مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، (JSIAU)
جلد ۱۸ شماره ۷۰/۱ زمستان ۱۳۸۷

سروتایپینگ انتروویروسها و نقش آنها در ایجادمننژیت آسپتیک کودکان ۱٤-۰ سال

میرساسان میرپور
گروه میکروبیولوژی، واحدلاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

Archive of SID

چکیده

به منظور بررسی نقش انتروویروس ها در ایجادمننژیت آسپتیک وسروتایپینگ (تعیین هویت) این ویروسها درکودکان زیر۱٤ سال که با علایم بالینی مننژیت آسپتیک به بیمارستانهای بهرامی، امام حسین (ع)، شهدا تجریش، مفید، کودکان تهران، علی اصغر(ع)، امام خمینی (ع) وتختی ازآذرماه سال ۱۳۷۳ تا آذرماه ۱۳۷٤ مراجعه نموده بودند، اقدام به جمع آوری نمونه مایع مغزی نخاعی(CSF) همراه با تنظیم پرسشنامه شد و در بخش ویروس شناسی انستیتوپاستورایران به جداسازی انتروویروسها از مایع مغزی نخاعی بر روی ۲ نوع کشت سلولی مداوم HeLa و GMK_2 وتعیین هویت این ویروسها ی جدا شده با استفاده از آنتی سرم های L. B.M Pools مبادرت گردید. این مطالعه بر روی ۲٦٦ بیمار با علائم مننژیت آسپتیک انجام پذیرفت. در این بررسی ۱۵% از بیماران با علائم مننژیت آسپتیک مبتلا به مننژیت انتروویروسی بوده اند. بیشترین موارد بیماری درگروه سنی زیر یک سال قرارداشتند(٤۲/۵%) و در فصل تابستان دیده شدند(۵۰%). ارتباط معنی دار آماری بین متغیر فصل و جداسازی انتروویروسها وجود داشت ($p < 0/005$). همچنین اختلاف معنی دارآماری بین فصل تابستان و سایرفصل ها در ایجاد مننژیت انتروویروس و مننژیت آسپتیک غیرانتروویروس دیده شد($p<0/001$) . انتروویروسهایی که در این مطالعه جدا گشتند، شامل ویروسهای کوکساکی گروه B سروتیپ های B5 (۹۵%) و B4 (۵%) بودند.

واژه های کلیدی: انتروویروس، مننژیت آسپتیک، کوکساکی ویروس B5، کوکساکی ویروس B6

www.SID.ir

مقدمه

منتژیت آسپتیک یکی از شایع ترین بیماری ها در دوران کودکی و نـوزادی مـی باشـد. ازمهمتـرین عوامـل ایجادکننده آن انتروویروس ها هست. [۱] انتروویروس ها جزء خانواده پیکورناویریده بوده, ویروسـهایی کوچـک بـا قطر ۲۵-۳۰ نانومتر می باشند اسیدنوکلئیک RNA داشته وتقارن آیکوساهدرال دارند. [۲]

انتروویروسها علائم بالینی مختلفی درسیستم های تنفسی، گوارشی، قلب, پوست وسیستم عصبی ایجاد می کنند. ضایعات سیستم عصبی بـه شـکل منتژیـت ومننگوانـسفالیت ظـاهر مـی گـردد. انـواعی از انتروویـروس هـا شـامل پولیوویروس، کوکساکی ویروس A وB، اکوویروس و انتروویروس های جدید سروتیپ های ٦٨-٧١ ایجاد منتژیت می کنند. [۳] سن و جنس در بروز منتژیت حاصل از انتروویروسها نقش داشته و این بیماری در فصل پاییز و تابستان از شیوع بیشتری برخوردار است. [٤] کشت سـلولی مناسـب بـرای ایـن دسـته ازویـروس هـا Hela[2] و GMK2[1] می باشد. [۳]

بر اساس گزارشهای داده شده، ضایعات سیستم عـصبی ناشـی از ایـن ویـروس هـا عمومـا منتژیـت بـوده واکثریت بیماران را کودکان کمتر از ۱۵ سال تشکیل داده اند. درآزمایش های به عمل آمده مشخص گردید کـه ٥٦٪ از منتژیت های انتروویروس توسط اکوویروس ها، ٣٤٪ توسط کوکـساکی ویروسـهایB و ٢٨٪ توسـط کوکـساکی ویروس های A ایجادمی شو د. [۳]

ماده و روش

مواد مورد استفاده: محیط MEM (Minimum Essential Medium)، محیط Melincks B محلول تریپسین، EDTA، محلـول PBS (Phosphate Buffer Saline)، FCS، آنتـی سـرمهای (A – H) LBM Pools، کشت سلولی HeLa و GMK_2، نمونه CSF، محلول پنیسیلین و استرپتومایـسین (وسـایل آزمایـشگاهی: میکروپلیت، لوله کشت سلولی، میکروسکوپ معکوس، میکروسکوپ نوری و لام نئوبار).

روش کار

محیط ها و محلول ها طبق دستور تهیه شدند. برای انجام این بررسی, نمونه های CSF به تیره های کشت سلولی HeLa , GMK_2 که به انتروویروس حساس هستند، تلقیح گردید و برای تایید نمونه های مثبت پاساژ دوم انجام شد. سپس عمل تیتراسیون صـورت گرفـت و درپایـان سـروتایپینگ (تعیـین هویـت) بـه دو روش مـاکرو و میکرونوترالیزاسیون برای هرکدام از نمونه های مثبت انجام گردید.

1. Green Monkey Kidney
2. Cell of Cervical Carcinoma

تلقیح نمونه

۰/۲ میلی لیتر ازنمونه CSF را درلوله های کشت سلولی HeLa و GMK_2 به روش زیر تلقیح می‌کنیم:

- محیط MEM لوله ها را خالی کرده وکشت سلولی را با ۲ میلی لیتر MEM جدید شستشو می دهیم.

Archive of SID

www.SID.ir

- ۰/۲ میلی لیتر ازنمونه CSF به هرلوله اضافه می کنیم و در۳۷ درجه سانتی گراد بـه مـدت ٤٠-٦٠ دقیقـه قـرار می دهیم و هر پانزده دقیقه لوله ها راحرکت می دهیم.
- سپس محیط MEM را که حاوی ۲٪ سرم جنینی گاو (FCS) است به لوله ها اضافه می کنیم. لوله های فـوق را در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد دارای دی اکسید کربن قرار داده و مدت ۷ روز آنها را کنترل می کنیم.

میکروتیتراسیون

این عمل برای تعیین مقدار میکروبی است کـه توانـایی از بـین بـردن ۵۰٪ سـلول هـای کـشت سـلولی را دارد ($TCID_{50/ml}$) و به روش زیر انجام می گردد:

- رقت های 10^{-1} تا 10^{-9} از نمونه مثبت تهیـه نمـوده و از هرکـدام ۲۵میکرولیتـر در چهـارحفره میکروپلیـت وارد می کنیم.
- بر روی هرکدام از رقت ها ۲۵ میکرولیتر از محیط MEM ریخته و در حفره Cell Control ۵۰ میکرولیتـر و درحفره Medium Control ۷۵ میکرولیترMEM می ریزیم.
- برروی همه حفره ها به جزحفره Medium Control ۵۰ میکرولیتر از سوسپانـسیون سـلولی HeLa حـاوی ۱۵۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر می ریزیم. میکروپلیت را با سلوفون پوشانده و در انکوباتور ۳۷ درجـه حـاوی دی اکسیدکربن قرار می دهیم.
- میکروپلیـت را پـس از ٦ روز بـا میکروسـکوپ معکـوس بررسـی مـی کنـیم. اگـر در حفـره CellControl Monolayer, تشکیل شده بود نتایج را می خوانیم. اگر در هر٤ حفره CPE دیده شد ۱۰۰٪ و به ترتیب اگر۳ , ۲ و یا ۱ حفـره CPE داشـته باشـند بـه ترتیـب ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ عنـوان مـی گـردد. بـا اسـتفاده از فرمـول Kalber, $TCID_{50/ml}$ را حساب می کنیم.

$$1\ TCID_{50/ml} = -1 - \left[\frac{\text{مجموع درصدهای CPE هررقت}}{100} - 0/5\right] = X$$

برای محاسبه کافی است از X آنتی لگاریتم بگیریم و به ازای هر عدد صحیح یک صفر قرارمی دهیم.

سروتایپینگ (تعیین هویت)

به دو روش ماکرونوترالیزاسیون و میکرونوترالیزاسیون انجام می پذیرد. اصول کار روشن است کافی اسـت نمونه جدا شده را با آنتی سرم ها روبروکنیم و درصورت همسان بودن آنها هیچ نوع CPE در میکروپلیت نخـواهیم دید. دراین روش از آنتی سرم های LBM وکشت سلولی HeLa استفاده شد. پاسـخ هـا طبـق جـدول ۱ خوانـده می شود.

بحث و نتایج

تابلوی بالینی کودکان مبتلا به مننژیت انتروویروسی نشان می دهـد۱۰۰٪ افـراد دارای تـب، ۹۷/۵٪ اسـتفراغ، ٤٧/۵٪ تهوع، ۸۲/۵٪ تشنج، ٤۲/۵٪ سفتی گردن و٤۵٪ سردرد بوده اند(شکل ۲). نتـایج نـشان داده اسـت بـالاترین نـسبت درصد بیماری مننژیت آسپتیک انتروویروسی درکودکان زیر یک سـال (٤۲/۵٪) و پـس از آن درکودکـان ٤-۱ سـال

Archive of SID

www.SID.ir

(۲۷/۵٪) , ۹-٤ سال و ١٤-١٠ سال (١٥٪) می باشد (شکل-۳). مننژیت انتروویروسی در پسران به مراتب بیشتراز دختران است (٦٧/٥٪ درمقابل ٣٢/٥٪). بالاترین درصد بیماری در فصل تابستان (٥٠٪) بوده است پس از آن بهار(۲۷/۵٪) , زمستان (۱۷/۵٪) و پاییز(۵٪) می باشد(شکل- ٤). پس از تعیین هویت ویروس ها مشخص گردید تنها کوکساکی ویروسهای گروه B سروتیپ های B5 (۹۵٪) وB4 (۵٪) درمننژیت آسپتیک انتروویروسی نقش دارند(شکل- ۵).

مننژیت آسپتیک در بسیاری ازکشورهای جهان گسترش دارد این بیماری یکی از بیماری های متداول درکودکان و نوجوانان می باشد. طبق بررسی های انجام شده انتروویروس ها بیشترین عامل ایجادکننده آن هستند با توجه به اینکه مننژیت آسپتیک از مننژیت باکتریایی شایع تراست وگسترش مننژیت ناشی از انتروویروس ها در اکثر نقاط جهان اثبات شده است, اقدام به انجام این بررسی گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان داده است که بین گروه های سنی در بیماران مبتلا به مننژیت انتروویروس و بیماران مبتلا به مننژیت آسپتیک غیرانتروویروس همبستگی وجود ندارد ($p>0/05, X^2=3/683$) . همچنین اختلاف معنی داری بین گروه سنی زیر یک سال و سایرگروههای سنی بیماران از نظر درصد شناسایی مننژیت انتروویروس ومننژیت آسپتیک غیرانتروویروس دیده نمی شود($p >0/05, X^2=2/799$). بیشترین میزان جداسازی انتروویروس درگروه زیر یکسال انجام شد (٤٢/٥٪).

با توجه به بررسی انجام شده، نشان داده شده که ارتباط معنی دارآماری بین جنس با مننژیت انتروویروس ومننژیت آسپتیک غیرانتروویروس وجود نداشته ($p>0/05, X^2=0/166$) و ازکودکان پسر درصد بیشتری انتروویروس (٦٧/٥درصد) نسبت به کودکان دختر(۳۲/۵درصد) جدا شده است.

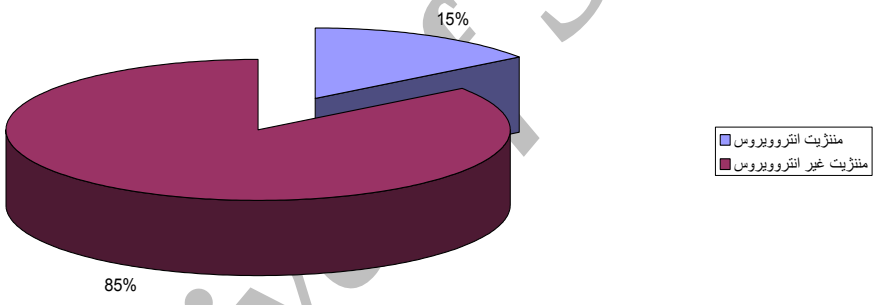
نتایج نشان دادکه بین فصل با مننژیت انتروویروس ها ومننژیت آسپتیک غیرانتروویروس همبستگی وجود دارد($P< 0/005, X^2=14/604$). بیشترین میزان جداسازی انتروویروس ها در فصل تابستان (٥٠٪) انجام شد. اختلاف معنی دارآماری بین فصل تابستان و سایرفصل ها در این مورد وجود دارد($p<0/001 , X^2=12/542$) . بررسی انجام شده نشان دادکه نسبت درصد مننژیت آسپتیک ناشی از انتروویروس ها در یافته های بالینی کودکان بیمار شامل: تب، استفراغ، تهوع، تشنج، سفتی گردن و سردرد به ترتیب ۱۰۰، ۹۷/۵, ٤٧/٥, ۸۲/۵, ٤٢/٥ و ٤٥ درصد بوده است. طبق بررسی انجام شده سروتیپ های جدا شده شامل کوکساکی ویروس B5 (۹۵٪) وکوکساکی ویروس B4 (۵٪) بودند. در این مطالعه مشخص گردید۱۵٪ از موارد مننژیت آسپتیک ناشی از انتروویروس ها می باشد(شکل ۱). در یک بررسی که توسط Watanabe انجام شد از ۵۸ نمونه مغزی نخاعی ۷ مورد(۱۴٪) انتروویروس جدا گردید [۵]. براساس گزارش Chonmaitree ٤١٪ از مواردمننژیت آسپتیک توسط انتروویروسها انجام می شود [٦]. طی یک بررسی درسالهای 1989-1993 درکودکان کمتراز۲ سال در ژاپن نشان داده شد انتروویروس ها در١٦٤ نمونه از۲۷٤ مورد وجود داشتند(٦٠٪). مقایسه نتایج بدست آمده از این بررسی با مطالعه Watanabe مشابه بوده ولی از بررسی Chonmaitree کمترمی باشد. علت این امرگسترش ناهماهنگ این ویروس درجهان می باشد. همچنین می تواند به علت عدم رعایت موازین بهداشتی درمناطق خاص باشد. البته واکسیناسیون خیلی مهم است چون درکشورهایی که واکسن اوریون استفاده نمی شود این ویروس در ایجاد مننژیت نقش دارد [٤، ۷، ۸]. دراین بررسی که درکودکان زیر١٤ سال انجام پذیرفت بیشترین موارد بیماری درکودکان زیریک

Archive of SID

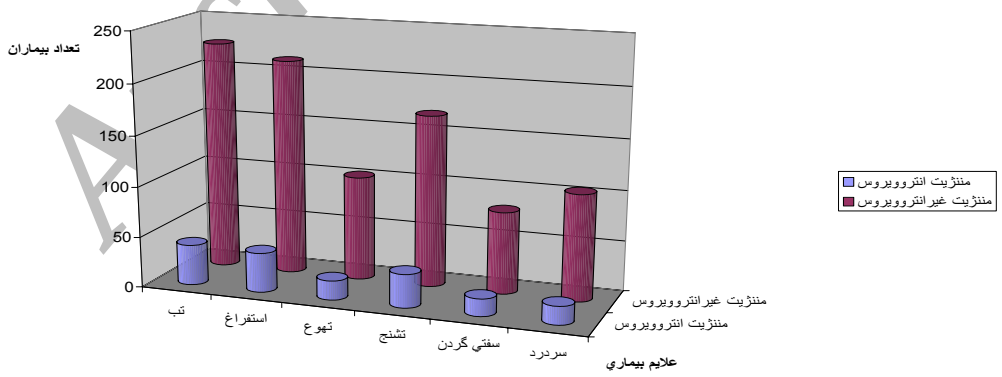
www.SID.ir

سال بوده است (٤٢/٥٪). درطی بررسی Dogan مشخص شدکه ٥١٪ ازنوزادان بیمار منتژیت انترووویروسی داشتند و میزان جداسازی ویروس ارتباط مستقیمی با تعداد لکوسیت های موجود درمایع مغزی نخاعی داشت [٩].در این پژوهش دیده شدکه موارد منتژیت انترووویروس درکودکان پسر بیش ازدختربوده است (٦٧/٥٪). درمطالعه ای مشابه Hensel گزارش نمودکه در موارد بیماری منتژیت آسپتیک درصد مبتلایان پسر(٦٦٪) بیشتربوده است [١٠]. همچنین Bazart و Etter در بررسی های جداگانه ای نشان داده اند که درصد ابتلاء درکودکان پسر٦٩٪ بوده است [١١، ١٢]. بررسی حاضر نشان می دهد که تعداد بیماران بامنتژیت انترووویروس در فصل تابستان در مقایسه با سایرفصول بیشتربوده است (٥٠٪)که در مقایسه با مطالعاتی که Aleraj و Hensel انجام داده اند مشابه بوده است [١٠]. طی یک بررسی ١١ ساله در ژاپنYamashita نشان داد که نمونه های منتژیت آسپتیک در تابستان به خصوص ماه جولای با شدت بیشتری دیده می شود [١٣].

شکل ١: درصد موارد منتژیت انترووویروس در مقابل منتژیت غیر آنترووویروس



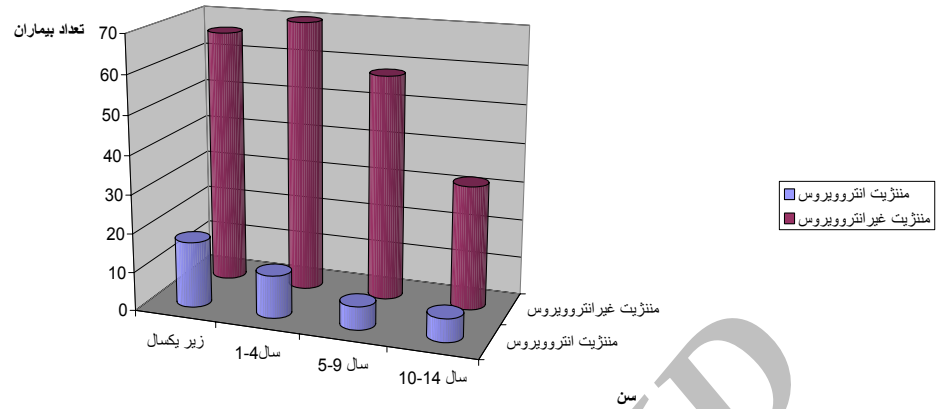
شکل٢:نمودار توزیع علایم بالینی در بیماران با منتژیت انترووویروس و منتژیت غیر انترووویروس



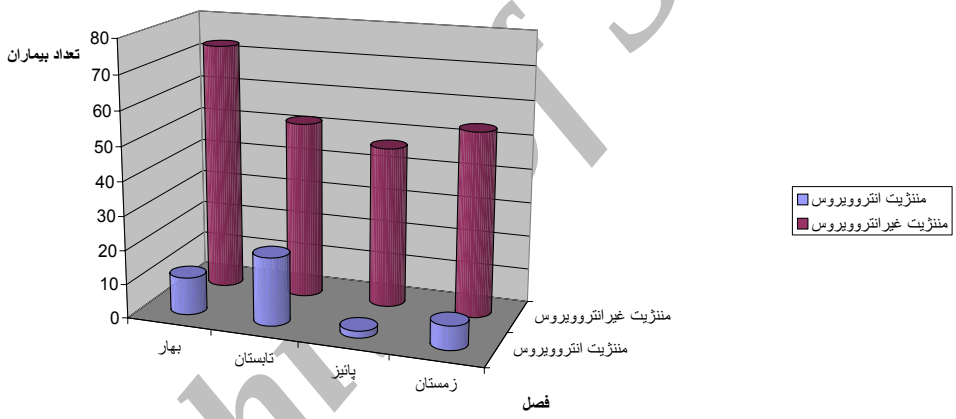
Archive of SID

www.SID.ir

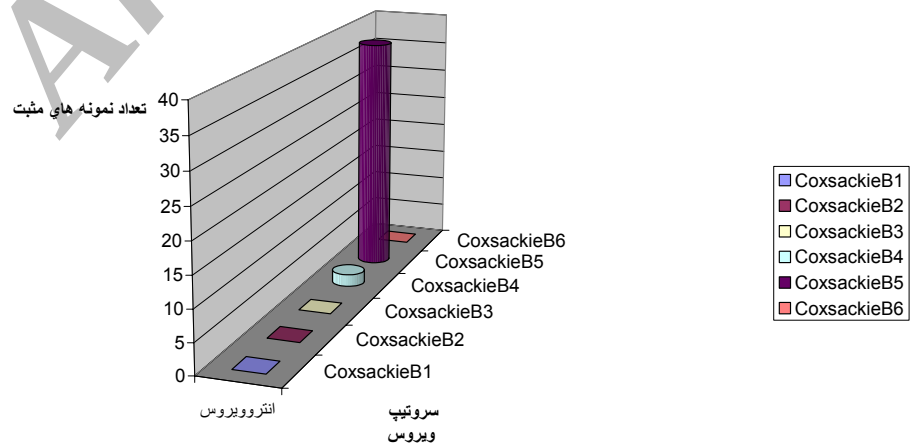
شکل ۳: نمودار توزیع فراوانی بیماران با منفی انتروویروسی و منفی غیر انتروویروسی در گروه های سنی مختلف



شکل ۴: نمودار توزیع فراوانی بیماران با منفی انتروویروس و منفی غیر انتروویروس در فصل های مختلف



شکل ۵: نمودار سروتیپهای انتروویروسی جدا شده



Archive of SID

www.SID.ir

به نام خدا

پرسشنامه

بررسی منتژیت و مننگوانسفالیت ویروسی

شماره نمونه بیمار: **تاریخ دریافت نمونه:**

نوع نمونه:

نام و نام خانوادگی: **سن:** **جنس:**

بیمارستان: **بخش:** **پزشک معالج:**

محل سکونت: **شهرستان:**

سابقه واکسیناسیون(اوریون, سرخک, سرخجه, فلج اطفال):

خلاصه شرح حال بیمار :

تب: **سردرد:** **استفراغ:** **تهوع:**

سفتی گردن: **تشنج:** **اسهال:**

سایر علایم بالینی:

نتایج آزمایشگاه:

میزان قند:

میزان پروتئین:

سلول: **Poly** **Mono**

WBC **RBC**

نتیجه آزمایش باکتریولوژی:

نتیجه آزمایش ویرولوژی:

نتیجه آزمایش سرولوژی:

Table 1: Code for reading results

If Neutralized By Pool(s):	Virus Is:	If Neutralized By Pool(s):	Virus Is:
A	E١٥	CD	E٦
B	E٢١	CE	CB٥
C	E٢٤	CF	P١
D	E٢٥	CG	CB٣
E	E١١	CH	E١٢
F	E٢٧	DE	E١٣
G	E٣١	DF	E١٤
H	CA١٦	DG	E١٦
AB	CA٧	DH	P٣
AC	CB١	EF	E١٨
AD	E٣٣	EG	E١٧
AE	CB٤	EH	E٢٢
AF	E٧	FG	E٢٠
AG	E٤	FH	CB٦
AH	E١	GH	E٢٣
BC	E٢	ACF	E٢٩
BD	CB٢	AEG	E٥
BE	P٢	BDF	E٢٦
BF	E١٩	BFH	E٩
BG	CA٩	CEG	E٣٠
BH	E٣	DEH	E٣٢

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

این بررسی نشان دادکه از بین انتروویروس ها, کوکساکی ویروس ها در ایران شیوع دارند(B4,B5). طی بررسی انجام شده در شهرتاجیمی ژاپن کوکساکی ویروسهای B شامل B1 (۲۹/۸٪), B4 (۱۲/۸٪), B5 (۱۷٪) واکوویروس ۱٦(۳٤٪) تعیین گشتند [۱۲]. در یک بررسی Dogan نشان دادکه ۱٤٪ از موارد مننژیت انتروویروسی ناشی ازکوکساکی ویروس B بوده است [۹]. در بررسی دیگری Glimaker کوکساکی ویروس B3 (٤٦٪) را جداکرد [۱٤]. طی یک بررسی ۱۱ساله Yamashita نشان دادکه ۸ سروتیپ انتروویروسی شامل کوکساکی ویروس B3, B5 و اکوویروس های٤, ٦, ۷, ۹, ۱۸و ۳۰ بیشترین عوامل اپیدمی در ژاپن هستند [۱۳]. با توجه به نتایج ناهمگونی که در بررسی های مختلف بدست آمده است می توان این مسئله را عنوان نمودکه شرایط جغرافیایی, اپیدمیولوژیکی وبهداشتی در انتشار این ویروس ها سهیم هستند. نتایج این بررسی نشان میدهدکه انتروویروس ها ازعوامل ویروسی اصلی ایجادکننده مننژیت آسپتیک و مننگوانسفالیت درکودکان زیر۱٤ سال می باشند. با درنظرگرفتن شرایط بهداشتی و اجتماعی جامعه و امکان بروز آلودگی مدفوعی, عفونت های انتروویروسی به خصوص در فصل های گرم سال به عنوان مشکل بهداشتی مطرح بوده و از راه های جلوگیری انتشار عفونت های انتروویروسی رعایت اصول بهداشتی و جلوگیری از برقراری شرایط مناسب برای انتقال این ویروس ها درکودکان است. نتایج این تحقیق نشان داد که حدود ۱۵٪ از کودکان به مننژیت انتروویروس آلوده بودندکه می توانند اطلاع جامعی در جهت کاربرد بی مورد آنتی بیوتیک ها در رابطه با این شکل بالینی باشد.

References:

1. Glimaker, M., *Scan.J.Infections Disease.*, **13**, 84 (1992).
2. Connoly, K. J., *Infect.Dis.Chin.North.Am.*, **4(4)**, 599 (1990).
3. Field, B. N., *Field`s Virology*, Johns Wiely, NewYork (1996).
4. Montazam, S. H., *Special Thesis*, Institute Pasteur Iran, Tehran (1994).
5. Watanabe, Y., Zassh, K., *J. Miner. Sec. Ipn.*, **64(7)**, 815 (1990).
6. Chonmaitree, *JAMA.*, **247(13)**, 1873T (1982).
7. Sabetfar, R., *Special Thesis*, Institute Pasteur Iran, Tehran (1992).
8. Karimi, A. R., *Special Thesis*, Institute Pasteur Iran, Tehran (1994).
9. Dogan, R., *Journal of Pediatrics*, **113(10)**, 6975 (1988).
10. Hensel, M., *Klin. Pediatrics*, **404(3)**, 163 (1992).
11. Etter, C. G., *Schweiz-Med-Wochen*, **121(31-32)**, 1120 (1991).
12. Lasaret,V., *An. Esp. Pediatrics*, **36(1)**, 29 (1992).
13. Yamashita, K., *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **45**, 151 (1992).
14. Glimaker, M., *Scand. J. Infection Disease*, 22, 519(1990).

Archive of SID

www.SID.ir