



تعیین نقش انتروویروس های غیر پولیوی در ایجاد فلج شل حاد (AFP) به کمک پنج رده سلولی در ایران

دکتر فیروز عباسیان^{۱*}، دکتر حمیده طباطبایی^۲، دکتر محبوبه ساریجلو^۲، دکتر رخشنده ناطق^۲

^۱ گروه میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ^۲ گروه ویروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: فلج شل حاد (Acute Flaccid Paralysis) توسط عوامل مختلفی ایجاد می شود که مهمترین عامل آن پولیو ویروس است. هدف از پژوهش ارزیابی عوامل غیر پولیوی ایجاد کننده فلج در ایران می باشد. مواد و روش ها: در این تحقیق به منظور بهبود در قدرت جداسازی انتروویروس های احتمالی موجود در مدفوع کودکان مبتلا به فلج شل حاد، تمام نمونه های مدفوع این کودکان، به پنج رده سلولی RD، L20B، Hep-2، Vero، GMK تلقیح شدند و با روش میکرونوترالیزاسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: با تلقیح دو نمونه از هر یک از ۴۵۸ مورد بیمار زیر ۱۵ سال مبتلا به فلج شل حاد به پنج رده سلولی ذکر شده، در کل ۳۴ مورد انتروویروس از گونه ها و سروتایپ های مختلف جداسازی گردید. ۷/۱٪ از کل موارد مبتلا به AFP از نظر کشت سلولی و جداسازی انتروویروس ها مثبت بودند. جنسیت نقش موثری در جداسازی انتروویروس ها نداشت. اکثر موارد جداسازی ویروس ها مربوط به گروه سنی ۵-۰ سال بود و با افزایش سن، از تعداد موارد جداسازی این ویروس کاسته شد. بیشترین ویروس های جدا شده مربوط به پولیو ویروس ها (۱۲ مورد) و اکو ویروس ها (۱۲ مورد) بود. در این پژوهش نشان داده شد که موارد شناخته شده فلج باقیمانده (Residual paralysis=RP) بیشتر توسط اکو ویروس ها ایجاد می شوند. همچنین اختلاف معنی داری در تعداد موارد جداسازی پولیو ویروس واکسن در افراد مبتلا به RP و افراد غیر مبتلا وجود نداشت. از این رو نشان داده شد واکسن های OPV مورد استفاده در کشور از ایمنی کافی برای استفاده برخوردار است. موارد جداسازی کوکساکسی ویروس ها در نمونه های بالینی نیز بین افراد مبتلا به RP و افراد غیر مبتلا اختلاف معنی داری نداشت. نتیجه گیری: به دلیل معنی دار بودن اختلاف جداسازی انتروویروس های غیر پولیوی بین دو گروه دارای فلج باقیمانده مثبت و منفی، نقش این ویروس ها در ایجاد فلج باقیمانده ثابت می شود.

واژگان کلیدی: فلج شل حاد، انتروویروس های غیر پولیوی، کشت سلولی

پذیرش برای چاپ: شهریور ۱۳۸۷

دریافت مقاله: فروردین ۱۳۸۷

مقدمه

می شود که مهمترین عامل آن پولیو ویروس است (۸ و ۹). به AFP ناشی از پولیو ویروس ها اصطلاحاً پولیومیلیت گفته می شود. پولیومیلیت (Poliomyelitis) از دو کلمه یونانی پولیو (Polio) به معنی خاکستری و میلیت (Mielitis) به معنی التهاب طناب نخاعی مشتق شده است. پولیومیلیت می تواند افراد حساس را در مدت چند روز فلج کرده و ندرتاً منجر به مرگ گردد. چون این ویروس گردش دهانی مدفوعی دارد و در گذشته اغلب سطح بهداشت در جمعیت کودکان کم سن و سال بوده است، بیشترین

فلج شل حاد یا AFP (Acute flaccid paralysis) عبارت است از ضعف ناگهانی هر یک از بخش های بدن (۱) ولی نه از بدو تولد (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷) که در مدت ۵-۴ روز به اوج خود می رسد اما پس از آن پیشرفت نمی کند. در فلج اطفال هیچ راش یا علامت مشخصه دیگری وجود ندارد. AFP توسط عوامل مختلفی ایجاد

(*آدرس برای مکاتبه: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۲۲۱۶۸۵۶@yahoocom.Fibamicro1

شرایط استریل به یک لوله استریل دیگر منتقل و از این مایع به کشت سلولی تلقیح می شود.

کشت سلولی: سلول ها معمولاً در بطری نگهداری می شوند. برای تلقیح نمونه ها، سلول ها در لوله کشت داده می شوند. به این ترتیب که ابتدا محیط داخل بطری را خارج کرده و مقداری تریپسین به آن افزوده می شود. پس از چند دقیقه، تریپسین موجود در آن خارج می شود. چند ml محیط به بطری اضافه می شود. به این ترتیب، سلول ها از دیواره بطری کنده شده و از یکدیگر جدا می شوند و در محیط به صورت سوسپانسیون در می آیند. پس از شمارش تعداد سلول ها، یک سوسپانسیون سلولی با رقت $10^5 \times 8-7$ سلول در هر میلی لیتر تهیه می شود. به هر لوله مخصوص کشت سلول، ۱ ml از این سوسپانسیون افزوده می شود. لوله ها در جا لوله ای مخصوص با شیب ۵٪ در انکوباتور $37^\circ C$ قرار می گیرند. وقتی که سلول ها در لوله رشد کرده و یک لایه کامل تشکیل شد، محیط موجود در لوله ها تخلیه شده و به آن، محیط نگهدارنده اضافه می شود.

تلقیح نمونه ها به لوله های کشت سلولی: مقدار 0.2 میلی لیتر از نمونه تیمار شده مدفوع به دو لوله از هر یک از سلول های RD، HEp2، Vero، L20B، GMK تلقیح شده و لوله های تلقیحی در حرارت 36 درجه سانتیگراد انکوباتور قرار می گیرند. این لوله ها هر روز از نظر تشکیل CPE مورد بررسی میکروسکوپی قرار می گیرند. در صورت مشاهده CPE، لوله ها در فریزر $20^\circ C$ - نگهداری می شوند. نمونه های منفی پس از دو بار پاساژ مشخص شده و دور انداخته می شوند. برای تعیین سروتایپ ویروس های جدا شده، نمونه های مثبت به روش تست نوترالیزاسیون مورد آزمایش قرار می گیرند.

تست نوترالیزاسیون: برای تعیین تیپ انتروویروس های جدا شده ابتدا آنتی سرم ها طبق دستورالعمل موجود در ویال به چاهک های پلیت اضافه می شوند. اگر نمونه مثبت بر روی سلول HEp2 جدا شده باشد در یک ردیف نیز آنتی سرم کوکساکسی B استفاده می شود. در مرحله بعد، ابتدا از نمونه های مثبت شده بر روی کشت سلولی رقت تهیه کرده و سپس مقدار 50 میکرو لیتر از این رقت به چاهک های ۱ تا ۱۱ در هر ردیف اضافه می شوند. پلیت ها برای ۲ ساعت در انکوباتور $36^\circ C$ قرار می گیرند. در مرحله بعد 100 میکرو لیتر از سلولی که جداسازی ویروس مورد آزمایش بر روی آن انجام شده است، به تمام چاهک ها اضافه کرده و به کمک چسب مخصوص، روی پلیت بسته می شود. پلیت ها

میزان گردش ویروس مربوط به این گروه سنی می باشد. به همین دلیل، این بیماری را فلج اطفال نیز می نامند. بسیاری از انتروویروس های غیر پولیویمی نیز از عوامل اصلی سندرم های مربوط به سیستم عصبی (CNS)، به ویژه AFP هستند. چون علائم فلج ناشی از انتروویروس های غیر پولیویمی مشابه فلج ایجاد شده توسط پولیو ویروس می باشد. تمایز بین این عوامل فقط در آزمایشگاه مقدور است (۳، ۱۰، ۸، ۱۱، ۱۲).

در ایران که یکی از اعضای منطقه مدیترانه شرقی (EMRO) است، به منظور ریشه کنی فلج اطفال در کشور از سال ۱۳۷۴ تا ۱۳۷۹، پنج دوره واکسیناسیون همگانی انجام شده است. در سال های ۱۹۹۶، ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸، به ترتیب ۱۲، ۱۳ و ۲ مورد پولیو ویروس وحشی از ایران جداسازی شده است. از آن سال به بعد، موارد گزارش پولیو به شدت کاهش یافته و از سال ۲۰۰۱ تاکنون هیچ ویروس وحشی جداسازی نشده است. با این وجود، در ایران سالانه موارد زیادی از AFP گزارش می شود و در سال ۲۰۰۳ تعداد آن به ۴۷۰ مورد رسیده است. تعداد قابل توجهی از این بیماران، به فلج باقیمانده (RP) مبتلا می شوند. یکی از احتمالات، نقش انتروویروس های غیر پولیویمی در ایجاد فلج می باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی نقش انتروویروس های غیر پولیویمی در ایجاد فلج سل حاد در ایران است.

مواد و روش ها

نمونه گیری و تیمار نمونه ها: نمونه ها از تمام بیماران مبتلا به AFP ایران در سال ۲۰۰۳ تهیه شدند. به این ترتیب که از زمان ۰ تا ۱۴ روز پس از شروع فلج، تعداد ۲ نمونه مدفوع با فاصله زمانی ۴۸-۲۴ ساعت تهیه شده (۷ و ۲۰) و در شرایط مناسب و در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه ارسال شدند. از طرف دیگر، شخص مبتلا برای مدت ۲ ماه (۶۰ روز) مورد پیگیری قرار می گیرد تا مشخص گردد که آیا فلج ایجاد می شود؟ یا خیر؟ مواردی که در این مدت همچنان فلج بوده اند، به عنوان فلج باقیمانده معرفی می شوند (۷). به منظور حذف باکتری ها و قارچ ها از نمونه های مدفوعی، ابتدا تمام نمونه ها تحت تیمار کلروفرم قرار می گیرند. به این ترتیب که: ۱- به هر یک گرم مدفوع ۹ ml فسفات بافرسالین (PBS) و ۱ ml کلروفرم افزوده می شود. ۲- خوب مخلوط می شود. ۳- لوله ها برای مدت ۳۰ دقیقه روی همزن برقی قرار می گیرند تا خوب مخلوط شود. ۴- سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه ۵- مایع شفاف رویی لوله، در

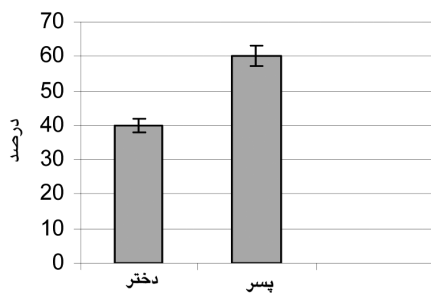
نوع ویروس	پولیوی واکسن	اکو	کوکساکسی	نامشخص	مجموع
تعداد	۱۲	۱۲	۵	۵	۳۴
درصد	۲/۶٪	۲/۶٪	۱/۱٪	۱/۱٪	۷/۴٪

نتایج

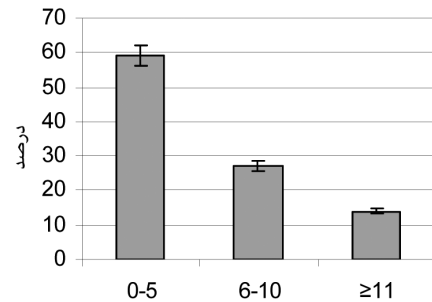
با تفکیک موارد ایجاد AFP سال ۲۰۰۳ به گروه های سنی، ۵-، ۶ تا ۱۰ سال و بالاتر از ۱۱ سال، مشخص شد که بیشترین موارد AFP در گروه سنی زیر ۵ سال وجود دارد (۵۹/۲٪)، به طوری که اختلاف معنی داری با سایر گروه ها نشان می دهد (نمودار ۱). دو گروه دیگر اختلاف معنی داری نسبت به یکدیگر نداشته اند. با تفکیک جنسی موارد مبتلا به AFP مشخص شد که بیشترین موارد AFP مربوط به کودکان پسر (۶۰٪) می باشد. (نمودار ۲) در این مورد نیز نسبت به دخترها اختلاف معنی داری وجود داشت.

نمونه های تیمار شده، به روش کشت سلولی و طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. تک تک نمونه های تیمار شده به دو لوله از هر یک از انواع سلول های RD، L20B، HEp2، GMK و VERO تلقیح شدند. لوله هایی که سلول های آن ها ریخته اند، به منظور بررسی وجود انتروویروس ها به روش نوترالیزاسیون آزمایش می شدند. در نهایت، از این تعداد نمونه، ۳۴ مورد انتروویروس جدا شد. به این ترتیب از ۷/۴٪ از بیماران مبتلا به AFP یکی از انواع انتروویروس ها جداسازی گردید (جدول ۱). نوع انتروویروس بر اساس تست نوترالیزاسیون (بولتن WHO) و به کمک آنتی سرم های اختصاصی مشخص گردید. از این تعداد، ۱۲ مورد پولیوی ویروس و ۲۲ مورد انتروویروس غیر پولیوی شناسایی گردید (جدول ۱). بیشترین ویروس های جدا شده، مربوط به پولیوی ویروس ها و اکو ویروس ها (هر دو با فراوانی ۲/۶۱٪) بود (جدول ۱)

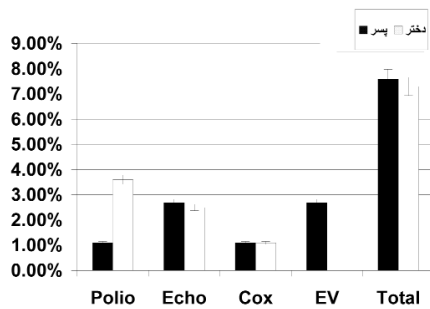
در انکوباتور $36^{\circ}C$ ننگه داری می شوند. این پلیت ها هر روز به روش میکروسکوپی مورد بررسی قرار می گیرند. زمانی که در حفره های کنترل ویروس مثبت CPE مشاهده شد، حفرات دارای سلول های سالم نشان دهنده نوترالیزه شدن ویروس مورد بررسی با آنتی سرم های اختصاصی خود می باشد. با استفاده از راهنمای WHO می توان سروتایپ انتروویروس را مشخص کرد. در صورت خنثی سازی ویروس مورد آزمایش با آنتی سرم های مجموع سه تایپ پولیوی (pool polio)، نمونه مورد نظر پولیوی ویروس است. اگر این نمونه ها با آنتی سرم های کوکساکسی B نوترالیزه شود، ویروس مورد بررسی یک کوکساکسی ویروس B می باشد. در مورد اکو ویروس ها معمولاً نوترالیزاسیون با دو نوع آنتی سرم از A تا G صورت می گیرد. اگر نمونه مورد نظر با هیچیک از این آنتی سرم ها نوترالیزه نشود، یا ویروس مورد نظر به صورت مخلوط می باشد یا اینکه انتروویروس غیر قابل تایپ کردن است. در صورتی که نمونه مورد نظر پولیوی ویروس باشد، برای تعیین سروتایپ آن از آنتی سرم های اختصاصی پولیوی ویروس استفاده می گردد. به این ترتیب که در دو حفره مخلوط آنتی سرم پولیوی ۱ و ۲ و ۳ و در دو حفره بعدی آنتی سرم پولیوی ۱ و ۲، در دو حفره دیگر آنتی سرم پولیوی ۱ و ۳ و در دو حفره آنتی سرم پولیوی ۲ و ۳ به میزان ۵۰ میکرو لیتر اضافه می شود. سپس ۵۰ میکرو لیتر از نمونه مورد نظر در همه حفرات افزوده شده و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در $36^{\circ}C$ درجه ۱۰۰ میکرو لیتر سلول L20B افزوده می شود. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون مربع کاری انجام شد. مرز معنی داری بر روی $p < 0.05$ قرار داده شد.



نمودار ۲) فراوانی موارد وقوع AFP بر اساس جنسیت



نمودار ۱) فراوانی موارد وقوع AFP در گروه های سنی مورد پژوهش

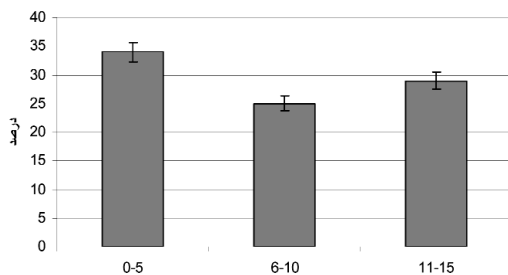


نمودار ۴) مقایسه نقش جنسیت در جداسازی انتروویروس ها از افراد مبتلا به AFP

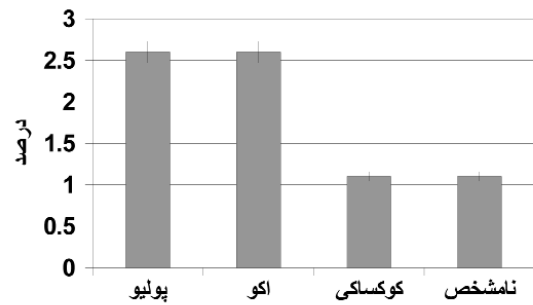
۱۱ سال، وضعیت موارد وقوع RP در این گروه ها مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۶). به این ترتیب مشاهده شد که در گروه سنی زیر پنج سال، در صورت ایجاد AFP، احتمال ایجاد فلج باقیمانده بیش از سایرین می باشد و این اختلاف کاملاً معنی دار بود. گروه سنی بالاتر از ۱۱ سال نیز اختلاف معنی داری را نسبت به گروه سنی ۶ تا ۱۰ سال نشان می دهد. همچنین، تفکیک جنسی افراد مبتلا به RP نشان داد. با وجود این که در پسر ها احتمال وقوع فلج باقیمانده از لحاظ عددی بیش از خانم ها است، اما اختلاف موجود معنی دار نمی باشد (نمودار ۷).

در نمودار ۸ نقش هر یک از گونه های انتروویروسی در ایجاد RP مورد بررسی قرار گرفته است. نشان داده شد که وقتی درصد کل موارد جداسازی انتروویروس های غیر پولیوی در گروه RP مثبت و RP منفی بررسی شوند، بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود خواهد داشت. درصد جداسازی ویروس پولیو و کوکساکسی نسبت به تعداد موارد RP، اختلاف معنی داری را با موارد جداسازی هر یک از این دو ویروس در افراد غیر مبتلا به RP نداشت. اما اکو ویروس ها از افراد RP مثبت بیش از افراد RP منفی جداسازی شد و اختلاف موجود در درصد موارد جداسازی انتروویروس ها در بین این دو گروه کاملاً معنی دار بود.

بحث



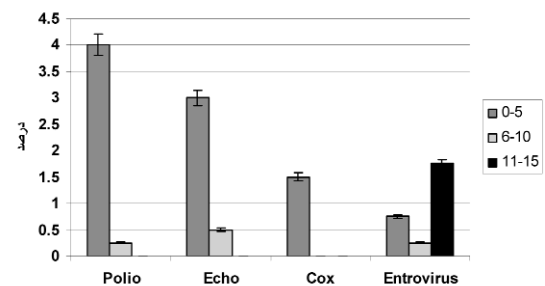
نمودار ۶) فراوانی وقوع RP در گروه های سنی مورد پژوهش



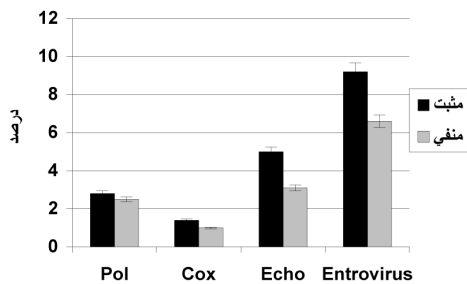
نمودار ۳) فراوانی جداسازی سروتیپ های انتروویروسی در موارد مبتلا به AFP

و این میزان اختلاف معنی داری را نسبت به کوکساکسی ویروس ها داشت (نمودار ۳).

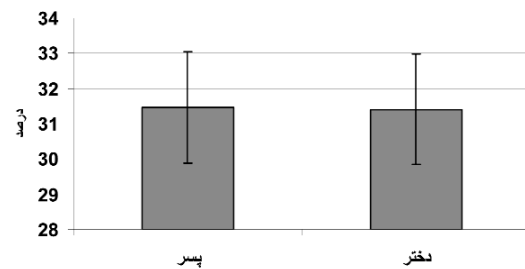
با بررسی تاثیر جنسیت بر نوع گونه های انتروویروسی جداسازی شده مشخص شد که جنسیت در کل هیچ تاثیری بر جداسازی انتروویروس ها ندارد (نمودار ۴). همچنین، با تفکیک سنین مختلف موارد جداسازی انتروویروس ها (نمودار ۵) مشخص شد که بیشترین موارد جداسازی انتروویروس ها مربوط به گروه سنی زیر پنج سال است. تعداد موارد جداسازی انتروویروس ها در میان این گروه سنی اختلاف معنی داری را نسبت به دو گروه سنی دیگر داشت. درصد موارد جداسازی انتروویروس ها در میان دو گروه سنی ۶-۱۰ سال و بالاتر از ۱۵ سال نیز دارای اختلاف معنی داری نسبت به یکدیگر بود. لازم به یادآوری است که از بین موارد AFP شناخته شده، گروهی از بیماران پس از گذشت ۲ ماه یا بیشتر، همچنان در یک یا چند اندام خود علائم فلج را نشان می دهند. به این موارد، اصطلاحاً فلج باقیمانده یا RP (Residual paralysis) گفته می شود. در این پژوهش مشخص شد که از میان موارد AFP مربوط به سال ۲۰۰۳، تعداد ۱۴۲ کودک همچنان پس از گذشت دو ماه در یک یا چند عضو خود فلج را نشان می دادند. به این ترتیب در سال ۲۰۰۳ در کل ۳۱ درصد افراد به RP مبتلا شده اند. با تفکیک سنی موارد RP به سه گروه ۰-۵ سال، ۶ تا ۱۰ سال و بالاتر از



نمودار ۵) فراوانی موارد جداسازی انتروویروس ها در سنین مختلف



نمودار (۸) مقایسه نقش انتروویروس های جدا شده در ایجاد RP



نمودار (۷) درصد موارد وقوع RP بر اساس جنسیت

این بررسی متوجه شدیم اکو ویروس ها می توانند در ایجاد فلج باقیمانده در کودکان زیر ۵ سال ایران نقش داشته باشند. زیرا اختلاف معنی داری در موارد جداسازی اکو ویروس ها بین افراد مبتلا به RP و افراد غیر درگیر وجود داشت. این مطلب از ارزش بالایی برخوردار می باشد زیرا اولین گام در مبارزه با یک بیماری، شناسایی عامل یا عوامل ایجاد آن بیماری است. حال که مشخص شده است انتروویروس ها و به طور خاص، اکو ویروس ها در ایجاد فلج در ایران نقش مهمی دارند، می توان تدابیر لازم برای از بین بردن فلج های ناشی از آن ها را به کار برد. از جمله این تدابیر می توان به تهیه واکسن های مناسب یا کاربرد دارو ها در زمان شیوع بیماری اشاره نمود.

پیشنهادات

- ۱- استفاده از سایر رده های سلولی و تعیین حساسیت آن ها برای جداسازی انتروویروس ها.
- ۲- استفاده از روش RT-PCR به طور روتین در شناسایی انتروویروس ها در نمونه های مدفوعی افراد مبتلا به AFP.
- ۳- بررسی نقش سایر عوامل ایجاد کننده AFP در ایران.

AFP یکی از گرفتاری های بهداشتی ایران و جهان است، به طوری که سالانه به طور متوسط ۴۵۰ مورد AFP در ایران گزارش می گردد. در سال ۲۰۰۳ در کل ۴۵۸ مورد بیمار مبتلا به AFP در ایران گزارش شده است. با همکاری بخش مبارزه با بیماری های عفونی وزارت محترم بهداشت و توسط مراکز بهداشت، از هر یک از این بیماران در سرتاسر ایران دو نمونه مدفوع تهیه می شود و تحت شرایط سرمای مناسب به آزمایشگاه اختصاصی فلج اطفال، واقع در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران ارسال می گردد. این مرکز تحت نظارت مستقیم سازمان بهداشت جهانی (WHO) است. این دو نمونه مدفوع با فاصله زمانی یک روز، از بیماران مشکوک به AFP تهیه شده است. ما با تفکیک و مقایسه موارد جداسازی سروتیپ های مختلف انتروویروس ها در افراد RP مثبت و RP منفی به نتایج زیر دست یافتیم:

۱. اختلاف معنی داری در تعداد موارد جداسازی پولیو ویروس واکسن در افراد مبتلا به RP و افراد غیر مبتلا وجود نداشت. این قضیه از ارزش زیادی برخوردار می باشد. زیرا نشان داده است واکسن های OPV مورد استفاده در کشور از ایمنی کافی برای استفاده برخوردار می باشد. باید توجه داشت که واکسن های OPV قادرند یک کودک در هر هشتصد هزار کودک واکسینه شده را به فلج مبتلا کند (۷).

۲. مشخص شد که موارد جداسازی کوکساکسی ویروس ها در نمونه های بالینی نیز بین افراد مبتلا به RP و افراد غیر مبتلا دارای اختلاف معنی داری نیست. با این حال باید توجه داشت که کوکساکسی ویروس ها از جمله عوامل ایجاد کننده فلج در انسان می باشند (۲، ۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳).

۳) اکو ویروس ها نیز جزء ویروس هایی هستند که گزارش های فراوانی از سرتاسر دنیا در مورد نقش آن ها در ایجاد فلج ارائه شده است (۲، ۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). ما نیز در

References

- 1- AFP surveillance(2002); see in: [www. Delhihealth.com/ family/ afp.htm](http://www.Delhihealth.com/family/afp.htm)4-Acute flaccid paralysis syndrome Associated with West Nile Virus infection- Mississippi & Louisiana, July - August; MMWR; Sep20, 51 (37), 825-28; see in CDC/mwr/preview/mmwrhtml/mm5137a1.htm.
- 2- Center for disease control & prevention, Progress toward global eradication of poliomyelitis, January 2003 - April 2004. MMWR, Jun 25, 2004; 53: 532-35.
- 3- Chomel J.J., Automa D., Thonvenot D., Lina B. (2003), Three Echovirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitides in Rhom-Alpes Region- France; Euro J. Clin. Microb. Infec. Dis. 22: 191-93.
- 4- Chnmaitree T., Menegus M.A., Schervish-swierhosz E.M., Schwalenstocker Ellen(1981); Entrovirus 71 infection: report of an outbreak with two cases of paralysis & a review of the literature; Pediatrcs, Vol. 67.No4, April: 489-493.
- 5- Da Silva E.E., Winkler M.T., Pallansch M.A. (1996); Role of Entrovirus 71 in acute flaccid paralysis after the eradication of poliovirus in Brazil; Emerging infectious disease, Vol.2, No3.Jul-Sep, 231-33.
- 6- Davan S. (1999); Deaths among children during an outbreak of hand, foot & mouth disease, Taiwan, Republic of China, April-July, 1998; Archives of Dermatology, Jan; 135,102-103.
- 7- Doudle W.R., Gourville E.D., Kew O.M., Pallansch M.A., Wood D. (2003); polio eradication: The OPV paradox; Rev. Med. Virol. ; 13,277-91.
- 8- Darussalam B. (2001), Eradication of Poliomyelitis in the region, Regional committee, 52 Session, Sep.
- 9- Dowdle W.(2003); Hispaniela outbreak provides valuable lessons, Polio lab network quality Update, Vol.VII, Issue 2. 22- Echovirus type 13 -United States 2001; MMWR; Sep; 14; 2001/50 (36) 777-80.
- 10- Hull H.F., Aylward R.B. (2001); Progress toward global polio eradication; Vaccine, 19,4378-84.
- 11- Lin T., Chang L., Hsia S., Huang Y., Chiu C., Hsuch C., Shih R., Liu C., Wow M. (2002); The 1998 Entrovirus 71 outbreak in Taiwan; Pathogenesis & management; CID: 34(Supplez) 52-7.
- 12- Manual for the Virological investigation of poliomyelitis; Global poliomyelitis eradication by the year 2000. Editor by EPI & WHO.
- 13-Mc minn P., Stratov I, Nagarajan L., Davis S. (2001); Neurological manifestations of Entrovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot & mouth disease in western Australia; CID;32(15 Jan), 236-242.