمستان گشته و عمدتاً کودکان، طی دو سال اول عمر آن را تجربه می‌کنند. بین ۲۵ تا ۴۰ درصد موارد عفونت اولیه در کودکان منجر به درگیری مجاری تنفسی تحتانی و سبب افزایش موارد بستری در بیمارستان می‌گردد. بعضی گروه‌ها از جمله نوزادان نارس، کودکان مبتلا به بیماری قلبی مادرزادی یا دیسپلازی ریوی، فیبروسیتیک و غیره در صورت کسب عفونت در معرض خطر بیشتری خواهند بود (۲،۳).

ویروس سینسیشیال تنفسی (RSV) مهم‌ترین علت بیماری‌های دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی، در شیرخواران و کودکان کم سن و سال (زیر ۲ سال) بوده و معمولاً بر سایر میکروارگانسیم‌های مولد برونشیت و پنومونی اولویت دارد و حدود نیمی از موارد برونشیت و ۱/۴ موارد پنومونی در شیرخواران را سبب شده و عامل عمده اوتیت حاد میانی در کودکان می‌باشد (۴). با توجه به اهمیت این ویروس در ایجاد عفونت‌های مکرر حاد دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی و به منظور جلوگیری از عوارض حاد و طولانی مدت، شناسایی موارد عفونت با این ویروس

ضروری است (۵).

ویروس پارائفلوآنزا از جنس پارامیکسو ویروس می‌باشد. این ویروس در همه جا پراکنده است و پس از RSV عامل مهم عفونت‌های تنفسی در کودکان است. انتقال از طریق تماس مستقیم با ترشحات آلوده تنفسی است. این عفونت‌ها معمولاً گلو و بینی را گرفتار ساخته و به صورت یک سندرم بدون عارضه سرماخوردگی بروز می‌کنند. چهار نوع از این ویروس در انسان سبب بیماری می‌گردد. که نوع ۱، ۲ و ۳ این ویروس پس از RSV مهم‌ترین عامل عفونت حاد ویروسی در کودکان هستند. همه‌گیری‌هایی از این بیماری در زمستان و اوایل بهار دیده می‌شود (۴،۶).

تعداد ۱۰-۵ درصد از بیماری‌های تنفسی کودکان به وسیله آدنوویروس نوع ۱، ۲، ۳، ۴ و ۷ ایجاد می‌شود و کودکان آلوده ویروس را ماه‌ها بعد از عفونت منتشر می‌کنند (۴). آدنوویروس‌ها موجب بروز علائمی مشابه سرماخوردگی، التهاب حنجره، تب، سرفه، سردرد و croup می‌شوند. این ویروس‌ها می‌توانند موجب نوعی بیماری مشابه سیاه‌سرفه در کودکان شده که دوره‌های طولانی داشته و پنومونی واقعی ویروسی را ایجاد می‌کنند. میزان مرگ حاصل از پنومونی آدنوویروسی حدود ۱۰-۸ درصد است که بیشتر توسط انواع ۳ و ۷ ایجاد می‌شود (۲). هدف از این مطالعه تعیین میزان نقش ویروس‌های RSV، پارائفلوآنزا و آدنوویروس مبتلا به عفونت‌های تنفسی تحتانی در کودکان زیر ۲ سال مراجعه کننده به بیمارستان افضل‌پور کرمان در سال ۱۳۸۵ می‌باشد. آگاهی از توزیع و شناخت عوامل ایجاد کننده بیماری در هر جامعه و منطقه جغرافیایی برای تصمیم‌گیری در مورد معیارهای کنترلی، سیاست‌گذاری واکسیناسیون و پیشگیری و در صورت بروز عوارض باکتری‌ها درمان‌های تجربی آنتی‌بیوتیکی

اضافه شدند. RNA استخراج شده برای جلوگیری از تشکیل لوب و همچنین حلالیت بیشتر قبلاً ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شد. پس از اضافه کردن مواد و آنزیم quick spin شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در این مدت RNA ویروس به cDNA تبدیل می‌شود. پس از اتمام کار از محصول کار در آزمایش PCR استفاده می‌شد. آزمایش PCR در این تحقیق با استفاده از کیت Taq DNA Polymerase Core Kit (QIAGEN, Germany) انجام شد. مواد لازم به یک میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتری اضافه شدند. پروتکل دمایی برای انجام PCR به ترتیب عبارت بود از: ۹۵ درجه سانتی گراد ۷ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه و ۶۸ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه (۳۵ سیکل) به همراه ۷۲ درجه سانتی گراد ده دقیقه. محصول نهایی پس از ژل الکتروفورز بر روی ترانس ایلومیناتور برای شناسایی باندهای مورد نظر بررسی گردید (۷). در پایان برای بررسی ارتباط بین متغیرها از آزمون‌های تحلیل پراش (ANOVA)، آزمون کای (Chi-Square) و کروسکال-والیس (KRUSKAL-WALLIS) با نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

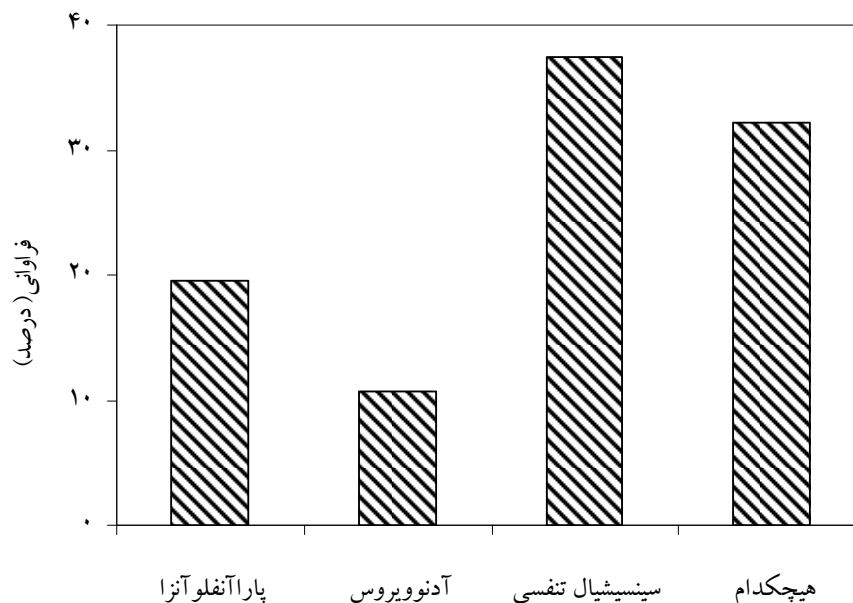
نتایج

از ۱۶۸ نمونه مورد بررسی ۶۶٪ مذکر و ۳۴٪ مؤنث بودند و نتایج بررسی نشان داد که ۳۳ مورد (۱۹/۶٪) مبتلا به ویروس پارائفلوآنزا، ۱۸ مورد (۱۰/۷٪) مبتلا به ویروس آدنوویروس و ۶۳ مورد (۳۷/۵٪) مبتلا به سینسیشال تنفسی و بقیه از نظر این سه ویروس منفی بودند. گروه سایر عوامل ویروسی شامل بیماری‌ها بود که سه ویروس فوق در ایجاد بیماری آنها نقشی نداشت بلکه عوامل

ضروری می‌باشد و همچنین اهمیت تشخیص سریع بیماری با روش PCR در جلوگیری از درمان بی‌مورد آنتی‌بیوتیکی از اهداف مهم این بررسی می‌باشد.

روش بررسی

نمونه مورد بررسی ۱۶۸ کودک زیر ۲ سال بودند که از نظر بالینی تشخیص بیماری برونشولیت برای آنها مطرح شده بود. بعد از اقدامات مرسوم تشخیصی و درمانی و پس از کسب رضایت از خانواده از هر بیمار نمونه‌ای از ترشحات ته حلق یا نازوفارنکس به وسیله سواب گرفته شد و درون محیط ترانسپورت (VTM) قرار داده شد. محیط‌ها ظرف حداکثر ۶ ساعت به آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان منتقل شدند و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای استخراج ژنوم ویروس‌های تحت مطالعه از کیت High pure viral nucleic acid (Roche, Germany) استفاده شد. DNA و RNA ویروسی پس از استخراج تحت آزمایش Multiplex PCR قرار گرفتند. در این آزمایش از ۳ جفت پرایمر استفاده شد که صحت آنها در سایر مطالعات نیز به اثبات رسیده بود ولی با این حال توسط سیستم Blast مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به اینکه ژنوم ویروس‌های پارائفلوآنزا و سینسیشال تنفسی از نوع RNA می‌باشد لذا انجام یک مرحله Reverse transcription الزامی است که در آن ابتدا RNA ویروسی به cDNA تبدیل شده و سپس تمام DNA ویروس‌ها تحت PCR قرار می‌گیرند. جهت انجام RT بر روی RNA استخراج شده از کیت (QIAGEN, Germany) Omni script Reverse Transcription استفاده شد. پس از تهیه Master Mix بر روی یخ و انتقال آنها به تیوب‌های ۰/۲ میکرولیتری Template و آنزیم RT



نمودار ۱: بررسی فراوانی عوامل ویروسی مسبب بیماری برونشیت در کودکان مورد بررسی

(هیچکدام شامل مواردی است که PCR آنها از نظر سه ویروس مورد بررسی منفی بوده است)

حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد موارد بستری کودکان در مراکز درمانی در ارتباط با عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی است (۸،۹).

طبق بررسی‌های به عمل آمده، ۵ تا ۸ درصد عفونت‌های ویروسی تنفسی کودکان زیر ۲ سال را آدنووایروس‌ها تشکیل می‌دهند، به طوری که بیش از ۱۰ درصد پنومونی کودکان، متعاقب عفونت حاد دستگاه تنفسی تحتانی، ناشی از این ویروس می‌باشد. عوامل ویروسی بسیاری در بروز این عفونت‌ها خصوصاً عفونت‌های دستگاه تنفسی تحتانی کودکان شناسایی شده‌اند که از مهم‌ترین آنها می‌توان از آدنووایروس‌ها نام برد که در اکثر موارد با آبریزش بینی، سرفه، تب و خصوصاً پنومونی همراه هستند (۱۰).

در بررسی که بر روی کودکان دچار عفونت حاد دستگاه تنفسی در فاصله سال‌های ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۵ توسط

ویروسی دیگر و یا مایکوپلازما عامل بیماری برونشیت در آنها بوده است (نمودار ۱). بین نتایج حاصل از آزمایش‌هایی مثل تعداد گلبول‌های سفید، سرعت رسوب گلبول‌های قرمز، پرهوایی قفسه سینه، آبریزش از بینی، تب، سرفه، توکشیدگی عضلات قفسه سینه، صداهای خشن ریوی، صداهای ویز مانند، سن، جنس و وضعیت حال عمومی با نتایج حاصل از عوامل ویروسی مختلف (پارائفلوآنزا و RSV و آدنووایروس و...) ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بحث

عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی نقش مهمی در ایجاد بیماری و مرگ و میر کودکان دارند. به طوری که بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت علت مرگ و میر سالیانه حدود ۴ میلیون کودک زیر ۲ سال می‌باشند و

سنی کودکان زیر ۲ سال (۷۰ درصد کل بیماران) بودند (۱۴).

در مطالعه‌ای که توسط مالک‌نژاد و همکاران در سال ۷۷ بر روی ۱۴۵ کودک زیر ۵ سال مبتلا به برونشیت انجام شده است تعداد ۵۶ مورد (۳۸/۶ درصد) از نظر ویروس سینسیشال تنفسی مثبت بودند (۱۵).

سیفی و همکاران در سال ۱۳۸۱ تحقیقی در مورد سندرم‌های تنفسی تحتانی ناشی از ویروس RSV در نوزادان و اطفال تبریز انجام دادند که در آن ۲۵۲ کودک بیمار مبتلا به عفونت مجاری تنفسی و تحتانی با محدوده سنی ۱ تا ۲۸ ماهه به عنوان گروه بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. تعداد ۱۵۲ کودک با شرایط مشابه با گروه بیماران و بدون علائم تنفسی به عنوان گروه کنترل انتخاب شده و از نظر آنتی ژن ویروس RSV با روش ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بررسی نشان داد که ۶۲ مورد (۲۴/۶٪) از گروه بیمار و فقط ۱ مورد (۰/۶۵٪) از گروه کنترل از نظر آنتی ژن ویروس RSV مثبت بودند و بررسی آماری اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد ($P < 0/05$) و میزان بالای عفونت در ماه‌های ۱ تا ۶ ماهه مشاهده شد (۱۶). در مطالعه حاضر بر روی ۱۶۸ کودک مبتلا به عفونت تنفسی تحتانی با محدوده سنی ۱-۲۴ ماه ۳۳ مورد (۱۹/۶٪) بیماران آلوده به ویروس پارائنفلوئزا و ۶۳ مورد (۳۷/۵٪) مبتلا به ویروس RSV بودند. گروه مورد بررسی در مطالعه حاضر از نظر سنی و نیز محل گرفتاری دستگاه تنفسی با بررسی‌های انجام شده در نواحی دیگر ایران اختلافاتی دارد ولی به هر حال شیوع بالای عفونت با RSV در همه این بررسی‌ها به چشم می‌خورد.

Bruno و همکاران در فرانسه انجام گرفت و هم‌چنین طبق مطالعه Monte و همکاران که در زمینه تعیین فراوانی عوامل ویروسی در ایجاد عفونت‌های حاد تنفسی انجام پذیرفت، آدنوویروس‌ها به عنوان یکی از عوامل مهم در ایجاد این نوع عفونت‌ها معرفی شده‌اند (۱۱، ۱۲). طبق گزارش Winter و همکاران در جریان چند اپیدمی عفونت حاد تنفسی تحتانی در کودکان، در فاصله سال‌های ۱۹۸۵ تا ۱۹۹۴ در ادینبورگ، آدنوویروس‌ها بیش از ۱۰ درصد عوامل ویروسی ایجاد کننده عفونت تنفسی را تشکیل می‌دادند (۱۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۷۷ بر روی کودکان مبتلا به عفونت حاد تنفسی در کودکان تهرانی انجام داده‌اند از تعداد ۲۳۱ کودک مبتلا به عفونت حاد سیستم تنفسی، ۲۲ کودک (۹/۵ درصد) از نظر آدنوویروس مثبت بودند و این ویروس بیشترین میزان عفونت در کودکان ۱ تا ۴ سال را شامل می‌شد. هم‌چنین در مطالعه مذکور، گرفتاری ریه شایع‌ترین تظاهر بالینی (۶۸/۲٪ درصد) در کودکان دچار عفونت حاد تنفسی تحتانی بوده است و یکی دیگر از تظاهرات بالینی مهم این بیماران تب بالای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در ۷۱/۸ درصد کودکان مبتلا بوده است (۹). در مطالعه حاضر که بر روی ۱۶۸ کودک عفونت تنفسی تحتانی با محدوده سنی ۱-۲۴ ماه انجام شد، ۱۸ مورد (۱۰/۷٪) عامل بیماری آدنوویروس بود. البته بیماران با عفونت دستگاه تنفسی فوقانی در مطالعه حاضر قرار نداشتند و بدین جهت درصد ابتلا به ویروس کمتر می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط صفار و همکاران در سال ۸۱ بر روی کودکان مبتلا به عفونت تنفسی در طیف سنی ۱ تا ۸ ماهه انجام شد، شایع‌ترین ویروس پارائنفلوئزا (۱۱ درصد) و آدنوویروس (۶/۷ درصد) بوده است و بیشترین گروه

The Frequency Distribution of Parainfluenza, Adeno and Respiratory Syncytial Virus Infections in Children below 2 Years Old with Bronchiolitis, by Multiplex Polymerase Chain Reaction Method, Afzalipoor Hospital, Kerman, 2006

Arabzadeh S.A.M, Ph.D.¹, Daie Parizi M.H., M.D.², Molaie H.R., M.Sc.³, Aghaie Afshar A., M.Sc.³, Salari A.A, M.D.*.

1. Assistant Professor of Virology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Professor of Pediatrics, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Master of Science in Virology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4. Resident of Pediatrics, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author, e-mail: alik1981@yahoo.com

(Received 10 March 2008 Accepted 9 July 2008)

Abstract

Background & Aims: Acute respiratory infections are common cause of mortality during childhood. This study was designed to determine the incidence of adenovirus, parainfluenza virus and respiratory syncytial virus in respiratory infections by Multiplex PCR method.

Methods: This study included 168 children under 2 years of age with clinical diagnosis of bronchiolitis. Nasopharyngeal specimens were taken and transferred to the virology laboratory in VTM transport medium. Following extraction of viral DNA and RNA, Multiplex RT-PCR was performed.

Results: From 168 specimens, 33 cases (19.6 %) were infected with parainfluenza viruses, 18 cases (10.7%) with adenovirus and 63 cases (37.5 %) with RSV. The rest of the specimens were negative for these viruses, which indicated that these specimens had been probably infected with other viral agents not investigated in this study, or with mycoplasma. No significant correlation was found between WBC count, ESR values, degree of air trapping, coryza, fever, cough, retraction rate, wheezing and the type of viral infection. Also no significant correlation was found based on age, sex or general condition of patients.

Conclusion: Major causes of viral infections in this study were respectively respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza and adenovirus.

Keywords: Bronchiolitis, Respiratory syncytial virus, Parainfluenza, Adenovirus, Multiplex PCR

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(4): 305-311

References

1. Berner R, Schwoerer F, Schumacher RF, Meder M, Forster J. Community and nosocomially acquired respiratory syncytial virus infection in a German paediatric hospital from 1988 to 1999. *Eur J Pediatr* 2001; 160(9): 541-7.
2. Hijazi Z, Pacsa A, Eisa S, el Shazli A, Abd el-salam R, el-Ghorbawy F. Respiratory syncytial virus infections in children in a desert country. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14(4): 322-4.
3. Lowther SA, Shay DK, Holman RC, Clarke MJ, Kaufman SF, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among American Indian and Alaska Native children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(1): 11-7.
4. Jawetz E, Melnik JL, Adelverg E.A. Adenoviruses And Paramyxoviruses. In: *Pediatr Infect Medical microbiology*, 22nd ed., USA, Appelton and Lange, 2001; PP450-80.

5. Walsh EE, Falsey AR, Hennessey PA. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(3): 791-5.
6. Hall C.B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Eng J Med* 2001; 344(25): 1917-28.
7. Syrmis M.W, Whiley D.M, Thomas M, Mackay I.M, Williamson J, Siebert D.J et al. A sensitive, specific and cost-effective multiplex RT-PCR assay for detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *JMD* 2004; 6(2): 125-31.
8. Rahbarimanesh A.A, Karimi S, Modarres Gilani Sh. Relative Frequency of parainfluenza infection in patients with respiratory infections. *Acta Medica Iranica* 2004; 42(4): 281-4.
9. Milani M, Respiratory Syncytial virus infection among young children with acute respiratory infection. *Acta Medica Iranica* 2003; 41(4): 269-72.
10. Behrman R.E, Kliegman R.M, Gabriel G, Julio pres fontan. Nelson's textBook of pediatrics. 20th ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000, Chapter 18.
11. Bruno L, Martine V, Sophie F, Jaques L. Surveillance of community-acquired viral infection due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12): 3007-11.
12. Monte A.S, Sullivan K.M. Acute respiratory illness in the community, frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol infect* 1993; 111(36): 145-60.
13. Winter G.F, Hallam NF, Hargreaves FD, Molyneaux PJ, Burns SM, Inglis JM. Respiratory viruses in a hospitalized pediatric in Edinburgh (1985-1994). *J Infect* 1996; 33(3): 207-11.
14. Safar M.J, Naghshvar F, Alaei E. Role of Respiratory syncytial virus and Influenza in children with acute respiratory infections, Mazandaran, 1381. *J Mazandran Univ Med Sci* 2002; 12(37): 20-7 [Persian].
15. Malek nejad P, Erfani U. Prevalence of respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in 145 children below 5 years old, from January to May ,1999 in Imam Khomeini, Markaz tebbi and Bahrami hospitals. *J Tehran Medicine Faculty* 1999; 6: 67-71 [Persian].
16. Gedari seifi S, Rahbani nobar M, Ebrahim poor S, Jalali A, Mirza aghazadeh A. Study on respiratory syndroms due to RSV in children and neonate. *J Tabriz Univ Med Sci* 2002; 55: 5-11 [Persian].
17. Nanbakhsh H, Saeifar A. Flouraid and Oral Health. Urmia University Pub., 2001; PP7-9 [Persian].
18. Dean HT. The investigation of physiological effects by the epidemiological method. In: Moulton RF(editor), Fluoride and dental health. Washington D.C., American Association for the Advancement of Science, 1942; PP23-31.