بررسی اپیدمیولوژیک عفونت روتاویروس در کودکان کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی ، سال ۴-۱۳۸۳

دکتر مهناز طارمی[۱*]، دکتر فیروزه فرحتاج[۲]،دکتر لطیف گچکار[۳]، هاله عدالتخواه[۴]، معصومه عظیمی راد[۵]، دکتر محمد رضا زالی[۶]، دکتر احمد فیاض[۷]

۱. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری ـ سرپرست دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. دکترای علوم آزمایشگاهی ـ انستیتو پاستور
۳. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری ، دانشیار مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی وگرمسیری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. کارشناس میکروبیولوژی ـ آزمایشگاه دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵. فوق دیپلم آزمایشگاه ـ آزمایشگاه دایره تحقیقات بیماریهای ناشی از غذا، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۶. فوق تخصص بیماریهای گوارش و کبد ، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد
۷. رییس بخش تحقیقات و مرکز رفرانس‌هاری و مدیر گروه ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران

* آدرس برای مکاتبه: تهران ـ خیابان اوین ـ خیابان تابناک ـ بیمارستان طالقانی ـ مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تلفن:۲۲۴۱۹۷۶۹ ، فاکس: ۲۲۴۰۲۶۳۹ mmtaremi@yahoo.com
دریافت مقاله: مرداد هشتاد و چهار پذیرش برای چاپ: آبان هشتاد و چهار

چکیده

سابقه و هدف: *روتاویروسها از شایع‌ترین علل گاستروانتریت شدید در کودکان زیر ۵ سال می‌باشند. هدف از این مطالعه تعیین شیوع گاستروانتریت گروه A روتاویروسی و تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های شایع بدست آمده در کودکان مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی تهران است.*

مواد و روش‌ها: *۳۷۲ نمونه اسهالی از کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد که به بیمارستان مرکز طبی مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد . نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه منتقل و مورد آزمایش الایزا جهت تعیین آنتی‌ژن روتاویروس گروه A قرار گرفتند. سپس نمونه‌های مثبت جهت تعیین G ژنوتیپ با استفاده از RT-PCR و تنوع ژنتیکی به وسیله RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *از ۳۷۲ نمونه مورد بررسی، ۹۴ نمونه از نظر آنتی‌ژن روتاویروس گروه A مثبت بود، شیوع عفونت روتاویروس در جمعیت ما (۲۹/۷٪-۲۰/۹٪ :CI ۹۵٪) ۲۵/۳٪ بود. ۴۹ نمونه از نمونه‌های مثبت با توجه به دارا بودن مقادیر کافی RNA برای تعیین G ژنوتیپ مورد آزمایش RT-PCR قرار گرفتند که از این تعداد ۲۹ نمونه G1 گزارش گردید و ۲۰ نمونه untypable بود. تعدادی از سویه‌های تایپ نشده سکانس گردید که با مقایسه آنها با سویه‌های موجود در بانک ژن جهانی، ۹۸٪ همولوژی با ژنوتیپ G9 نشان داد. نتایج RFLP نشان داد که سویه‌های مورد مطالعه ۳۳ الگوی RFLP ترکیبی گوناگون ایجاد کردند. اسهال آبکی (۹۲/۶٪)، استفراغ (۷۳/۴٪) و تب (۶۴/۹٪) شایع‌ترین علایم بودند. ۷ نفر از مبتلایان به عفونت روتاویروس دارای دهیدراتاسیون شدید بودند. چنین وضعیتی در گروه غیر مبتلا به این عفونت دیده نشد (p<۰/۰۰۰۱). عفونت روتاویروسی عمدتاً در کودکان کمتر از ۲ سال، با شیوع بیشتر در گروه سنی ۲-۱ سال (۴۰٪)، دیده شد. شیوع عفونت روتاویروسی در فصل زمستان (۴۶/۲٪) بیش از ماههای خشک و گرم تابستان (۸/۸٪) بود. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه مقطعی، شیوع بالایی از عفونت روتاویروس را در جمعیتی از کودکان ایرانی همراه با تنوع ژنتیکی بسیار زیاد در شایعترین سروتیپ در گردش جامعه (G1) نشان می‌دهد.*

واژگان کلیدی: ***روتاویروس، اپیدمیولوژی، RT-PCR, RFLP,ELISA، تهران***

مقدمه

در سال ۱۹۷۶ Jane Rokide اسهال را به عنوان اولین عامل کشنده نوزادان و کودکان در کشورهای درحال توسعه معرفی کرد(۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی سالانه حدود یک میلیون مورد اسهال در کودکان تخمین زده شده که در این میان ۳/۳ میلیون مورد مرگ و میر گزارش شده است(۲).

همچنین به دنبال مطالعه گسترده دیگری که در سال ۱۹۹۹ در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه انجام گرفت، میزان مرگ و میر در اثر اسهال، دو میلیون و دویست هزار نفر گزارش شد(۳).

Archive of SID
www.SID.ir

در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین، هر سال ۴۵۰ میلیون مورد اسهال در کودکان زیر ۵ سال رخ می‌دهد که ۴-۱ درصد این موارد به مرگ منتهی می‌شود(۴،۵). عوامل زیادی سبب گاستروانتریت در انسان می‌شود از جمله آنها می‌توان به باکتریها، ویروسها و انگل‌ها اشاره کرد. ویروس‌ها بالغ بر ۴۰٪ اسهال‌های شدید عفونی را در کشورهای در حال توسعه تشکیل می‌دهند(۳).

گاستروانتریت حاد یک بیماری شایع در کودکان و نوزادان می‌باشد. دهیدراتاسیون حاصل از آن یک علت مهم بستری کودکان در کشورهای توسعه یافته و یک علت بزرگ مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. ویروسهای روده‌ای به عنوان یک عامل مهم بیماری اسهالی در کودکان و نیز از عوامل مهم اپیدمی‌های بیماریهای ناشی از غذا در تمام سنین محسوب می‌شوند. چهار گروه شایع شناخته شده ویروسها ۱) روتاویروس A ۲)نورویروس‌ها ۳) آدنوویروس۴۰ و ۴۱ ۴) وآسترویروس‌ها می‌باشند. در این میان روتاویروس‌ها شایع‌ترین علت گاستروانتریت ویروسی در نوزادان و کودکان بوده و بعد از آن آدنوویروسها قرار دارند. روتاویروسها عامل اسهال شدید در نوزادان و کودکان در تمام جهان می‌باشد، در ایالات متحده آمریکا، روتاویروسها سالانه عامل ۵۰۰ هزار ویزیت پزشک، ۵۰ هزار موارد بستری و ۲۰ تا ۴۰ مورد مرگ کودکان و نوزادان مبتلا به اسهال است و خسارت اقتصادی ناشی از بیماری فراتر از یک میلیون دلار تخمین زده شده است(۶). در کشورهای در حال توسعه روتاویروس‌ها عامل سالانه ۴۸۰ هزار تا ۶۴۰ هزار مرگ در کودکان است. این مقدار ۲۰٪ از ۲/۴ تا ۳/۲ میلیون مرگ و میر در اثر کل اسهال‌های عفونی را در بر می‌گیرد(۷).

گزارشات محدودی حاکی از شیوع بالای این ویروس در ایران است(۱۱-۸). مرگ و میر کودکان کمتر از ۵ سال در ایران ۶۴/۱۰۰۰ نفر در سال تخمین زده شده است که از این مقدار، ۱۰۸۸۰ مرگ و میر ناشی از اسهال و ۲۷۲۰ مورد آن مرگ و میر ناشی از روتاویروس تخمین زده شده است(۱۲). این آمار بیانگر نقش مهم روتاویروس در ایجاد اسهال در کودکان کشور ما می‌باشد و با توجه به این که شیوع روتاویروس با بهبود وضعیت بهداشتی تغییر نمی‌یابد و این عفونت در هر دو جوامع فقیر و غنی دیده می‌شود, تنها راه کاهش شیوع عفونت روتاویروس تهیه واکسن مربوطه و استفاده از آن در جوامعی است که شیوع عفونت روتاویروس بالا است. جهت تهیه واکسن موثر نیاز به اطلاعات کافی در زمینه سروتایپ‌های شایع روتاویروس و تنوع ژنتیکی آن در کشور می‌باشد.

با توجه به تعداد کم مطالعات موجود در ایران، تصمیم گرفته شد مطالعه‌ای جهت تعیین شیوع عفونت روتاویروس در کودکان مساوی و کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی در طی یکسال ۸۴-۸۳ صورت گیرد تا بدین وسیله شیوع عفونت فوق، ژنوتیپ‌های شایع در جامعه مورد بررسی و شیوع فصلی عفونت روتاویروس تعیین گردد. سپس با استفاده از تکنیک مولکولی دقیق RFLP اطلاعات ژنتیکی روتاویروسهای بدست آمده در بین کودکان ایرانی تعیین شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه فوق به روش توصیفی ـ مقطعی انجام گرفت. کلیه کودکان مساوی و یا کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی در طی یکسال ۴-۱۳۸۳ وارد مطالعه شده و از هر بیمار فقط یک نمونه مدفوع تازه گرفته شده و پرسشنامه‌ای حاوی اطلاعات دموگرافیک و مورد نظر به روش مصاحبه با والدین کودک و گاه با مراجعه به پرونده پزشکی کودکان (در صورت بستری) تکمیل گردید. نمونه مدفوع پس از جمع‌آوری در ظروف در بسته بلافاصله با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه دایره تحقیقاتی بیماریهای ناشی از غذا، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل و بلافاصله آزمایش سنجش آنتی ژن روتاویروس در نمونه‌های مدفوع به روش الایزا و با استفاده از کیت الایزا (DAKO,UK) مطابق با دستورالعمل مربوط انجام شد. (حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۹/۲٪) نمونه‌های مثبت تا زمان بررسی مولکولی به روش-RFLP,RT PCR در شرایط c° ۷۰- نگهداری شدند. برای تعیین ژنوتیپ‌های G نمونه‌های روتاویروس مثبت, در ابتدا، ژنوم دو رشته‌ای ویروس روتا توسط کیت‌های استخراج RNA به نام QIA-AMP Viral RNA Mini Kit و نیز توسط محلول استخراج RNA شرکت سیناژن (RNX Plus) با بکارگیری پروتکل‌های نوشته شده توسط شرکتهای مذکور، استخراج گردید. سپس RNA تخلیص شده جهت انجام تست RT-PCR به منظور ازدیاد (Amplification) قطعه bp ۱۰۶۲(جفت

Archive of SID

www.SID.ir

بازی) از ژن کد کننده پروتئین ویروسی VP7 استفاده گردید. برای این منظور از پرایمرهای اختصاصی ژن مذکور به نام End 9 و Beg 9 استفاده شد. قطعه تکثیر یافته پس از قرار گرفتن در آگارز ژل معمولی با غلظت ۱/۵٪، الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل داکیومنت مشاهده و مورد تائید قرار گرفت. (پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از: پرایمرهای RVg9 , aBT1(G1), aCT2(G2), aET3(G3), aDT4(G4), aAT8(G8), aFT9(G9), ET10(G10), BT11(G11), SBeg9, FT5(G5), DT6(G6)). برای انجامRFLPهریک از محصول‌های PCR بدست آمده از سویه‌های مختلف استخراج شده از نمونه‌های مدفوع ارسالی، تحت اثر آنزیم‌های محدودالاثر (Restriction Enzyme) به نام‌های RsaI ، AluI وEcoRV قرار گرفتند. بدین منظور، مقدار یک واحد از آنزیم‌های فوق را به مدت یکساعت و نیم در درمای ۳۷ درجه سانتیگراد در مجاورت محصول PCR بدست آمده از مرحله قبلی قرار دادند. سپس حاصل هضم آنزیمی در ژل آگارز معمولی با غلظت ۲٪ و توسط دستگاه ژل داکیومنت مشاهده و عکسبرداری شد. عکس‌های بدست آمده توسط برنامه نرم‌افزاری Photo Cap مورد آنالیز قرار گرفته و باندهای حاصله توسط برش آنزیمی توسط برنامه فوق محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ انجام شد. از آزمون مربع کای یا تست دقیق فیشر جهت ارزیابی ارتباط احتمالی عفونت روتاویروس با متغییرهای دموگرافیک استفاده شد. در تمامی موارد تجزیه و تحلیل آماری وقتی $p<۰/۰۵$ بود ارتباط معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

از آذر ماه ۱۳۸۳ لغایت آبان ماه ۱۳۸۴، تعداد ۳۷۲ نمونه اسهالی (برابر با تعداد کودکانی که وارد مطالعه شدند) از کودکان مساوی یا کمتر از ۵ سال مبتلا به گاستروانتریت حاد مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران جمع‌آوری گردید. از این تعداد، ۱۶۷ نفر دختر (۴۴/۹٪) و ۲۰۵ نفر پسر بودند (۵۵/۱٪). براساس شدت بیماری، ۱۱۹ نفر از بیماران بستری شده و ۲۵۳ نفر به صورت سرپایی معالجه شدند. میانه و میانگین سن جمعیت مورد مطالعه به ترتیب ۱۸/۱۱ و ۱۱ ماه بود. از کل ۳۷۲ نمونه جمع‌آوری شده و بررسی آنها به روش الایزا جهت تشخیص آنتی‌ژن روتاویروس گروه A، ۹۴ مورد (۲۵/۳٪) از نظر روتاویروس مثبت تشخیص داده شدند که بر این اساس شیوع عفونت روتاویروسی در جمعیت ما (۲۹/۷٪ - ۲۰/۹٪ : CI ۹۵٪) ۲۵/۳٪ بود.

۴۹ نمونه از نمونه‌های مثبت با توجه به دارا بودن مقادیر کافی RNA برای ارزیابی بیشتر مولکولی مورد آزمایش RT-PCR جهت تعیین سروتیپ‌های شایع G قرار گرفتند که از این تعداد ۲۹ نمونهG1 گزارش گردید و ۲۰ نمونه با هیچ کدام از پرایمرهای مورد استفاده واکنش نشان ندادند. تعدادی از سویه‌های تایپ نشده جهت تعیین توالی نوکلئوتیدهای آن و تعیین ژنوتیپ مربوطه سکانس گردید که با مقایسه آنها با سویه‌های موجود در بانک ژن جهانی ۹۸٪ با ژنوتیپ G9 همولوژی نشان داد. (۱۹/۳٪) ۲۳ نفر از ۱۱۹ کودک بستری و (۲۸/۱٪) ۷۱ نفر از ۲۵۳ بیمار سرپایی به عفونت روتاویروسی مبتلا بودند ($p <۰/۰۴۵$).

در کودکان با و بدون عفونت روتاویروسی به ترتیب اسهال آبکی در ۸۴ و ۲۲۵ نفر ($p <۰/۰۴$)، استفراغ در ۶۹ و۱۳۰ نفر ($P <۰/۰۰۰۱$) و تب در ۶۱ و ۱۱۴ نفر ($p <۰/۰۰۰۱$) دیده شد. ۷ نفر از مبتلایان به عفونت روتاویروسی دارای دهیدراتاسیون شدید بودند. چنین وضعیتی در گروه غیرمبتلا به این عفونت دیده نشد ($p <۰/۰۰۰۱$).

روتاویروس با شیوع بیشتر در فصل زمستان (۱۸/۳۹ و ۴۶/۲٪) دیده شد تا در ماههای خشک و گرم سال (۱۰/۱۱۳ و ۸/۸٪) و این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$).

در میان ۳۷۲ بیمار مبتلا به گاستروانتریت حاد، رابطه نوع تغذیه و اسهال روتاویروس نیز مورد بررسی قرار گرفت، که در کودکانی که از شیر مادر استفاده کردند (n= ۳۳۲) شیوع عفونت روتاویروس ۲۴/۴٪ بوده و در گروهی که از شیر خشک استفاده کردند (n= ۴۰) این میزان ۳۲/۵٪ بود که تفاوت فوق از نظر آماری معنی‌دار نبود.

عفونت روتاویروس عمدتاً در کودکان کمتر از ۲ سال دیده شد که بالاترین شیوع در بین گروه سنی ۲-۱ سال (۴۰٪) ملاحظه گردید. توزیع سنی عفونت روتاویروس در کودکان مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

از ۱۷۶ دختر مورد مطالعه ۴۱ نفر و از ۲۰۵ پسر ۵۳ نفر به عفونت روتاویروسی مبتلا بودند. اختلاف مشاهده شده به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

Archive of SID

www.SID.ir

پروفایل(الگوی) آنزیمی بدست آمده از هریک از آنزیمهای محدودالاثر به صورت R(RsaI)، A(AluI) و E(EcoRV) و بر اساس اندازه قطعات حاصله از هضم آنزیمی محصول RT-PCR بدست آمده از ازدیاد (Amplification) پروتئین کپسیدی VP7 در جدول شماره ۲ آورده شده است.

تمامی آنزیم‌های بکار رفته شده قادر به هضم قطعه ژن VP7 بوده که این امر می‌تواند بیانگر حساسیت روش RFLP بکار رفته شده در شناسائی پلی مورفیسم نوکلئوتیدی در سویه‌های به ظاهر یکسان می‌باشد.

حاصل برش آنزیم RsaI بروی قطعه ژن VP7، ۵ الگو(طرح) متفاوت ایجاد کرده است که به ترتیب به صورت R5,R4,R3,R2,R1 نوشته شده است. به همین ترتیب برای آنزیم EcoRV ۴ الگوی متفاوت (به صورت E1 تا E4) و برای آنزیم Alu I ۱۰ الگوی مختلف (به صورت A1 تا A10) بیان گردیده است.

بوده (۳۳٪) و با ایجاد انواع بیشتری از الگوها (از A1 تا A10) در مقایسه با ژنوتیپ G9، از تنوع بیشتری با این آنزیم برخوردار بوده است. البته در بعضی موارد نیز، یک الگوی آنزیمی در هر یک از الگوهای آنزیمی مطرح شده، غالباً یک ژنوتیپ خاص دخیل می‌باشد یا به عبارت دیگر یک ژنوتیپ خاص می‌تواند طرح‌های آنزیمی متفاوتی را از خود نشان دهد.

الگوهای ایجادشده توسط آنزیم RsaI نشان می‌دهد که ژنوتیپ G1 غالباً قادر به ایجاد طرح R1(۵۵/۵٪)، R2 (۲۵٪) و R3 (۵/۶٪) توسط آنزیم مذکور بوده است. این در حالی است که ژنوتیپG9، الگوهای R4(۵/۶٪) و R5(۸/۳٪) را از خود نشان می‌دهد. این امر می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی بسیار زیاد در ژنوتیپ‌های G1 باشد.

در الگوهای ایجاد شده توسط آنزیم EcoRV ژنوتیپ G1 غالباً طرحE1 را از خود نشان داده (۸۳٪) و ژنوتیپ G9 اکثراً الگوی E4 را مطرح می‌سازد(۸٪). البته تعداد کمی از ژنوتیپ‌های G9 قادر به ارائه الگوی E3 نیز بوده‌اند.

آنالیز حاصله از الگوهای بدست آمده با آنزیم Alu I نشان می‌دهد که ژنوتیپ G1 غالباً قادر به ایجاد طرح A8 مشخص (نظیرA3 و یاA4) توسط هردوژنوتیپ G1 وG9 ایجاد گردیده است که این امر می‌تواند بیانگر عفونتهای همزمان و یا عفونتهای مخلوط با دوژنوتیپ مختلف باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توزیع فراوانی عفونت روتاویروس برحسب گروه سنی در کودکان مساوی و یا کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی ۴-۱۳۸۳

گروه سنی (ماه)	موارد روتاویروس مثبت		موارد روتاویروس منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۰-۶	۱۹	۱۵/۸	۱۰۱	۸۴/۲	۱۲۰	۱۰۰
۷-۱۲	۳۴	۳۴/۷	۶۴	۶۵/۳	۹۸	۱۰۰
۱۳-۱۸	۱۷	۳۷/۸	۲۸	۶۲/۲	۴۵	۱۰۰
۱۹-۲۴	۹	۴۵	۱۱	۵۵	۲۰	۱۰۰
۲۵-۳۶	۹	۲۴/۳	۲۸	۷۵/۷	۳۷	۱۰۰
۳۷-۴۸	۳	۱۲/۵	۲۱	۸۷/۵	۲۴	۱۰۰
۴۹-۶۰	۳	۱۰/۷	۲۵	۸۹/۳	۲۸	۱۰۰

جدول ۲- الگوی آنزیمی سویه های مختلف روتاویروسی ایزوله شده با در نظرگرفتن ژنوتیپ و فراوانی هریک از الگوها، بیمارستان مرکز طبی، ۴-۱۳۸۳

الگوی آنزیمی (Enzyme Profile)	قطعات حاصله ازبرش آنزیمی	ژنوتیپ سویه	فراوانی
R1	۱۷۵و۲۰۲و۲۸۸و۳۲۸و۴۸۸و۶۸۸و۸۴۰	G1	٪ ۵۵/۵
R2	۱۶۹و۱۹۶و۳۱۷و۳۵۳	G1	٪۲۵
R3	۸۳و۱۴۴و۲۲۰و۲۶۷و۳۰۵و۴۵۶و۶۰۰	G1	٪۵/۶
R4	۱۶۹و۲۸۲و۴۸۴	G9	٪۵/۶
R5	۱۶۰و۲۳۹و۲۹۷و۴۸۶	G9	٪۸/۳
E1	۴۷۶و۵۳۶	G1	٪۸۳
E2	۱۹۵و۳۴۰و۴۷۲و۵۴۰	G1	٪۶
E3	۱۲۳و۱۵۹و۳۰۰و۴۳۲	G9	٪۳
E4	۱۰۸و۲۰۱و۳۵۲و۴۸۳و۵۳۴و۶۹۷	G9	٪۸
A1	۴۵۸و۴۹۷و۵۴۸	G9	٪۶
A2	۴۷۴و۵۱۸و۵۷۵و۶۲۵	G9	٪۳
A3	۴۱۴و۴۵۴و۵۰۹	G1,G9	٪۱۱/۱
A4	۲۰۰و۳۳۵	G1,G9	٪۱۳/۸
A5	۱۶۲و۲۰۰و۲۴۱و۳۱۷	G1	٪۸
A6	۲۲۵و۳۲۷و۴۴۵و۵۱۷و۷۲۸	G1	٪۱۳/۸
A7	۱۶۴و۱۹۲و۲۱۲و۳۲۷و۵۴۸و۷۷۰	G1	٪۲/۷
A8	۱۱۵و۱۸۶و۲۱۴و۲۳۴و۳۵۶	G1	٪۳۳
A9	۱۱۸و۱۵۷و۲۰۲و۳۱۹و۳۴۲و۴۸۴و۵۴۴	G1	٪۵/۶
A10	۵۸و۷۰و۱۱۲و۱۶۱و۱۸۶و۲۰۵و۲۴۵و۳۲۲و۴۷۴و۵۳۷	G1	٪۳

Archive of SID

www.SID.ir

در کل سویه‌های مورد مطالعه در این بررسی توانستند ۳۳ الگوی RFLP ترکیبی(Combined RFLP Pattern) گوناگون را ارائه نمایند که طرح هر یک از آنها و فراوانی مربوط در جدول شماره ۳ آورده شده است.

جدول ۳- الگوهای ترکیبی RFLP حاصل ازآنزیمهای مختلف برای سویه‌های مختلف روتا ویروسی و فراوانی آنها، بیمارستان مرکز طبی. ۴-۱۳۸۳

الگوی ترکیبی RFLP	فراوانی
R1E1A6	15%
R1E1A7	3%
R2E1A8	6%
R1E1A4	9%
R2E1A5	9%
R2E1A10	3%
R2E1A4	3%
R1E1A9	6%
R3E2A3	6%
R4E3A3	3%
R4E1A2	3%
R5E4A3	3%
R5E4A1	6%
R1E1A8	25%

باتوجه به جدول فوق، الگوی R1E1A8 شایع‌ترین فرم ارایه شده در این مطالعه بوده است که از آنالیز RFLP ترکیبی سویه‌ها حاصل می‌شود.

بحث

روتاویروس‌ها از عوامل گاستروانتریت ویروسی در نوزادان و کودکان و به عنوان یکی از بیماریهای مهم کودکان در تمام دنیا محسوب می‌شود که ابتلاء زیادی در کشورهای توسعه یافته و مرگ و میر فراوانی را در کشورهای در حال توسعه باعث می‌شود(۱۳). در تشخیص عفونت روتاویروس روش‌های آزمایشگاهی متفاوتی وجود دارد از جمله ۱- مشاهده ذرات ویروسی بوسیله میکروسکوپ الکترونی ۲- استخراج RNA ویروس از مدفوع بیمار و الکتروفورز آن در ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره ۳- الیزا (ELISA) ۴- لاتکس آگلوسیتانسیون(۱۴).

در این بررسی با استفاده از روش الیزا ۳۷۲ نمونه مدفوع کودکان مساوی و کمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال حاد مورد آزمایش قرار گرفت و ۲۵/۳٪ مثبت تشخیص داده شد که به یافته‌های مطالعات انجام شده در سالهای گذشته در تهران (۳۷٪ سال ۹-۱۳۷۸ با روش الایزا) (۱۵)، زاهدان (۲۹/۲٪ سال ۱۳۷۱ با روش الایزا) (۹)، شیراز (۱۱/۴٪ سال ۱۳۷۹ با روش میکروسکپ الکترونی)(۱۰) اهواز (۲۹/۵٪ سال ۱۳۸۱ با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزیس) (۱۱) و نیز آمار بدست آمده از سایر کشورها مانند پاراگوئه (۳۱/۸٪ با روش الایزا) (۱۶)، آفریقای جنوبی (۳۲٪ با روش الایزا)(۱۷)، کامرون (۲۱/۹٪ با روش الایزا)(۱۸) نزدیک است.

روتاویروس‌ها بر اساس خصوصیات آنتی‌ژنتیکی پروتئین لایه میانی کپسید خود به نام VP6 به چند گروه تقسیم می‌شوند که تنها گروه‌های A-B-C از نظر بیماری‌زایی برای انسان اهمیت دارند. عامل ۹۸٪ اسهال‌های روتاویروس در تمام دنیا گروه A روتاویروس می‌باشد(۱۹).

در مطالعه ما بیشترین میزان عفونت روتاویروس مربوط به گروه سنی ۲۴-۱۹ ماهه و کمترین میزان عفونت در گروه سنی ۶۰-۴۹ ماهه دیده شد که مشابه است با مطالعه‌ای که در سال ۱۳۷۳ در شهر تهران انجام شد و در آن بالاترین میزان عفونت روتاویروس در گروه سنی کمتر از ۲۴ ماه با میزان ۱۹/۷٪ در مقایسه با میزان شیوع ۵/۱٪ در گروه سنی بالاتر از دو سال گذشته گزارش شد(۹). آمار ما همچنین مشابه با آمار ارائه شده در سایر کشورها (هندوستان ۱۹۸۲)(۲۰)، (ایتالیا ۱۹۹۸)(۲۱) می‌باشد.

به نظر می‌رسد که پایین بودن میزان عفونت در نوزادان کمتر از ۶ ماه به علت دریافت آنتی‌بادی مادری قبل از تولد بود و این آنتی‌بادی تا حدود ۶ ماه نوزاد را در برابر عفونت روتاویروس شدید مصون می‌دارد زیرا مادران آنتی‌بادی علیه روتاویروس‌ها را که در نتیجه عفونت‌های قبلی کسب کرده‌اند به نوزادان منتقل می‌کنند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که افزایش میزان عفونت در کودکان زیر ۲ سال به علت کاهش سطح پروتئاز در مجرای گوارش و همچنین کم بودن موسین در روده کودکان می‌باشد در نتیجه روتاویروس‌ها راحت تر به انتروسیت‌های روده وارد شده و عفونت روتاویروس ایجاد می‌کنند(۱۳).

در مطالعه ما در مورد رابطه جنس و ابتلاء به عفونت روتاویروس اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که مشابه با سایر مطالعات انجام شده است(۹،۱۱). با توجه به مطالعاتی که در دهه ۱۹۸۰ توسط محققان متعددی صورت گرفته ارتباطی بین

Archive of SID

www.SID.ir

جنس و عفونت روتاویروس دیده نمی‌شود و شیوع این عفونت در هر دو جنس تا حدی مشابه است(۴).

در بررسی حاضر بین نوع تغذیه کودک (شیر مادر، شیر خشک) و ابتلا به عفونت روتاویروس اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. در سایر مطالعات انجام شده در ایران و برخی کشورها، نیز اختلاف آماری معنی‌دار بین نوع تغذیه و ابتلاء به عفونت روتاویروس مشاهده نشد(۱۱،۲۲).

نقش شیر مادر در کنترل عفونت روتاویروس هنوز مورد شک و تردید است. اما در مجموع می‌توان گفت که علایم بالینی ناشی از عفونت روتاویروس در کودکانی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند ملایم‌تر از علایم بالینی کودکانی است که از شیر خشک تغذیه می‌کنند(۲۲). در بررسی ما شایع‌ترین علایم بالینی کودکان مبتلا به عفونت روتاویروس عبارت بودند از: اسهال آبکی (۹۲/۶٪)، استفراغ (۷۳/۴٪)، تب (۶۴/۹٪) و دهیدراتاسیون شدید (۵/۳٪) که مشابه سایر مطالعات انجام شده است(۴،۹). بیشتر اسهال‌های روتاویروسی در سرتاسر دنیا همراه با استفراغ و تب بوده است و به علت این که عفونت روتاویروس در زمستان شیوع بیشتری دارد گاهی در بیماران علاوه بر اسهال و استفراغ علائم تنفسی چون سرفه، آبریزش بینی نیز ایجاد می‌شود(۱۳).

مطالعات اپیدمیولوژیک در قسمت‌های مختلف دنیا ثابت کرده است که اسهال روتاویروس در کشورهایی با آب و هوای معتدل وابسته به فصل بوده و در فصل سرد بیشتر دیده می‌شود و در مناطق گرم و مرطوب بیشتر در فصول بارانی و در مناطق حاره و نیمه حاره در تمام فصول سال دیده می‌شوند(۲۳)، با این حال علت مشخص برای الگوی فصلی شناخته نشده است ولی رطوبت نسبی پایینی که در فصل پائیز و زمستان در خانه وجود دارد می‌تواند فاکتور تسهیل کننده‌ای برای حیات روتاویروس‌ها باشد(۴).

شایعترین ژنوتیپ در گردش در طول مطالعه G1 بوده که مشابه با سایر مطالعات در دنیا می‌باشد(۱۸،۲۴).

در این مطالعه قطعه ژنی کد کننده پروتئین کپسیدی VP7 ۳۶ سویه روتاویروسی با ژنوتیپ مشخص G1 و یا G9 توسط متد RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. با این متد اشکال متفاوت تنوع ژنتیکی سویه‌های ایزوله شده توسط الگوهای مختلف برش آنزیمی، تعیین گردید. به این صورت که وقتی یک عفونت، ناشی از یک ژنوتیپ منفرد روتاویروسی ایجاد می‌گردد، یک ارتباط واضحی بین ژنوتیپ مربوطه والگوی آنزیمی حاصله از آن بدست می‌آید ولی همانطوری که نشان داده شد، یک ژنوتیپ مشخص در ارتباط با یک آنزیم، الگوهای متفاوتی را ازخودنشان داده است. این در حالی است که مطالعات انجام گرفته توسط O Halloran و همکارانش بیانگر ارتباط یک ژنوتیپ معین با یک الگوی منحصر بفرد است به طوری که ژنوتیپ G2 عمدتاً با الگوی R4 و ژنوتیپG4 با الگوی R3 تطابق دارد(۲۵). قطعات حاصله از هضم آنزیمی در مطالعات انجام گرفته توسطO Halloran و همکارانش با قطعات حاصله توسط آنزیم در مطالعه ما متفاوت می‌باشد. در بین ژنوتیپ‌های ایزوله شده در این مطالعه، ژنوتیپ G1 بیشترین تنوع (Genetic Variation) ژنتیکی را دارا می‌باشد که این نتیجه با مطالعات انجام گرفته توسط O Halloran و همکارانش در مورد سویه‌های ایرلندی جدا شده از موارد بالینی تطابق دارد. در آن مطالعه، سویه‌های G1 ایزوله شده در مقایسه با G2 از نظر ژنتیکی از تنوع و فراوانی بیشتری برخوردار بوده است(۲۵). با مقایسه الگوهای آنزیمی مختلف می‌توان به وقوع عفونت‌های دوگانه (mixed) پی‌برد که این پدیده با مقدار (دوزاژ) ژن VP7 سویه‌های آلوده کننده و میزان وقوع نوترکیبی(Recombination) بین سویه‌ها، کاملاً وابسته می‌باشد.

نتیجه گیری

این مطالعه مقطعی، شیوع بالایی از عفونت روتاویروس را در جمعیتی از کودکان ایرانی مورد مطالعه نشان داد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی بسیار زیادی در شایع‌ترین سروتیپ در گردش در جامعه (G1) دیده شدکه در مطالعات تهیه واکسن این تنوع ژنتیکی باید در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از مساعدت و همکاری بیمارستان مرکز طبی کودکان، خصوصاً سرکار خانم لیلا کاشی کارشناس میکروبیولوژی آزمایشگاه، که در جمع‌آوری نمونه‌ها و پر کردن پرسشنامه‌ها همکاری صمیمانه داشتند و همچنین از آقای دکتر سید محمود عربی که در انجام بخشی از آزمایشات این پژوهش با ما همکاری نمودند, تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

1- K.O. Chang, P. R Nielsen, L.A. Ward, and L.J. Saif . Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine –like group C Rotavirus influences pathogenesis of the group C Rotavirus .Journal of virology. 1999, 73:9284-9293.

2- Ulrich Desselberger. Viruses associated with acute diarrheal disease in: Arie J.Zuckerman, Jangu E.Banatvala, John R.Pattison . Principles and practice of clinical virology . 4 th edition . New York : Wiley Press. 1999;235-252.

3- Davidson, Geffrey , Barnes , Graene, Bass, Dorsey ,et al . Infectious Diarrhea in children : working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology , hepatology , and nutrition . Journal of pediatric gastroenterology and nutrition . 2002, 35:S143-S150.

4- Albert .Z. Kapikian , Yasutaka Hoshino and Robert M . Chanock . Rotaviruse in : david M. Knipe, Peter M howley . fields virology . 4 th edition . New York : Lippincott Williams & Wilkins press. 2001; 1787-1834.

5- Larryk . Pickering , John D. Snyder . Gastroenteritis in : Behrman , and Jenson . Nelson text book of pediatrics . 16 th edition . Philadelphia W.B. Saunders company . 2000;765-768.

6- Norma Santos , Rita C.C.lima, Claudio F.A. Pereira and Vera Gouvea . Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea . Journal of virology . 1998, 36: 2727-2729.

7- H. Fred Clark , RogerI. Glass and Paul A. Effit . Rotaviruses vaccines in : Plotkin & orestein . Vaccines . London : Saunders company press. 1999; 987-1004.

8- Zarnani AH, Modarres Sh, Jadali F, Sabahi F, Moazzeni SM, Vazirian F. .Role of rotaviruses in children with acute diarrhea in Tehran, Iran.
J Clin Virol. 2004, 29, 189-93.

۹-مرادی – عبدالوهاب ، مختاری آزاد- طلعت. نقش روتاویروس ها دراسهال حاد کودکان شهر زاهدان ، مجله طبیب شرق ، ۱۳۸۰، دوره ۳، بهار ، شماره ۱، صفحات ۲۸-۲۳ .

۱۰- حسین زاده – پروین ، آل یاسین _ فرحانه ، بررسی فراوانی عوامل ویرال و باکتریال در مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در شیراز ، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان ، ۱۳۷۹ ، دوره ۸ ، زمستان ، شماره ۱، صفحات ۱۶-۱۱

۱۱- سمرباف زاده – علیرضا ، مکوندی- منوچهر ، مظاهری تهرانی – الهام ، تعیین گروههای روتاویروس عامل اسهال حاد در کودکان زیر دو سال اهوازی ، مجله دانشگاه علوم پزشکی اهواز ، دانشکده بهداشت ، زمستان ۱۳۸۱

12- Umesh D. Parashar, Erik G. Hummelman, Joseph S. Bresee, Mark A. Miller, Roger I. Glass .Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children .Emerg Infect Dis, 2003

13- Margaret E. Conner and Robert F. Raming. Viral enteric disease in : Rafi Ahmad, Kathtyn R.Holmes Viral pathogenesis. New York: Lippincott- Raven press. 1997;713-803

۱4- U Desselberger. Reoviruses in specific viruses and viral infections. In: Topley & wioson,s, virology. 9 th edition. London: Arrold press. 1998; 537-545.

۱۵-- حبیبی – عفت ، قربانی _ شیرین ، جاراللهی - علی ، بررسی تعیین تیپ سرمی روتاویروسهای گروه A درنوزادان و کودکان زیر ۷ سال در تهران ، دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه الزهراء ، ۱۳۸۰ .

16- Norma Coluchi, Veridiana Munford, Julio Manzur, Cynthia Vazquez, Mabel Escobar, Ernesto Weber. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. Journal of clinical virology. May 2002, 40: 1709

17- Sebeta T , Steele AD. Atypical rotavirus identified from young children with diarrhea in south Africa. Journal health population nutrition. 2001,19: 199-203.

18- Mustafa Altindis, Atilla simsek , Aykut ozkal, et al. Rotavirus infection in children with Acute Diarrhea as Detected by latex Agglutination , ELLSA and polyacrylamide Gel Electrophoresis. 2004,41: 590-594.

19-V.L.A. James, P.R. Lambden, E.O. Caul, and Clarke.IN . Linked Immunosorbent assay based on recombinant human group C rotavirus inner capsid protein(VP6) to detect human group C rotaviruses in fecal samples. Journal of clinical microbiology. Nov 1998, 36: 3178-3181.

Archive of SID

www.SID.ir

20- Salazar-Lindo E, Miranda-Langschwager P, Campos-Sanchez M, Chea-Woo E, Sac. Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized,double-blind, placebocontrolled clinical trial. BMCPediatr.2004Sep2;4(1):18

21- Medici MC, Martinelli M, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Dodi I, Virdis R, Abelli LA, Aloisi A, Zerbini L, Valcavi P, Calderaro A, Bernasconi S, Izzi GC, Dettori G, Chezzi C .Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. Acta Biomed Ateneo Parmense. 2004 75(2):100-6

22- Mastretta, Emmanuele, longo, Patrizia, Laccisaglia, Anna, et al. Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition. Oct 2002,35:527-531.

23- H. Fred Clark , Roger I. Glass and Paul A. Effit . Rotaviruses vaccines in: Plokin & orestein . Vaccines. London: Saunders company press.1999;987-1004.

24- D. D. Grrffin, C. D. Kirkwood, U. D. Parashar, et al. Surveillance of Rotavirus Strains in the United States: Identification of Unusual Strains. Journal of clinical microbiology, 2000, p. 2784–2787.

25-F. O Halloran, M. Lynch, B. Cryan, and Fanning. Application of Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of VP7-Encoding Genes: Fine Comparison of Irish and Global Rotavirus Isolates. Journal of clinical microbiology, 2002, p. 524–531

Archive of SID

www.SID.ir