

# بررسی سرواپیدمیولوژیک عفونتهای انتروویروس ۷۰ و

## ویروس کوکساکسی A24 در ایران

مسعود اسلامی<sup>۱</sup>، جگدیش ام و شپانده<sup>۱\*</sup>، مهدی حسینی تهرانی<sup>۲</sup>، محمد امین سیدیان<sup>۲</sup>

۱. مرکز تحقیقات انتروویروس (شورای تحقیقات پزشکی هند)

۲. عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان چشم پزشکی فارابی

آدرس برای مکاتبه: INDA-Haffkine Institute Compound Parel, Mumbai-400 012 . [erc@bom3.vsnl.net.in](mailto:erc@bom3.vsnl.net.in)

دریافت مقاله: تیر هشتاد و چهار پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد چهار

### چکیده

**سابقه و هدف:** انتروویروس ۷۰ (EV70) و ویروس کوکساکسی CA24v عوامل اتیولوژیک کونژنکتیویت حاد خونریزی دهنده (AHC) *acute hemorrhagic conjunctivitis* می‌باشند. ویروسهای مذکور در اوایل دهه ۱۹۷۰ میلادی به ترتیب در ژاپن و سنگاپور شناسایی و ایزوله شده‌اند. EV70 تاکنون مسئول دو پاندمی و بارها شیوع گسترده در جهان بوده که سبب ابتلا میلیونها نفر به AHC گردیده است. ویروس کوکساکسی CA24v نیز مسبب شیوع AHC به ویژه در کشورهای آسیای جنوب شرقی بوده است. علیرغم وجود گزارشات متعدد از خاورمیانه و منطقه مدیترانه در خصوص وجود EV70، از ایران اطلاعی در دست نمی‌باشد. این بررسی به منظور دست یابی به حضور ویروسهای مورد نظر در ایران انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۶۶ نمونه خون از مراجعین به بیمارستان‌های فارابی و کودکان مفید جمع‌آوری گردید. سرم خون در شرایط استریل آماده شده و تا زمان انتقال به مرکز تحقیقات انتروویروس در بمبی، هند در برودت ۲۰C نگهداری شد. لاینهای سلولی HeLa و LLC-MK2 جهت آزمایش برای تعیین آنتی‌بادی‌های ضد EV70 و CA24v استفاده شدند. آزمایش نوترالیزاسیون ویروس (*virus neutralization test*) در میکروتیتراپلیت و با استفاده از رقت‌های سرمی مضاعف (*serial two fold dilutions*) و 100TCID50 ویروس انجام گرفت. در این آزمایش بالاترین رقت سرم که توان نوترالیزه کردن ویروس را داشته باشد به عنوان تیتراژ آنتی‌بادی سرم (*serum antibody titer*) در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر دال بر وجود آنتی‌بادی ضد EV70 در ۶۸٪ نمونه‌های سرم (۴۴/۶۶) می‌باشد. براساس گروههای سنی جوان ترین فرد (کودکی ۴ ساله) دارای سروپوزیتیو پنه نسبت به EV70 می‌باشد. در هر دو گروه زنان و مردان آنتی‌بادی سروپوزیتو ضد EV70/اختلاف چشمگیری را نشان نمی‌دهد. شایان ذکر است که تعداد ۶۵ سرم آزمایش شده بر روی CA24v عدم وجود آنتی‌بادی ضد ویروس مذکور مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** این بررسی بیانگر وجود EV70 در جامعه ایرانی به ویژه در سالهای اخیر بوده است. همچنین در مطالعه انجام شده عدم حضور ویروس کوکساکسی CA24v استنباط می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده تحقیقات جامع و گسترده‌تر در ارتباط با عفونت ویروسی AHC در ایران را خاطر نشان می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** ایران، انتروویروس ۷۰ (EV70)، کونژنکتیویت حاد خونریزی دهنده، ویروس کوکساکسی CA24v.

### مقدمه

در ژوئیه سال ۱۹۶۹ میلادی کونژنکتیویت حاد خونریزی دهنده (AHC) برای نخستین بار در شهره آکرا، پایتخت کشور آفریقای غنا به صورت اپیدمی غیر متعارف مشاهده گردید. به مناسبت همزمانی فرود آپولو ۱۱ در سطح کره ماه و شیوع آن، بیماری مذکور *Apollo 11 disease* نیز نامیده شد (۱،۲). گزارشات از بروز بیماری مشابه از جاوه - اندونزی در سال ۱۹۷۰ در دست می‌باشد (۳-۵) میلیونها نفر متعاقب دوپاندمی در سالهای ۷۲-۱۹۶۹ و ۸۲-۱۹۸۱ به AHC مبتلا گردیده‌اند. سویه جدیدی از پیکورناویروس توسط Kono و همکاران (۵) در سال ۱۹۷۱ از افراد مبتلا به ایزوله ای که انتروویروس ۷۰ (EV70) نامگذاری شد شناسایی گردید. Yin Murphy (۶) در سال ۱۹۷۲ موفق به ایزوله نمودن

در ژوئیه سال ۱۹۶۹ میلادی کونژنکتیویت حاد خونریزی دهنده (AHC) برای نخستین بار در شهره آکرا، پایتخت کشور آفریقای غنا به صورت اپیدمی غیر متعارف مشاهده گردید. به مناسبت همزمانی فرود آپولو ۱۱ در سطح کره ماه و شیوع آن، بیماری مذکور *Apollo 11 disease* نیز نامیده شد (۱،۲). گزارشات از بروز بیماری مشابه از جاوه - اندونزی در سال

انتروویروسی دیگر از موارد ابتلا به AHC گردید که به نام CA24v Coxsackievirus variant 24v شناسایی شده است. مدتی بعد متعاقب شیوع AHC ویروسهای EV70 و CA24v در کشورهای مختلف ایزوله شده که بیانگر انتشار جهانی این عفونت ویروسی می‌باشند (۱۱-۷، ۳). علائم کلینیکی این بیماری شامل نورگیزی، ترشح از چشم، احساس وجود شیء خارجی (Foreign sensation body)، تورم پلک، خونریزی از کونژکتیو و Superficial punctate keratitis می‌شود. این بیماری Self limiting بوده اما پیامد نرولوژیک به صورت Post-conjunctivitis از کشورهای هند، تایلند و تایوان گزارش شده است (۱۸-۱۲).

گزارشی از بحرین در سال ۱۹۷۱ در خصوص AHC در دست می‌باشد. متعاقباً گزارشات متعددی از مناطق گسترده جغرافیایی حوزه مدیترانه و خاورمیانه از جمله ایتالیا، اسرائیل، عربستان سعودی، امارات متحده عربی، یمن و همچنین پاکستان در دست می‌باشد (۲۲-۱۹، ۳، ۷). با وجود دو پاندمی و بارها شیوع گسترده AHC توسط EV70، گزارشی از ایران در این خصوص وجود ندارد. فقدان این اطلاعات در برگیرنده C24v نیز می‌باشد. این مطالعه جهت آگاهی از فعالیت EV70 و CA24v در ایران، با بررسی تیتراژ آنتی‌بادی سرم خون بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های چشم پزشکی فارابی و کودکان مفید در تهران انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۶۶ نمونه سرم از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان چشم پزشکی فارابی و بیمارستان کودکان مفید تهران در ماههای دی و بهمن ۱۳۸۱ جمع‌آوری گردید. در زمان جمع‌آوری نمونه خون هیچ یک از دهندگان خون مبتلا به AHC نبوده‌اند. بر اساس پرسشنامه تنها ۴ نفر سابقه ابتلا به کونژکتیویت داشته‌اند. جدا سازی سرم از خون تحت شرایط استریل انجام گرفت و نمونه‌های سرم تا زمان انتقال به مرکز تحقیقات انتروویروس در برودت ۲۰C - نگهداری شدند. از یخ خشک جهت حمل نمونه‌های فوق در زمان انتقال به آزمایشگاه جهت انجام آزمایشات ویروژیک استفاده شد. از مجموع ۶۶ نمونه سرم جمع‌آوری شده ۴۴ نمونه را ساکنین تهران (۱/۶۶/۶)، ۸ سرم از ساکنین کرج (۱/۱۲/۱) و مابقی نمونه‌های سرم از ساکنین شهرهای اسلام شهر، چالوس، بابل، رشت، تکاب و اهواز بوده‌اند. یک نمونه سرم متعلق به مهاجری از

افغانستان - ساکن تهران - بود. اطلاعات آماری لازم بر حسب سن جنسیت و محل اقامت در دست می‌باشد.

در این بررسی از لاینهای سلولی LLC-MK2 (کلیه میمون Rhesus)، HeLa اپی تلیال کارسینومای سرویکس انسان (Human epithelial carcinoma of cervix) به صورت sub passage هفت‌هفته‌ای و در محیط Eagles minimum essential medium غنی شده با ۵٪ سرم گوسفند (در خصوص LLC-MK2) و ۵٪ سرم جنین گوساله (جهت HeLa) استفاده به عمل آمد. لاینهای سلولی LLC-MK2 و HeLa به ترتیب برای EV70 و CA24v استفاده گردیدند. سویه پروتوتیپ (prototype strain) انتروویروس ۷۰ (J670/71) اهدایی Dr.Kono از انستیتو تحقیقات بهداشتی توکیو - ژاپن و ویروس کوکسالی واریانت A24v (CA24v) اهدایی Dr.m.Pallansh از CDC آتلانتا جهت این آزمایش مورد استفاده واقع شدند. ویروسهای EV70 و CA24v در کشت‌های سلولی LLC-MK2 و HeLa به صورت monolayer نگهداری شدند. تیتراسیون ویروس پیش از انجام تست نوترالیزاسیون انجام گرفت. سرمهای مورد آزمایش به صورت رقت سریال مضاعف (پایین ترین رقت مورد استفاده ۸ : ۱) در محیط MEM انجام گرفت. ۵۰ کیلولیتر سرم رقیق شده و ۵۰ کیلولیتر سوسپانسیون ویروس دارای 100-30TCID50/50 میکرولیتر (EV70 یا CA24v) در هر یک از خانه‌های میکروتیتراپلنت قرار داده شده و به مدت ۹۰ دقیقه در آنکوباتور ۳۶C محتوی ۵٪ CO<sub>2</sub> نگهداری شد. سپس میکرولیتر ۱۰۰ سوسپانسیون سلولی (۱۰/۰۰۰ تا ۱۵/۰۰۰ سلول) به خانه‌های پلیت مذکور اضافه شد. همزمان با هر آزمایش تیتراسیون ویروس انجام گرفت. پلیت‌ها در آنکوباتور ۳۶C محتوی ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۵ روز قرار داده شدند. مشاهده میکروسکوپی به وسیله Inverted microscope جهت بررسی cytopathic effect سلولی انجام گرفت. صحت آزمایش با در نظر گرفتن titration-Back در ویروسی بین 100 تا 320 TCID<sub>50</sub> و تعیین گردید. بالاترین رقت سرم که باعث نوترالیزه کردن کامل ویروس شده بود به عنوان تیتراژ آنتی‌بادی در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

نتایج بدست آمده از تعداد ۶۶ سرم مورد آزمایش در قبال EV70 و CA24v بر اساس توزیع گروه‌های سنی در جدول شماره

۱ نشان داده شده است در کمترین رقت سرمی (۸: >) تعدد

۲۱ نمونه سرم (۳۱/۸٪) و جدول ۲- نسبت سروپوزیتوئیته EV70 و کوکسالی ویروس CA24v براساس گروه سنی

گروه سنی (سال)	تعداد مورد آزمایش	تیترا آنتی بادی EV70				تیترا آنتی بادی CA24v			
		<۱:۸	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲	<۱:۸	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲
≤۱۰	۱۲	۱	۶	۳	۲	۱۱	۰	۰	۰
		(/۸/۳)		(/۹۶/۷)					
۱۱ تا ۲۰	۸	۴	۲	۲	-	۸	۰	۰	۰
		(/۵۰)		(/۵۰)					
≥۲۱	۳۹	۱۴	۱۷	۷	۱	۳۹	۰	۰	۰
		(/۳۵/۹)		(/۶۴/۱)					
نا مشخص	۷	۲	۴	۱	-	۷	۰	۰	۰
		(/۲۸/۶)		(/۷۱/۴)					
جمع کل	۶۶	۲۱	۲۹	۱۳	۳	۶۵	۰	۰	۰
		(/۳۱/۸)		(/۶۸/۱)		(/۱۰۰)			

از تعداد ۶۰ نمونه سرم ۴۲ نمونه از مردان و ۱۸ نمونه از زنان جمع آوری شده است. نسبت موارد مثبت آنتی بادی ضد EV70 در سرم مردان و زنان به ترتیب ۶۶/۶٪ و ۶۷/۲٪ تعیین شد. موارد مثبت آنتی بادی ضد EV70 در تعداد ۳۱ مورد از مجموع ۴۴ مورد از ساکنین تهران (۷۰/۴٪)، کرج ۵ مورد از مجموع ۸ نمونه سرم (۶۲/۵٪) بدست آمد. تعداد نمونه‌های بدست آمده از ساکنین سایر شهرستانها به دلیل پایین بودن تعداد محاسبه نگردیده است. قابل ذکر است که یکی از دو نمونه سرم از سکنه رشت در خصوص EV70 منفی بود.

### بحث

بیش از ۳۰ سال است که EV70 و CA24v عوامل مولد کونژیکتیوئیت حاد خونی‌ریزی دهنده شناخته شده‌اند. ویروسهای مذکور مسبب بروز چندین شیوع گسترده در سطح جهان بوده‌اند. همچنین polio link motor paralysis به صورت conjunctivitis-post توسط EV70 گزارش شده است (۱۴-۱۲). به رغم گزارشات متعدد در خصوص عفونتهای EV70 در کشورهای خاورمیانه، از ایران گزارشات اپیدمیولوژیک وجود ندارد. نتایجی که ما از این بررسی به آن دست یافته‌ایم نشانگر وجود آنتی بادی ضد EV70 در ۶۸٪ نمونه‌های آزمایش شده می‌باشد. آنتی بادهای ضد EV70 در مردان و زنان به یک نسبت تعیین گردید. آنتی بادهای مشخص شده در کودکان و همچنین بزرگسالان بیانگر چرخش اندمیک (endemic circulation) ویروس در جامعه می‌باشد. اطلاعات ما از این بررسی تأکیدی بر تشخیص ویروژیک AHC بوده و

تیترا آنتی بادی (۸: ۱) در ۲۹ سرم (۴۳/۹٪) دال بر حضور آنتی بادی ضد EV70 می‌باشد. رقتهای سرمی ۱:۱۶ تا ۱:۳۲ در ۱۶ نمونه سرم (۲۴/۴٪) بیانگر تیترا نسبتاً بالای آنتی بادی ضد EV70 می‌باشد. در این بررسی در ۶۸/۲٪ نمونه‌های سرم (۴۵/۶۶) آنتی بادی ضد EV70 تعیین گردید. در آزمایش با تعداد ۶۵ سرم تیترا آنتی بادی ضد ویروس کوکسالی CA24v مشاهده نگردید. شایان ذکر است که نتایج بدست آمده با تکرار آزمایشات تایید شده‌اند. میزان وجود آنتی بادی ضد EV70 بر مبنای گروههای سنی به ترتیب کودکان ۹۶/۷٪ (۱۱/۱۲)، جوانان ۴/۸٪ (۴/۸)، بزرگسالان ۶۴/۱٪ (۲۵/۳۹) می‌باشد. ۷ نمونه سرم فاقد مشخصات آماری بوده که کلاً افراد بالای ۱۰ سال سن را تشکیل می‌داده‌اند. در این مورد آنتی بادی ضد EV70 در ۷۱/۴٪ (۵/۷) تعیین گردید. نتایج بدست آمده براساس جنسیت دهندگان خون در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- نسبت سروپوزیتوئیته EV70 در مردان و زنان

تیترا آنتی بادی	مرد	زن
<۱:۸	۱۴	۵
۱:۸	۱۶	۹
۱:۱۶	۹	۴
۱:۳۲	۳	۰
جمع کل	۴۲	۱۸
سروپوزیتو	۶۶/۶٪	۷۲/۲٪

همچنین لزوم انجام مطالعات آتی سرواپیدمیولوژیک که در برگیرنده طیف وسیع جغرافیایی در ایران باشد را خاطر نشان می سازد.

## سیاسگزاری

از آقای دکتر شاهی ریاست و آقای عرب سوپروایزر آزمایشگاه بیمارستان فارابی ، سرکار خانم دکتر جدلی ریاست آزمایشگاه بیمارستان کودکان مفید و آقای دکتر گلستانی ریاست بانک اعضا پیوند ایران و همچنین سرکار خانم نادکارنی از مرکز تحقیقات انترووایروس (بمبئی - هند) که در انجام این پژوهش با ما همکاری صمیمانه داشته اند تقدیر و تشکر به عمل می آید.

## REFERENCES

- 1-Chatterjee S, Quarcoopome co, Apentрге A. Unusual type of epidemic conjunctivitis in Ghana. Br J Ophthalmol 1970; 54: 628-630.
- 2-Parrot WE. An epidemic called Apollo 11. An outbreak of conjunctivitis in Nigeria. Practitioner 1971; 206: 253-255.
- 3-Kono R. Apollo11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: A pandemic of a new enterovirus infection of the eyes. Am J Epidemiol 1975; 101: 383-390.
- 4-Natori K, Yamazaki S, Miyamura K, Kono R. Genetic relationship between two enteroviruses causing acute hemorrhagic conjunctivitis syndrome. Intervirology 1984; 22: 97-103.
- 5-Yin Murphy M. Acute hemorrhagic conjunctivitis. Prog Med Virol 1984; 29: 23-44.
- 6-Kono R, Sasagawa A, Miyamura K, Tajiri E. Serologic characterization and seroepidemiologic studies on acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) virus. Am J Epidemiol 1975; 101: 444-457.
- 7-Yin-Murphy M. An epidemic of picornavirus conjunctivitis in Singapore. Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth 1972; 3: 303-309.
- 8-Christopher S, Theogarage S, Godbole S, John JT. An epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to Coxsackievirus A24. J Infect Dis 1982; 146: 16-19.
- 9-Janak K, Shin I. Detection and differentiation of Coxsackievirus A24 variant isolated from an epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis in north India by RT-PCR using a novel primer pair. Indian J Med Res 2002; 115: 176-183.
- 10-Higgins PG and Chapman TED. Coxsackievirus A24 and acute hemorrhagic conjunctivitis in SriLanka. Lancet 1977; i: 361.
- 11-Reddon IA, Lago PJ, Perez LR, puentes P, Corredor MB. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Cuba. New Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 467-468.
- 12-Hung TP. A polio-like syndrome in adults following acute hemorrhagic conjunctivitis. Int J Neurol. 1981; 15: 266-278.
- 13-John TJ, Christopher S, Abraham J. Neurological manifestation of acute hemorrhagic conjunctivitis due to EV 70. Lancet 1981; ii: 1283-1284.
- 14-Bharucha EP, Mondkar VP, Kulkarni SA. Post-conjunctival myeloradiculopathy. Neurology India 1982; 22: 79-82.
- 15-Green IJ, Hung TP, Sung SM. Neurological complications with elevated antibody titer after acute hemorrhagic conjunctivitis. Am J Ophthal 1975; 80: 832-834.
- 16-Kono R, Miyamura K, Tajiri E, Sasagawa A, Phuparadit P, Roongwithu N et al. Virological and serological studies of neurological complications of acute hemorrhagic conjunctivitis in Thailand. J Infectious Disease 1977; 135: 706-713.
- 17-Saenz RE, Castillo L, Quiroz E. Radiculomyelitis following acute hemorrhagic conjunctivitis caused by enterovirus 70. Report of the 1<sup>st</sup> corroborated case in America. Rev Med Panama 1984; 34: 245-246.
- 18-Muzzi A, Rocchi G, Lumboroso B. et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis during an epidemic of adenovirus type 4 infection. Lancet 1975; ii: 822.

19-Shulman LM, Manor Y, Azar R, Handsheer R, Vonsover A, Mendelson E et al. Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J Clin Microbio* 1997; 2145-2149.

20-Mustafa OA, Saleh LH, Abdel-Wahab KS, EL-Gammal M. An outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis caused by enterovirus 70 in Jeddah during 1985. *J Egypt Public Health Assoc* 1989; 64: 55-57.

21-Ramia S, Arif M. Isolation of enterovirus 70 (EV 70) from patients with acute hemorrhagic conjunctivitis in two areas of Saudi Arabia. *Trans Royal Society Trop Med Hyg* 1990; 84: 139-140.

22-Ghafoor A, Burney MI, Zaidi S, Sami Z. Investigation of epidemic acute hemorrhagic conjunctivitis in 1986. *J Pak Med Assoc* 1988; 38: 313-316.

Archive of SID