جله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، شماره ۱، بهار۹۲، صفحات ۵۹ تا ۶۳

Original Article

شیوع عفونت آدنوویروسی و سروتایپ‌های غالب آن در نمونه‌های جمع‌آوری شده از افراد مبتلا به گاستروانتریت حاد در شهر تهران طی یک سال تقویمی (۱۳۸۸-۱۳۸۷)

بهزاد دماوند[۱]، پدرام عظیم زاده[۲]، سید رضا محبی[۳]، سارا رومانی[۴]، سجاد مجیدی زاده بزرگی[۱]، فرزانه جدلی[۵]، محمد رضا زالی[۶]

[۱] پژوهشگر، کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] پژوهشگر، کارشناس ارشد سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] استادیار، دکترای ویروس شناسی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] پژوهشگر، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۵] دانشیار، متخصص پاتولوژی، سرپرست گروه پاتولوژی و آزمایشگاه ، بیمارستان کودکان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۶] استاد، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *آدنوویروس‌ها ویروس‌های DNA دار بدون پوشش هستند و می‌توانند در انسان از طریق مجاری تنفسی، ادراری، گوارشی و چشم ایجاد بیماری کنند. تا کنون بیش از ۵۰ سروتایپ از آدنوویروس شناخته شده است که از این میان سروتایپ‌های ۴۰ و ۴۱ این ویروس عامل ایجاد اسهال در انسان هستند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع عفونت آدنوویروس در بیماران با گاستروانتریت حاد و تعیین ژنوگروه‌های بیماری‌زای آن در جمعیت مورد بررسی می‌باشد.*

روش بررسی: *در طی خرداد ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸، ۲۹۳ نمونه مدفوع از افراد دارای گاستروآنتریت حاد آبکی جمع آوری گردید. DNA استخراج، و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده مراحل PCR انجام گردید. آنالیز نرم افزاری برروی نمونه‌های مثبت و همچنین تعیین سروتایپ آدنوویروس انجام شد.*

یافته‌ها: *تمامی ۶ (۲٪) نمونه مثبت آدنو ویروس جدا شده از ۲۹۳ بیمار مورد مطالعه، کودکان زیر ۵ سال بودند. همه نمونه‌های مثبت، از گروه F آدنوویروس و همچنین سروتایپ ۴۱ بودند.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد سروتایپ ۴۱ آدنوویروس یکی از عوامل مهم در ایجاد گاستروانتریت در تهران است و بیشتر در کودکان زیر ۵ سال ایجاد بیماری می‌کند.*

واژگان کلیدی: *گاستروانتریت حاد، آدنوویروس، تهران، سروتایپ ۴۱.*

مقدمه

گاستروانتریت عفونتی است که باعث التهاب معده و روده می‌شود و نشانه‌هایی همچون اسهال، استفراغ، دردهای شکمی، بی اشتهایی و تب دارد. گاستروانتریت سومین عامل مرگ و میر عفونی در دنیا می‌باشدکه این آمار در بین کودکان بیشتر است (۱، ۲). ویروس‌ها یکی از عوامل مولد این بیماری هستند، به طوری که در سال‌های اخیر رشد این بیماری بر اثر ویروس، به خصوص، در کشورهای در حال توسعه افزایش چشم‌گیری داشته است (۳-۱). از عوامل ویروسی شناخته شده می‌توان به روتاویروس، نورووویروس، آدنوویروس و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دکتر سید رضا محبی (**email**: srmohebbi@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/٤/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۹/۸

Archive of SID
www.SID.ir

آستروویروس اشاره کرد. ما در این مطالعه به بررسی میزان عفونت آدنوویروس که از عوامل مطرح ایجاد کننده مشکلات گوارشی است، پرداختیم (۱، ۶-۳).

آدنوویروس‌ها جزء ویروس‌های دارای DNA و بدون غشاء هستند. اندازه آنها بین ۷۰-۸۰nm است. تاکنون بیش از ۵۰ سروتیپ از آنها شناسایی شده است که در انسان بیماری‌زایی ایجاد می‌کنند. آدنوویروس‌ها در ۶ گروه (A-F) تقسیم‌بندی شده‌اند و می‌توانند باعث عفونت در سیستم تنفسی، دستگاه گوارش وچشم شوند. تنها گروه F این ویروس که شامل سروتیپ‌های ۴۰ و ۴۱ می‌باشد، دستگاه گوارش را آلوده کرده و باعث گاستروآنتریت می‌شوند. عفونت ناشی از این ویروس بیشتر در کودکان زیر ۵ سال مشاهده می‌شود و بیشترین مرگ و میر حاصله در این رده سنی مشاهده شده است (۴، ۱۰-۶).

آدنوویروس از طریق تماس نزدیک فرد به فرد، مدفوعی- دهانی و یا ترشحات تنفسی از انسانی به انسان دیگر منتقل می شود. این ویروس سلول‌های مخاطی اپیتلیال موجود در مجاری گوارشی را آلوده می‌کند و به طور مستقیم موجب تخریب سلولی می‌گردد(۷). علاوه بر روش‌های تشخیصی سنتی همانند تست‌های سرولوژی و کشت سلولی، امروزه از روش‌های دقیق‌تری مانند Polymerase Chain Reaction برای شناسایی این ویروس استفاده می‌شود (۱۱، ۱۲).

با وجود احتمال بروز مرگ و میر ناشی از گاستروانتریت در کودکان و اهمیت آدنوویروس در بروز گاستروانتریت و مطالعات محدود انجام شده بر روی این ویروس در داخل کشور، این مطالعه با هدف شناسایی میزان عفونت به آدنوویروس و تعیین ژنوتایپ‌های آن در بیماران مبتلا به گاستروانتریت حاد مراجعه کننده به بیمارستان‌های تهران از خرداد ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸ انجام گردید.

مواد و روشها

این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی انجام شد. از ۲۹۳ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهدای تجریش، مفید، طبی کودکان و علی اصغر تهران که دچار گاستروآنتریت حاد بودند طی خرداد ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸ نمونه مدفوعی تهیه گردید. معیار ورود بیماران به مطالعه بروز اسهال حاد آبکی بود و معیار خروج بیماران از مطالعه مصرف هرگونه دارو (از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها) که عامل ایجاد اسهال می‌باشد، یا وجود هرگونه بیماری زمینه‌ای که در فرد اسهال مزمن ایجاد کند.

کلیه این نمونه‌ها تحت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شدند و تا انجام بررسی‌های ملکولی در دمای ۲۰- ذخیره گردیدند.

رقیق سازی نمونه‌های مدفوعی توسط محلول ۰/۸۹٪ NaCl انجام شد و در ادامه توسط فیلترهای ۰/۲ µm فیلتر گردیدند. از محلول فیلتر شده جهت استخراج DNA ژنومی ویروس استفاده شد.

استخراج DNA توسط کیت QIAamp DNA minikit (Qiagen، آلمان) طبق دستور عمل همراه کیت انجام شد و DNA استخراج شده به عنوان الگو برای انجام PCR استفاده گردید.

۲ پرایمر اختصاصی برای انجام واکنش PCR طراحی شد، که توالی این ۲ پرایمر در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده و اندازه هر پرایمر

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر
Ad-HVR-IF	5GCCAGCACRTWCTTTGACAT -3	۲۰ bp
Ad-HVR-IR	5-AGGGGTTGACRTTGTCCAT-3	۲۰ bp

مواد مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) طبق جدول ۲ درون میکروتیوب‌های ۰/۲ml آماده شدند.

جدول ۲- برنامه PCR

نام ماده		مقدار ماده
بافر	µl۲/۵	X۱۰
پرایمرF	µl۰/۵	pM۱۰
پرایمرR	µl۰/۵	pM۱۰
$MgCl_2$	µl۰/۷۵	mM۱/۵
Taq DNA Polymerase	µl۰/۲۵	Unit۲/۵
dNTP	µl۰/۵	mM۰/۲
DNA الگو	µl۱	ng۱۰۰

حجم نهایی مواد مخلوط شده درون میکروتیوپ را با آب مقطر به ۲۵µl رساندیم و جهت انجام چرخه‌های واکنش PCR درون ترموسایکلر قرار دادیم. برنامه PCR بدین شرح به دستگاه ترموسایکلر داده شد: ابتدا دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای جدا شدن دو رشته DNA از هم انجام شد، در مرحله دوم نمونه‌ها درون دستگاه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه قرار گرفتند و سپس به مدت ۱ دقیقه برای اتصال پرایمرها دما به ۵۹/۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. در مرحله چهارم برای ساخته شدن رشته مکمل و طویل شدن رشته DNA دمای ترموسایکلر به ۷۲ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. مراحل ۲ تا ۴

Archive of SID
www.SID.ir

برای ۴۰ چرخه تکرار شدند. بعد ازگذشت ۴۰ چرخه، طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از شناساگر اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای تایید نتایج PCR، نمونه‌های مثبت آدنوویروس توسط دستگاه ABI 3130xl Genetic Analyzer توالی‌یابی شدند. توالی بدست آمده در بخش Blast سایت Pubmed مورد بررسی قرار گرفت و علاوه بر تایید صحت نتایج به دست آمده، سروتایپ آدنوویروس جدا شده از بیمار مشخص گردید.

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. متغیرهای کیفی با آزمون کای‌دو و متغیرهای کمی با آزمون آماری Student's T-test بررسی و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از ۲۹۳ بیمار با میانگین سنی ۱۶/۲۵۶±۱۱/۶۰ سال، ۱۶۷ نفر (۵۷ درصد) مرد و ۱۲۶ نفر (۴۳ درصد) زن بودند. عفونت ناشی از آدنوویروس در ۶ بیمار (۲٪) مشاهده شد که تمامی این بیماران کودکان زیر ۵ سال با متوسط سن ۱/۷۱۶±۱/۵۸ سال بودند. از این میان، ۴ (۶۷٪) کودک پسر و ۲ (۳۳٪) کودک دختر بودند. ۱۶۳ بیمار (۵۵/۶٪) کودکان زیر ۵ سال با متوسط سن ۱/۵۰±۱/۶ سال و ۱۳۰ بیمار (۴۴/۴٪) افراد بالای ۵ سال با متوسط سن ۱۷/۶۶±۲۴/۱ سال بودند. تمامی نمونه‌های مثبت، از گروه F آدنوویروس و سروتایپ ۴۱ شناسایی شدند.

توزیع فراوانی عفونت آدنوویروس به تفکیک در فصل تابستان با ۳ مورد (۲/۷٪)، فصل زمستان ۲ مورد (۳/۵٪) و فصل پاییز ۱ مورد (۱/۲٪) گزارش شد.

پراکنش جغرافیایی بیماران مبتلا به گاستروانتریت به ترتیب شرق تهران با ۲/۸٪ بیشترین میزان الودگی به آدنوویروس از بین نمونه‌های جمع آوری شده را دارا می‌باشد و پس از آن به ترتیب شمال تهران با ۲/۶٪، غرب تهران با ۲/۴٪ و جنوب تهران با ۱/۶٪ آلودگی قرار دارند.

از نظر تظاهرات بالینی، نیمی از بیماران آلوده به آدنوویروس مبتلا به استفراغ و تمامی آنها دچار اسهال بودند، ولی حالت تهوع در هیچ یک از آنها دیده نشد. ۵۰٪ از بیماران از دردهای شکمی رنج می‌بردند و ۶۶٪ آنها نسبت به خوردن غذا بی‌اشتها بودند. بی‌حالی در نیمی از بیماران مشاهده شد.

از مجموع ۶ بیمار مثبت، ۳ بیمار (۵۰٪) از سرم تزریقی برای درمان استفاده کرده بود و ۱ (۱۷٪) بیمار دیگر فقط از الکترولیت‌های خوراکی(ORS) استفاده کرده بود.

در این تحقیق، آب آشامیدنی این بیماران نیز مورد بررسی قرار گرفت که ۸۸/۸٪ از آب آشامیدنی شهری استفاده می‌کردند و از این تعداد ۴ نفر (۱/۵٪) آلوده به آدنوویروس بودند، ۶/۹٪ از آب چاه استفاده می‌کردند که ۱ نفر(۵٪) آلوده به آدنوویروس و ۷ نفر (۲/۳٪) از آب تانکر می‌نوشیدند که ۱ نفر (۱۴/۲٪) آلوده به آدنوویروس بود. ۶ نفر (۲٪) هم از آب معدنی استفاده می‌کردند که البته آلودگی به آدنوویروس در هیچ یک از افراد مشاهده نگردید.

توزیع نمونه‌های مثبت آدنوویروس بین دو جنس با آزمون کای‌دو (Chi Square Test) و آزمون دقیق فیشر (Fisher's Exact Test) بررسی شد و اختلاف معنی‌داری بین دو جنس یافت نشد (p=۰/۴۸).

توزیع نمونه‌های مثبت آدنوویروس در افراد مورد مطالعه از نظر سن با آزمون Student's T-Test بررسی شد و ارتباط معنی‌دار آماری میان سن افراد مورد مطالعه و آلودگی با آدنوویروس پیدا شد (p=۰/۰۰۱).

بحث

گاستروانتریت ویروسی، عفونتی است که معمولا باعث اسهال آبکی، دردهای شکمی و استفراغ می‌شود. از آنجایی که این بیماری ناشی از ویروس است، آنتی‌بیوتیک بر این نوع گاستروآنتریت اثری ندارد. این بیماری به صورت خود محدود شونده است و بیمار باید تحت نظر پزشک از مایعات الکترولیت برای تامین آب و الکترولیت از دست رفته بدن خود استفاده کند (۱). تمامی بیماران مورد بررسی در این مطالعه دچار اسهال آبکی بودند، ۳۷٪ از بیماران از دردهای شکمی رنج می‌بردند و ۴۱٪ استفراغ داشتند. یکی از مهم‌ترین ویروس‌های ایجاد کننده مشکلات گوارشی آدنوویروس‌ها هستند که میزان شیوع بالایی در جهان دارند. نیمی از بیماران مبتلا شده توسط آدنوویروس استفراغ و ۵۰٪ از این ۶ بیمار دردهای شکمی داشتند.

در این مطالعه، ۲۹۳ بیمار مبتلا به گاستروانتریت حاد مورد بررسی قرار گرفتند و ۶ بیمار مثبت شناخته شدند که این مقدار برابر با ۲٪ کل نمونه‌های مدفوعی اسهالی و ۳/۷٪ کودکان بیمار می‌باشد. میزان شیوع این ویروس در کشورهایی نظیر ترکیه برابر با ۸/۹٪ (۱)، آفریقای جنوبی ۳/۴٪ (۱۳) و در

Archive of SID

www.SID.ir

کودکان کشورهایی نظیر بورکینافاسو برابر ۱/۹٪ (۱۴)، مالاوی ۱/۹٪ (۱۵)، تایوان ۴٪ (۳)، کره جنوبی ۲/۶٪ (۵)، ایتالیا ۳/۶٪ (۱۶)، ونزوئلا ۵٪ (۴) و در شهرهای مختلف هندوستان به ترتیب برابر با ۵/۳٪ در کلکته (۶)، ناگپور ۷/۵٪، اورنگ آباد ۷٪ و پونه ۹٪ (۱۷) است. آمار ارائه شده در این پژوهش همانند مطالعات صورت گرفته درکشورهایی نظیر ایتالیا، آفریقای جنوبی، کره جنوبی و تایوان می‌باشد.

سروتایپ‌های ۴۰ و ۴۱ از گروه F آدنوویروس‌ها، پاتوژن‌های گوارشی در انسان هستند و موجب گاستروانتریت حاد می‌شوند (۱۸). تمامی ۶ بیمار (۱۰۰٪) مثبت اعلام شده در این مقاله از سروتایپ ۴۱ ویرووس آدنوویرووس بودند. این آمار علاوه بر تائید سروتایپ‌های شناخته شده در سایر نقاط دنیا، لزوم بررسی بیشتر بر روی سروتایپ ۴۱ این ویروس را در کشور ایران بیش از پیش آشکار می‌کند.

بیماری‌زایی آدنوویروس در دستگاه گوارشی بیشتر در فصل تابستان دیده شده است، با این حال احتمال مبتلا شدن افراد در هر فصلی وجود دارد (۱). در مطالعه حاضر، بیشترین بیماری‌زایی توسط آدنوویروس در فصل تابستان و پس از آن فصل زمستان دیده شده است.

جهت پیشگیری از شیوع این ویروس در میان افراد جامعه مخصوصا کودکان، شستشوی دستان با آب گرم و صابون بعد از استفاده از سرویس‌های بهداشتی و یا تعویض پوشک کودکان و همچنین قبل از تهیه انواع مواد غذایی و نیز پختن غذا به شدت توصیه می‌شود.

نتایج حاصل از این مطالعه را می‌توان به عنوان الگویی کوچک از توزیع آدنوویروس در جمعیت مورد بررسی دانست، اما برای به دست آوردن آماری دقیق‌تر، لزوم انجام مطالعاتی از این دست در دیگر شهرهای ایران ضروری می‌باشد. نبود روشی معمول برای شناسایی ویروس‌های مولد گاستروانتریت از جمله آدنوویروس‌ها، دانستنی‌های ما را درمورد میزان شیوع و همچنین درمان این بیماری بسیار محدود کرده است، و از آن جا که بررسی جامعی در مورد نقش این ویروس در ابتلا به این بیماری در ایران انجام نشده است، اهمیت مطالعه حاضر بیش از پیش آشکار می‌شود.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از خانم‌ها سیده مینا سیدی و لیلا کاشی به خاطر همکاری صمیمانه آنها در اجرای این طرح قدردانی نمایند.

REFERENCES

1. Akan H, Izbırak G, Gürol Y, Sarıkaya S, Gündüz TS, Yılmaz G, et al. Rotavirus and adenovirus frequency among patients with acute gastroenteritis and their relationship to clinical parameters: a retrospective study in Turkey. Asia Pac Fam Med 2009; 8:8.
2. Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine 2006; 24:2732-50.
3. Chen SM, Ni YH, Chen HL, Chang MH. Microbial etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Taiwan. J Formos Med Assoc 2006; 105:964-70.
4. González GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. J Med Virol 2011; 83:1972-82.
5. Huh JW, Kim WH, Moon SG, Lee JB, Lim YH. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in Gyeonggi province, South Korea. J Clin Virol 2009; 44:152-6.
6. Dey RS, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Panchalingam S, Nataro JP, Sur D, et al. Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. J Clin Microbiol 2011; 49:500-5.
7. Lynch JP 3rd, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. Semin Respir Crit Care Med 2011; 32: 494-511.
8. Ozdemir S, Delialioğlu N, Emekdaş G. Investigation of rotavirus, adenovirus and astrovirus frequencies in children with acute gastroenteritis and evaluation of epidemiological features. Mikrobiyol Bul 2010; 44:571-8. [In Turkish]
9. Van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen AC, Claas EC. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. J Clin Virol 2010; 49:205-10.
10. Feeney SA, Armstrong VJ, Mitchell SJ, Crawford L, McCaughey C, Coyle PV. Development and clinical validation of multiplex TaqMan® assays for rapid diagnosis of viral gastroenteritis. J Med Virol 2011; 83:1650-56.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Velasco JM, Yoon IK, Mason CJ, Jarman RG, Bodhidatta L, Klungthong C, Silapong S, et al. Applications of PCR (real-time and MassTag) and enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of respiratory infections and diarrheal illness among deployed U.S. military personnel during exercise Balikatan 2009, Philippines. Mil Med 2011; 176:1096-100.

12. Buckwalter SP, Teo R, Espy MJ, Sloan LM, Smith TF, Pritt BS. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. J Clin Microbiol 2012; 50:766-71.

13. Moore P, Steele AD, Lecatsas G, Alexander JJ. Characterisation of gastro-enteritis-associated adenoviruses in South Africa. S Afr Med J 1998; 88:1587-92.

14. Simpore J, Ouermi D, Ilboudo D, Kabre A, Zeba B, Pietra V, et al. Aetiology of acute gastro-enteritis in children at Saint Camille Medical Centre, Ouagadougou,Burkina Faso. Pak J Biol Sci 2009; 12:258-63.

15. Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Molyneux ME, Hart CA. Detection of enteric adenoviruses in children with acute gastro-enteritis in Blantyre, Malawi. Ann Trop Paediatr 2002; 22:267-69.

16. Crotti D, D'Annibale ML, Fonzo G, Medori MC, Ubaldi M. [Enteric infections in Perugia's area: laboratory diagnosis, clinical aspects and epidemiology during 2001]. Infez Med. 2002; 10:81-87.

17. Verma H, Chitambar SD, Varanasi G. Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. J Med Virol 2009; 81:60-64.

18. Cruz JR, Cáceres P, Cano F, Flores J, Bartlett A, Torún B. Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. J Clin Microbiol 1990; 28:1780-84.

Archive of SID

www.SID.ir