



## بررسی شیوع گاستروانتریت و شناسایی ژنوتایپ‌های در حال گردش روتاویروسی در

### کودکان بستری شده در برازجان سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷

محمد کارگر<sup>۱\*</sup>، اکرم نجفی<sup>۱</sup>، کیوان زندی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

<sup>۲</sup> دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، گروه ویروس‌شناسی

#### چکیده

زمینه: روتاویروس‌های انسانی، از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده گاستروانتریت حاد ویروسی در نوزادان و کودکان کم سن و سال جهان محسوب می‌شوند. با تأیید واکنش‌های جدید روتاویروسی، اطلاعات مربوط به شیوع بیماری و تنوع ژنوتایپ‌های روتاویروس در حال گردش می‌تواند در راهبردهای ایمن‌سازی مورد توجه قرار گیرد. هدف از این مطالعه، شناسایی ژنوتایپ‌های پروتئین VP7 روتاویروس در کودکان بستری شده در شهر برازجان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۳۷۵ نمونه مدفوعی از کودکان زیر ۷ سال مبتلا به اسهال شدید بستری شده در بیمارستان ۱۷ شهریور برازجان در طول سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۸ جمع‌آوری شد. برای شناسایی آنتی‌ژن گروه A روتاویروس از روش الایزا استفاده گردید. سپس ژنوتایپ نمونه‌های مثبت با روش Nested RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده، عفونت روتاویروسی در ۲۴/۲۷ درصد موارد شناسایی گردید. بالاترین میزان عفونت در کودکان ۱۲ تا ۱۷ ماه (۶/۹۳ درصد) مشاهده شد ( $P=0/056$ ). همچنین بیشترین شیوع عفونت مربوط به فصل پاییز با فراوانی ۵۴/۹۴ درصد و کمترین شیوع مربوط به فصل تابستان با فراوانی ۲/۲۰ درصد بود ( $P=0/001$ ). فراوانی ژنوتایپ‌های G1، G4، G9 و غیرقابل تایپ به ترتیب ۵۱/۶۵ درصد، ۲/۲۰ درصد، ۴/۴۰ درصد و ۴۱/۷۶ درصد بودند. اما ژنوتایپ‌های G2، G3، G8، G10 و G12 در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: فراوانی قابل توجه ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ، ضرورت استفاده از سایر پرایمرها و نیز تعیین ژنوتایپ‌های غیرمعمول به کمک سایر پرایمرهای اختصاصی را نشان می‌دهد. همچنین به دلیل شیوع بالای عفونت روتاویروسی ضرورت پایش مداوم بیمارستانی و ایمن‌سازی گسترده به‌ویژه در کودکان زیر ۲ سال وجود دارد.

واژگان کلیدی: روتاویروس، Nested RT-PCR، VP7، گاستروانتریت حاد

دریافت مقاله: ۸۹/۶/۳۱ - پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۶

\* جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

## مقدمه

در حال حاضر روتاویروس‌ها شایع‌ترین عامل ایجادکننده گاستروانتریت شدید در نوزادان و کودکان سراسر جهان می‌باشند (۱). به طور متوسط در هر سال ۱۱۱ میلیون مورد درگیری با اسهال روتاویروس، ۲۵ میلیون مراجعه سرپایی، ۲ میلیون مورد بستری شدن و بیش از ۴۴۰ هزار مرگ و میر در کودکان کمتر از ۵ سال جهان گزارش شده است (۲). بیشتر این مرگ و میرها در کشورهای کم درآمد جنوب آفریقا و آسیا به وقوع می‌پیوندد (۳).

مطالعات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که در هر سال ۶۴۰۰۰ کودک کمتر از ۵ سال جان خود را از دست می‌دهند که ۱۰۸۸۰ مورد این مرگ و میرها به دلیل اسهال و ۲۷۲۰ نفر آن به دلیل ابتلای به عفونت روتاویروسی می‌باشد (۴). تقریباً تمام کودکان سراسر دنیا، تا رسیدن به سن ۵ سالگی حداقل یک‌بار به گاستروانتریت روتاویروسی مبتلا می‌شوند، اما آسیب‌پذیرترین گروه سنی ۶ تا ۲۴ ماه هستند (۵).

روتاویروس‌ها متعلق به خانواده رئوویریده (Reoviridae)، فاقد پوشش و دارای اندازه ۱۰۰ نانومتر هستند. ژنوم این ویروس‌ها حاوی ۱۱ قطعه RNA دو رشته‌ای است که ۶ پروتئین ساختمانی VP1 تا VP4، VP6 و VP7 و ۵ پروتئین غیر ساختمانی NSP1 تا NSP5 را به رمز در می‌آورد (۶). پروتئین‌های ساختمانی VP7 (گلیکوپروتئین یا پروتئین G) و VP4 (حساس به پروتئاز یا پروتئین P) در پوسته خارجی واقع شده‌اند و نقش اصلی را برای تهیه واکسن دارند (۷). پروتئین VP6 در کپسید داخلی واقع شده و فراوان‌ترین پروتئین ویروسی است. از این رو هدف مناسبی برای بیشتر روش‌های

تشخیصی محسوب می‌شود (۸). روتاویروس‌ها بر اساس صفات ژنتیکی و آنتی‌ژنتیکی به ۷ گروه A تا G طبقه‌بندی شده‌اند. گروه‌های A، B و C علاوه بر انسان در حیوانات نیز یافت می‌شوند، اما سایر گروه‌ها تنها میزبان حیوانی دارند (۹). روتاویروس‌های گروه A، عامل بیش از ۹۰ درصد موارد گاستروانتریت شدید در نوزادان و خردسالان سراسر جهان محسوب می‌شوند (۱۰).

به نظر می‌رسد که انسان اصلی‌ترین مخزن عفونت روتاویروسی باشد، با این که راه اصلی انتقال بیماری به انسان ناشناخته است، اما احتمالاً این عفونت از طریق قطرات معلق یا تماس مستقیم مدفوعی-دهانی می‌تواند منتقل گردد (۱۱). پایش‌های گسترده ژنوتایپی در مناطق مختلف دنیا نشان داده که شایع‌ترین ژنوتایپ‌های در حال گردش G1 تا G4 و G9 می‌باشند (۱۲). اما اخیراً افزایش غیرمعمول ژنوتایپ‌های G5، G6، G8، G10 و G12 نیز گزارش شده است (۱۳). پایش هدایت شده روتاویروسی در تمام کشورهای دنیا به‌ویژه کشورهای در حال توسعه می‌تواند راهی برای واکنش‌های همگانی کودکان در آینده باشد. اطلاعات محدودی در مورد شیوع اسهال‌های روتاویروسی در شهرهای مختلف ایران وجود دارد. به‌عنوان نمونه، میزان شیوع اسهال‌های حاد دارای منشأ روتاویروس در شهرهای تبریز، مازندران و اصفهان به ترتیب ۵۳/۰۵، ۶۱/۴۰ و ۳۰/۸۰ درصد گزارش شده است (۱۴-۱۶).

همچنین ما در پژوهش‌های قبلی شیوع عفونت‌های روتاویروسی را در شهرهای تهران، جهرم، مرودشت و شیراز مورد بررسی قرار دادیم (۲۰-۱۷). هدف از

مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. نهایتاً واکنش با افزودن اسید و تغییر رنگ از آبی به زرد متوقف گردید. غلظت رنگ تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. نمونه‌هایی که چگالی نوری (OD) بیش از میزان cut-off (میانگین کنترل منفی + ۰/۲۰) داشتند مثبت در نظر گرفته شدند.

### استخراج RNA

ژنوم ویروس توسط محلول RNXTM-Plus شرکت سیناژن مطابق با دستورالعمل شرکت مذکور استخراج گردید.

### Nested RT-PCR

به منظور ساخت cDNA ابتدا مخلوط واکنش شماره ۱ شامل: ۲ میکرولیتر DMSO، ۲ میکرولیتر بافر ۵X، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای Beg9 و End9، ۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه تهیه و به هر میکروتیوب اضافه شد. در مرحله بعد ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده به هر میکروتیوب اضافه گردید و سپس ۵ دقیقه در ۹۷ °C در دستگاه ترموسایکلر (TECHNE ساخت کشور آلمان) قرار داده شد. سپس ۷ میکرولیتر از مخلوط واکنش شماره ۲، شامل: ۲ میکرولیتر بافر ۵X، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، ۰/۵ میکرولیتر بازدارنده RNase و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به آن افزوده و ۶۰ دقیقه در ۴۲°C در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برای انجام Nested RT-PCR، ابتدا با استفاده از جفت پرایمرهای خارجی Beg9 و End9، کل قطعه مربوط به ژن VP7 تکثیر و در طی ۲۸ چرخه متوالی، قطعه مورد نظر با طول ۱۰۶۲ جفت باز تهیه گردید. سپس مقدار کمی از محصول PCR مرحله اول، به عنوان الگو به میکروتیوب دیگری منتقل و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱)،

این پژوهش، ارزیابی میزان شیوع گاستروانتریت روتاویروسی و نیز شناسایی ژنوتایپ‌های در حال گردش روتاویروس در کودکان بستری شده در شهر برازجان می‌باشد.

### مواد و روش کار

#### نمونه‌گیری

۳۷۵ نمونه مدفوعی از کودکان کمتر از ۷ سال بستری شده به دلیل گاستروانتریت حاد در بیمارستان ۱۷ شهریور شهر برازجان به صورت مقطعی - توصیفی از مهرماه ۱۳۸۷ تا شهریور ۱۳۸۸ جمع‌آوری گردید. در تمام موارد اطلاعات مربوط به سن، جنس، محل سکونت، علائم بالینی و درجه حرارت بدن در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. نمونه‌های مدفوعی با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر منتقل و تا زمان انجام آزمون تشخیصی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شدند.

#### شناسایی روتاویروس‌های گروه A

برای سنجش آنتی‌ژن روتاویروس گروه A در نمونه‌های مدفوع از تکنیک الایزا (کیت Generic Assays ساخت کشور آلمان) استفاده گردید. طراحی کیت به گونه‌ای است که کف چاهک‌های میکروپلیت موجود در آن با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد پروتئین VP6 گروه A روتاویروس پوشیده شده است. برای شروع ابتدا ۲ قطره از آنتی‌بادی مونوکلونال کانژوگه شده با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز (HRP) و ۵۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده مدفوع به چاهک‌ها اضافه و به مدت یک ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از شستشو ۲ قطره از سوبسترای آنزیم به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن VP7 روتاویروس‌ها (۲۱)

ژنوتایپ	موقعیت نوکلئوتید	توالی (۵'→۳')	پرایمر
-	۱-۲۸	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	Beg9
-	۱۰۳۶-۱۰۶۲	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	End9
G1	۳۱۴-۳۳۵	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	aBT1
G2	۴۱۱-۴۳۵	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	aCT2
G3	۶۸۹-۷۰۹	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	aET3
G4	۴۸۰-۴۹۸	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	aDT4
G8	۱۷۸-۱۹۸	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	aAT8
G9	۷۵۷-۷۷۶	CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC	aFT9
G10	۶۶۶-۶۸۷	ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG	G10 or mG10
G12	۵۴۸-۵۶۷	CCG ATG GACGTAACGTTGTA	G12

واریانس (ANOVA) و آزمون دقیق فیشر انجام گرفت. مرز معنی‌داری روی ( $P < 0.05$ ) قرار داده شد.

#### یافته‌ها

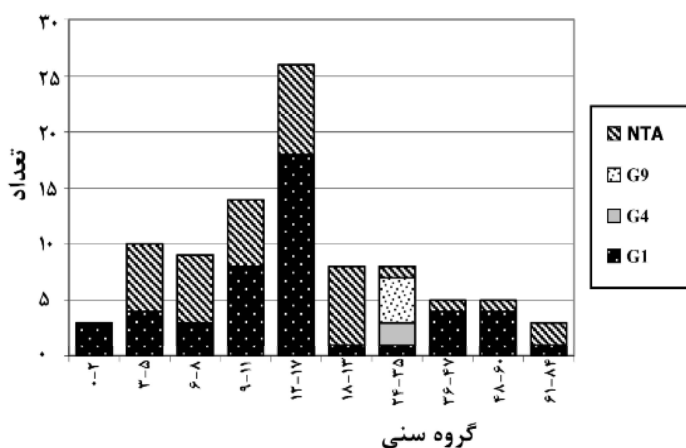
۳۷۵ نمونه مدفوع اسهالی از کودکان کمتر از ۷ سال بستری شده در بیمارستان ۱۷ شهریور برازجان به دلیل گاستروانتریت حاد جمع‌آوری گردید. از این تعداد ۱۵۶ نفر دختر (۴۱/۶۰ درصد) و ۲۱۹ نفر پسر (۵۸/۴۰ درصد) بودند. از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، با تکنیک الیزا ۹۱ مورد (۲۴/۲۷ درصد) از نظر وجود آنتی‌ژن گروه A روتاویروس مثبت ارزیابی گردید. ژنوتایپ نمونه‌های مثبت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش Nested RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

مرحله دوم PCR انجام شد. در این مرحله توالی‌های کوچکتر واقع درون محصول مرحله اول تکثیر می‌یابد و به این ترتیب قطعاتی با طول ۸۸۵ bp، ۷۴۹ bp، ۶۲۵ bp، ۵۸۳ bp، ۳۸۷ bp، ۳۷۴ bp، ۳۰۶ bp و ۲۶۶ bp ایجاد می‌گردد که به ترتیب نمایانگر ژنوتایپ‌های G1، G8، G2، G4، G10، G3، G9 و G12 می‌باشد. در مرحله آخر، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR مرحله دوم به ژل آگاروز ۲ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ترانس لومیناتور (UV Transilluminator) مورد بررسی قرار گرفت (۲۱ و ۲۲).

#### آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) ویرایش ۱۷ آزمون‌های آماری مربع کای، آنالیز

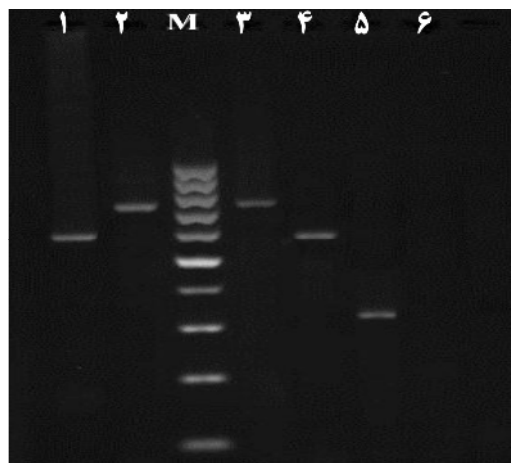
سنی رابطه معنی‌داری وجود ندارد ( $P=0/662$ ). بیشترین فراوانی در جنس مؤنث مربوط به ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ (۱۸/۶۸ درصد) و در جنس مذکر مربوط به ژنوتایپ G1 (۳۷/۳۶ درصد) بود. با انجام آزمون مربع کای هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین جنسیت و جداسازی ژنوتایپ‌ها دیده نشد ( $P=0/093$ ).



نمودار (۱) توزیع فراوانی مطلق ژنوتایپ‌های جدا شده با روش Nested RT-PCR بر اساس گروه سنی

بیشترین ژنوتایپ جداسازی شده در فصل بهار مربوط به ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ (۴/۴۰ درصد) و در فصول پاییز و زمستان به ترتیب با فراوانی ۲۸/۵۷ درصد و ۱۹/۷۸ درصد مربوط به ژنوتایپ G1 بود. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص گردید که بین ژنوتایپ‌های جدا شده و فصول مختلف ارتباط معناداری وجود ندارد ( $P=0/982$ ). نتایج پژوهش نشان داد که علائم بالینی مورد بررسی در ژنوتایپ‌های G1 و غیرقابل تایپ در مقایسه با سایر ژنوتایپ‌های جداسازی شده شدیدتر می‌باشد (جدول ۲).

با استفاده از آزمون دقیق فیشر مشخص گردید که بین هیچ‌یک از علائم بالینی مورد بررسی و ژنوتایپ‌های



شکل (۱) نمایش ژنوتایپ‌های شناسایی شده با روش RT-PCR (ستون‌های ۱ و ۲) ژنوتایپ G4 (۵۸۴bp)، (M) سایز مارکر (۱۰۰bp)، (ستون‌های ۳ و ۴) ژنوتایپ G1 (۷۴۹bp)، (ستون ۵) ژنوتایپ G9 (۳۰۶bp) و (ستون ۶) کنترل منفی را نشان می‌دهد.

در بعضی از نمونه‌ها هیچ‌گونه بانندی با استفاده از پرایمرهای مورد بررسی دیده نشد که در نتایج یاد شده از آنها به عنوان غیرقابل تایپ (non typeable) نام برده شده است. بیشترین فراوانی ژنوتایپ‌های روتاویروسی جدا شده مربوط به ژنوتایپ‌های G1 و غیرقابل تایپ بود که به ترتیب ۵۱/۶۵ درصد و ۴۱/۷۶ درصد از نمونه‌های مثبت را تشکیل می‌دادند و پس از آن‌ها ژنوتایپ‌های G9 و G4 به ترتیب با فراوانی ۴/۴۰ درصد و ۲/۲۰ درصد قرار داشتند.

در این پژوهش ژنوتایپ‌های G2، G3، G8، G10 و G12 در هیچ‌یک از موارد شناسایی نشدند. بیشترین فراوانی ژنوتایپ‌های جدا شده (۲۸/۵۷ درصد) مربوط به گروه سنی ۱۷-۱۲ ماه بود و کمترین موارد شناسایی در گروه سنی ۰-۲ و ۶۱-۸۴ (هر کدام با فراوانی ۳/۳۰ درصد) مشاهده شد (نمودار ۱).

اما با استفاده از آزمون آنالیز واریانس مشخص گردید که بین ژنوتایپ‌های شناسایی شده و گروه

شناسایی شده ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

جدول ۲) توزیع فراوانی مطلق و نسبت علایم بالینی ایجاد شده توسط ژنوتایپ‌های جدا شده با روش Nested RT-PCR

ژنوتایپ علایم بالینی	G <sub>1</sub> تعداد(%)	G <sub>4</sub> تعداد(%)	G <sub>9</sub> تعداد(%)	N.T.A تعداد(%)	جمع کل تعداد(%)
اسهال	۴۵(۴۹/۴۵)	۲(۲/۲۰)	۳(۳/۳۰)	۳۳(۳۶/۲۶)	۸۳(۹۱/۲۱)
استفراغ	۳۱(۳۴/۰۷)	۱(۱/۱۰)	۳(۳/۳۰)	۲۴(۲۶/۳۷)	۵۹(۶۴/۸۳)
تب	۲۶(۲۸/۵۷)	۱(۱/۱۰)	۱(۱/۱۰)	۲۱(۲۳/۰۸)	۴۹(۵۳/۸۵)
تشنج	-	-	-	-	-
کرامپ شکمی	۳۰(۳۲/۹۷)	۲(۲/۲۰)	۲(۲/۲۰)	۱۷(۱۸/۶۸)	۵۱(۵۶/۰۴)
دهیدراتاسیون شدید	۱۱(۱۲/۰۹)	۱(۱/۱۰)	۱(۱/۱۰)	۹(۹/۸۹)	۲۲(۲۴/۱۸)
دهیدراتاسیون متوسط	۲۹(۳۱/۸۷)	-	۳(۳/۳۰)	۲۰(۲۱/۹۸)	۵۲(۵۷/۱۴)
دهیدراتاسیون خفیف	۷(۷/۶۹)	۱(۱/۱۰)	-	۹(۹/۸۹)	۱۷(۱۸/۶۸)

## بحث

(۱۶-۱۴ و ۳۱). اما نتایج ما نشان داد که میزان جداسازی روتاویروس در شهر برازجان (۲۴/۲۷ درصد) از سایر مناطق مورد بررسی در ایران کمتر است. شاید دلیل این امر شرایط خاص اقلیمی و گرمسیر بودن منطقه مورد پژوهش باشد. در بیشتر پژوهش‌های انجام شده در مناطق مختلف جهان، G<sub>1</sub> به‌عنوان غالب‌ترین ژنوتایپ جداسازی شده گزارش شده است. به‌عنوان نمونه در سال‌های اخیر میزان جداسازی ژنوتایپ G<sub>1</sub> در کشورهای ژاپن (۱۰)، سوئیس (۲۸)، برزیل (۲۹)، تایوان (۳۲)، استرالیا (۳۳)، آفریقای جنوبی (۳۴) و نیز شهرهای تهران و شهرکرد در ایران (۱۷) بین ۲۹ تا ۸۲ درصد بوده که این میزان جداسازی با نتایج این پژوهش (۵۱/۶۵ درصد) مطابقت دارد. بررسی‌های انجام شده بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۵ نشان داده که ژنوتایپ G<sub>2</sub> در کشورهای آرژانتین (۱۷)، ایتالیا (۳۵)، بنگلادش (۳۶) و ژنوتایپ G<sub>3</sub> در فرانسه (۱۷)، چین (۲۵) و کره جنوبی (۲۷) غالب‌ترین ژنوتایپ‌های در گردش می‌باشند. اما در این پژوهش هیچ‌کدام از ژنوتایپ‌های یاد شده جداسازی نگردید. همچنین نتایج پژوهش‌های انجام شده در سال‌های

بیماری‌های اسهالی یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده سلامت نوزادان و کودکان کم سن و سال ایران و سایر کشورهای در حال توسعه هستند (۲۳). روتاویروس‌ها یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد گاستروانتریت حاد در کودکان کمتر از ۵ سال در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته می‌باشند (۱۷). سازمان بهداشت جهانی به‌دلیل میزان قابل توجه مرگ و میر ناشی از اسهال روتاویروسی برنامه مدونی را به‌منظور پایش این ویروس تدوین نموده است. پایش مستمر در تمامی کشورهای دنیا می‌تواند به شناسایی ژنوتایپ‌های در حال چرخش کمک نماید. بدین ترتیب شرایط لازم برای برنامه‌ریزی واکسیناسیون همگانی کودکان در مناطق مختلف جهان فراهم خواهد شد. در اغلب پژوهش‌های انجام شده در مناطق مختلف دنیا شیوع گاستروانتریت روتاویروسی بین ۱۴ تا ۵۰ درصد گزارش شده است (۲۹، ۱۰-۲۴). همچنین پژوهش‌های قبلی ما در شهرهای تهران، شیراز، مرودشت و جهرم (۱۷، ۲۰، ۲۲ و ۳۰) و سایر پژوهش‌ها در شهرهای مختلف ایران نشان داده که متوسط شیوع عفونت بین ۲۸ تا ۶۱ درصد می‌باشد

تایپ را به ترتیب در ۲۱/۹۷ درصد، ۳۰/۶۶ درصد و ۳۱/۲۵ درصد موارد شناسایی نمودیم که از نظر فراوانی به نتایج دست آمده در این پژوهش نزدیک می‌باشد.

به دلیل گزارش ژنوتایپ‌های G10 در برخی از کشورهای دنیا مانند آمریکا، هند، پاراگوئه و انگلیس و G12 در فیلیپین، ژاپن، آرژانتین و برزیل به عنوان ژنوتایپ‌های نادر (۱۳) و نیز با توجه به شیوع ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ در پژوهش‌های قبلی، در این مطالعه برای اولین بار پرایمرهای اختصاصی ژنوتایپ‌های G10 و G12 را برای شناسایی ژنوتایپ‌های بیشتر مورد استفاده قرار دادیم. اما هیچ‌کدام از ژنوتایپ‌های یاد شده در این پژوهش مشاهده نگردید. پس بدین ترتیب این احتمال وجود دارد که فراوانی قابل توجه ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ در ایران به دلیل نوترکیبی ژنتیکی بین ژنوتایپ‌های مختلف و یا بین سویه‌های انسانی و حیوانی باشد. از طرفی این احتمال وجود دارد که پرایمرهای مورد استفاده با وجود تأیید سازمان بهداشت جهانی، برای شناسایی ژنوتایپ‌های در حال گردش در ایران حساسیت لازم را ندارند. به همین دلیل ارزیابی هم‌زمان چند نوع پرایمر مختلف برای هر ژنوتایپ و همچنین تعیین توالی ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ پیشنهاد می‌گردد.

در پژوهش‌های انجام شده در کشورهای فرانسه، آلمان، ایتالیا و استرالیا ژنوتایپ G8 به عنوان یکی از ژنوتایپ‌های جداسازی شده (۱۳) و در کشور مالی به عنوان دومین ژنوتایپ رایج گزارش شده است (۱۷). ما نیز برای اولین بار در پژوهش‌های قبلی طی سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۷ در تهران (۱۷) این ژنوتایپ را به صورت منفرد و در شیراز (۲۰) و مرودشت (۲۲)

۲۰۰۴ تا ۲۰۰۷ در ایتالیا (۳۵) و آلمان (۳۷) نشان داد که G4 غالب‌ترین ژنوتایپ شناسایی شده می‌باشد. در ایران نیز بررسی‌های مشابه در شهرهای تبریز (۱۴) و جهرم (۳۰) نشان‌دهنده شیوع بیشتر ژنوتایپ G4 می‌باشد. اما میزان جداسازی این ژنوتایپ در پژوهش ما (۲/۲۰ درصد) از سایر ژنوتایپ‌های جداسازی شده کمتر بود.

پایش گاستروانتریت روتاویروسی در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ در کشورهای تایلند (۲۵)، آلبانی (۳۵) و بلژیک (۳۸) نشان داده که G9 غالب‌ترین ژنوتایپ در حال گردش بوده است. در حالی که در پژوهش حاضر میزان جداسازی این ژنوتایپ بسیار کم بود. اما نکته قابل تأمل پیدایش سریع این ژنوتایپ در بسیاری از کشورهای دنیا می‌باشد.

با توجه به اینکه ژنوتایپ‌های G1 تا G4 در برنامه متداول واکسیناسیون اصلی‌ترین ترکیب واکسن‌های پیشنهادی هستند از نظر برنامه واکسیناسیون همگانی، شیوع ناگهانی G9 حائز اهمیت است. از طرفی پژوهش‌های انجام شده در کشورهای مختلف دنیا نشان می‌دهد که شیوع ژنوتایپ‌ها فصلی، منطقه‌ای و اقلیمی است. از این رو ضرورت پایش مستمر عفونت روتاویروسی برای اطلاع دقیق از سویه‌های در حال گردش در مناطق مختلف جهان وجود دارد. یکی از ویژگی‌های قابل توجه نتایج ما در این پژوهش، فراوانی بالای (۴۱/۷۶ درصد) جداسازی ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ بود. که این امر می‌تواند به علت وجود سویه‌های جدید، عدم استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژنوتایپ‌های غیرمعمول، نتایج مثبت کاذب روش الایزا و نقص در روش RT-PCR باشد (۲۱).

ما در پژوهش‌های قبلی در شهرهای تهران (۱۷)، جهرم (۱۸) و شیراز (۲۰) نیز ژنوتایپ‌های غیرقابل

در منطقه مورد پژوهش وجود دارد. اجتناب از تماس نزدیک با کودکان آلوده، به‌ویژه در خانواده‌های پرجمعیت، به‌مقدار زیادی خطر سرایت عفونت روتاویروسی را کاهش می‌دهد اما از آنجائی که رعایت اصول بهداشت در میزان شیوع اسهال روتاویروسی نقشی ندارد، اقدام اصلی سازمان بهداشت جهانی برای کنترل عفونت واکسیناسیون می‌باشد (۸).

اولین واکسن روتاویروسی که مجوز استفاده از آن صادر گردید روتاشیلد (Rotashield) بود اما به‌دلیل امکان ارتباط این واکسن با انسداد یا کلاپس روده تجویز آن ۱۴ ماه پس از عرضه‌اش متوقف گردید. در سال ۲۰۰۶، دو واکسن خوراکی Rotarix و RotaTeq برای پیشگیری از عفونت‌های گروه A روتاویروس تولید گردید که پس از اثبات کارایی مناسب در پیشگیری و کاهش اسهال شدید روتاویروسی، سازمان بهداشت جهانی استفاده از آنها را به‌تمامی کشورها توصیه کرده است (۸).

در مجموع نتایج ما شیوع نسبتاً بالای عفونت روتاویروسی را در کودکان کمتر از ۷ سال شهر برازجان نشان می‌دهد. بنابراین ایمن‌سازی کودکان در معرض خطر، می‌تواند در کنترل و پیشگیری از انواع شدید بیماری و همچنین صرفه‌جویی در هزینه‌های درمانی و بالینی مؤثر باشد. غیرقابل تایید بودن تعداد زیادی از نمونه‌ها در این پژوهش ضرورت بکارگیری روش‌های دقیق‌تری مانند تعیین توالی، استفاده از سایر پرایمرها و نیز تعیین ژنوتایپ‌های غیرمعمول به‌کمک سایر پرایمرهای اختصاصی را جهت کسب اطلاعات بیشتر در مورد این ژنوتایپ‌ها مطرح می‌سازد.

به‌صورت مخلوط با ژنوتایپ‌های G1، G2 و G3 گزارش نمودیم. اما این ژنوتایپ به‌صورت منفرد و یا مخلوط در شهر برازجان شناسایی نگردید. بیشترین شیوع عفونت روتاویروسی در کشورهای نروژ (۲۶)، سوئیس (۲۸)، استرالیا (۳۳) و شهرهای تبریز (۱۴)، شیراز (۲۰) و تهران (۳۹) مربوط به‌گروه سنی کمتر از ۲ سال بوده است. نتایج ما نیز نشان داد که بیشترین شیوع ویروس در گروه سنی ۱۲ تا ۱۷ ماه می‌باشد.

میزان قابل توجه اسهال روتاویروسی در این گروه سنی ضرورت واکسیناسیون در کودکان زیر ۲ سال را نشان می‌دهد. بررسی‌های انجام شده در مناطق معتدل حاکی از این است که بیشترین شیوع عفونت روتاویروسی در فصول سرد سال مشاهده می‌شود. اما در کشورهای واقع در نواحی گرمسیری این عفونت در تمام فصول سال مشاهده می‌شود و هیچ ارتباط فصلی در این زمینه وجود ندارد و یا حداقل ارتباط کمی در این مورد گزارش شده است.

بررسی‌های انجام شده در کشورهای آمریکا (۲۴)، استرالیا (۳۳) و شهرهای مختلف ایران مانند مازندران (۱۵)، اصفهان (۱۶)، تهران (۱۷ و ۳۹)، جهرم (۱۸) و شیراز (۲۰) نشان می‌دهد که شیوع عفونت مشابه با مناطق دارای آب و هوای معتدل است. یافته‌های ما نیز در این پژوهش نشان داد که بین جداسازی ویروس و فصول سرد سال اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به‌این‌صورت که بیشترین عفونت روتاویروس مربوط به فصول سرد سال بود.

اما این سؤال مطرح می‌شود که چرا برخلاف سایر پژوهش‌های انجام شده در مناطق گرمسیری، در بررسی ما این بیماری در فصول سرد سال شیوع بیشتری دارد؟ برای پاسخ دقیق به این پرسش، ضرورت انجام پایش‌های مشابه در چندین سال متوالی



## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به دلیل حمایت‌های مالی و

اجرایی و همچنین از جناب آقای دکتر حسن شفیعی و مهدی کارگر به دلیل همکاری و مشاوره علمی کمال امتنان را دارند.

## References:

- Mascarenhas J, Lima CS, de Oliveira DS, et al. Identification of two sub lineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Para' State, Brazil. *J Med Virol* 2010; 82: 712-9.
- Ospino DU, Young G, Navarro OA. Viral gastroenteritis and diversity of rotavirus strains in Colombian children: a systematic review. *J Infect Developing Countries* 2008; 2: 99-105.
- Sa'fadi MA, Berezin EN, Munford V, et al. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 1-4.
- Taremi M, Farahtaj F, Gachkar L, et al. Epidemiological study of rotavirus infection in children less than 5 years old with acute gastroenteritis in Tehran, during 1383-1384. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2007; 10: 20-8.
- Clark HF, Lawley DA, Mallette LA, et al. Decline in cases of rotavirus gastroenteritis presenting to The Children's Hospital of Philadelphia after introduction of a pentavalent rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 382-6.
- Cheung W, Gill M, Esposito A, et al. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol* 2010; 84: 6782-98.
- Shim SY, Jung YC, Le VP, et al. Genetic variation of G4P[6] rotaviruses: evidence for novel strains circulating between the hospital and community. *J Med Virol* 2010; 82: 700-6.
- Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 198-208.
- Castello AA, Arguelles MH, Rota RP, et al. Detection and Characterization of group C rotavirus in Buenos Aires, Argentina, 1997-2003. *J Med Virol* 2009; 81: 1109-16.
- Dey SK, Thongprachum A, Ota Y, et al. Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 955-61.
- Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 1918-58.
- Tatte VS, Gentsch JR, Chitambar SD. Characterization of group A rotavirus infections in adolescents and adults from Pune, India: 1993-1996 and 2004-2007. *J Med Virol* 2010; 82: 519-27.
- Carmona R, Timenetsky M, Morillo SG, et al. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 963-8.
- Sanaei M, Radpour H, Steghamati AA, et al. A Survey on prevalence and genotyping rotavirus in children with acute gastroenteritis in Tabriz. *J Kurdistan Univ Med Sci* 2009; 13: 69-77.
- Hamkar R, Yahyapour Y, Noroozi M, et al. Prevalence of viral agents in children with acute gastroenteritis in Mazandaran province during 1383-1384. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2008; 12: 35-40.
- Kazemi A, Tabatabaie F, Agha-Ghazvini MR, et al. The role of rotavirus in acute pediatric diarrhea in Isfahan, Iran. *Pak J Med Sci* 2006; 22: 282-5.
- Kargar M, Zareei B, Tabatabaei H, et al. Genotyping of VP7 protein with nested RT-PCR in children hospitalized in Tehran. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2008; 12: 11-7.
- Kargar M, Akbarizadeh A, Yaghoobi R. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Jahrom. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2010; 12: 15-21.
- Kargar M, Zare M. High frequency of mixed genotypes rotavirus among children hospitalized with acute gastroenteritis in Marvdasht during 2007-2008. *J Infect Dis Trop Med* 2010; 15: 1-5.
- Kargar M, Jafarpour T, Najafi A. Epidemiological survey of group A rotaviruses infection among children less than 5 years with acute diarrhea in Shiraz, 2006-2007. *Zahedan J Res Med Sci* 2011. [ahead of print].

21. World Health Organization. Manual of rotavirus detection and characterization methods. (Accessed in Oct 2009, 17 at [www.who.int/vaccines-documents/](http://www.who.int/vaccines-documents/)).
22. Kargar M., Zare M., Najafi A. High prevalence of mixed rotavirus infections in children hospitalized in Marvdasht Motahary hospital, Iran during 2007-2008. *Iranian J Pediatr* 2011. [ahead of print]
23. Ebrahimi AA, Ebrahimi S, Aghouli M. Survey of resistance rate of *Shigella* species isolated from children with diarrhea Fasa, Summer, 1383. *Iranian South Med J* 2009; 12: 225-30.
24. Payne D, Stat M, Edwards K, et al. Active, population-based surveillance for severe rotavirus gastroenteritis in children in the United State. *Pediatrics* 2008; 122: 1235-43.
25. Nelson EA, Bresee JS, Parashar UD, et al. Rotavirus epidemiology: the Asian rotavirus surveillance network. *Vaccine* 2008; 26: 3192-6.
26. Flem E, Vainio K, Dollner H, et al. Rotavirus gastroenteritis in Norway: analysis of prospective surveillance and hospital registry data. *Scand J Infect Dis* 2009; 41: 753-9.
27. Huh JW, Kim WH, Yoon MH, et al. Genotypic distribution of rotavirus strains causing severe gastroenteritis in Gyeonggi province, South Korea, from 2003 to 2005. *Arch Virol* 2009; 154: 167-70.
28. Lacroix L, Galetto-Lacour A, Altwegg M, et al. Disease burden of rotavirus gastroenteritis in children up to 5 years of age in two Swiss cantons: pediatrician and hospital-based surveillance. *Eur J Pediatr* 2010; 169: 319-25.
29. Santos JS, Alfieri AF, Leite JPG, et al. Molecular epidemiology of the human group A rotavirus in the Paraná State, Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 2008; 51: 287-94.
30. Kargar M., Akbarizadeh AR. Prevalence and molecular genotyping of group A rotaviruses in Iranian children. *Indian J Virol* 2011. [ahead of print].
31. Kazemi A, Zomorodi-Sofiani A, Esmail Zadeh A, et al. The comparison of clinical and laboratory findings in gastroenteritis of rotavirus and others etiology in 2 months to 5 years old admitted patients, Zanjan 1383. *J Zanjan Univ Med Sci* 2007; 14: 32-8.
32. Mast TC, Chen PY, Lu KC, et al. Epidemiology and economic burden of rotavirus gastroenteritis in hospitals and pediatric clinics in Taiwan, 2005-2006. *Vaccine* 2010; 28: 3008-13.
33. Kirkwood CD, Cannan D, Boniface K, et al. Australian rotavirus surveillance program: annual report, 2006-2007. *Commun Dis Intell* 2007; 31: 375-9.
34. Sanchez-Padilla E, Grais RF, Guerin PJ, et al. Burden of disease and circulating serotypes of rotavirus infection in sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 567-76.
35. Annarita P, Grassi T, Donia D, et al. Detection and molecular characterization of human rotaviruses isolated in Italy and Albania. *J Med Virol* 2010; 82: 510-8.
36. Dey SK, Hayakawa Y, Rahman M, et al. G2 Strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 91-4.
37. Damme PV, Giaquinto C, Maxwell M, et al. Rotavirus genotypes in Europe 2004-2005: The reveal study. *J Infect Dis* 2007; 19: 1-5.
38. Rahman M, Matthijnsens J, Goegebuer T, et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *J Clin Virol* 2005; 33: 1-6.
39. Modarres SH, Rahbari Manesh AA, Modarres SH, et al. The role of rotavirus in acute gastroenteritis and molecular epidemiology pattern of rotavirus infection in hospitalized children in Tehran. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2005; 10: 21-7.