

تعیین الکتروفوروتایپ روتاویروس‌های عامل اسهال در اطفال زیر دو سال مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهرهای تهران و زاهدان

دکتر مهدی صائب^۱، عبدالوهاب مرادی^۲، دکتر طلعت مختاری آزاد^۳ و دکتر جواد ساجدیان‌فرد^۴

خلاصه

عفونت‌های روتاویروسی یکی از عوامل ایجاد گاستروانتریت در کودکان و شیرخواران است. در این تحقیق از ۴۵۰ نمونه مدفوع اسهال کودکان زیر ۲ سال شهرهای تهران و زاهدان، ۷۳ نمونه که با روش ELISA بیش از ۲+ بودند انتخاب گردید. در ۵۶ نمونه، الگوهای مشخص الکتروفوروتایپ روتاویروس توسط روش SDS-PAGE تعیین شد که از این تعداد ۸ نمونه مربوط به زاهدان و ۴۸ نمونه دیگر مربوط به تهران بود. در نمونه‌های تهیه شده از زاهدان ۵ الگوی متفاوت الکتروفوروتایپ L (۷۱/۵٪) و ۲ مورد الکتروفوروتایپ S (۲۸/۵٪) از روتاویروس گروه A شناسایی گردید، همچنین الگوهای الکتروفوروتایپ تهران دربرگیرنده ۳۶ الکتروفوروتایپ L با ۲۶ الکتروفوروتایپ متفاوت (۷۶/۵٪) و ۱۲ الکتروفوروتایپ S با ۸ الکتروفوروتایپ متفاوت (۲۳/۵٪) بود. به علاوه در تهران یک الکتروفوروتایپ مخلوط L و S و دو مورد حرکت غیرطبیعی ژنوم روتاویروس با طرح ۲ و ۳ و ۳ و ۴ تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد الگوهای مختلف الکتروفوروتایپ شناسایی شده در تهران و زاهدان در مقایسه با سایر کشورهای جهان از تنوع بیشتری برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: روتاویروس، اسهال اطفال، الکتروفوروتایپ

۱- دانشیار بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ۲- مربی، عضو هیأت علمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی زاهدان

۳- دانشیار ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

۴- دامپزشک، عضو هیأت علمی بخش علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

مقدمه

گاستروانتریت کودکان یک بیماری شایع با انتشار جهانی و از نظر بهداشت عمومی از اهمیت خاصی برخوردار است (۵,۸,۱۰,۲۵). یکی از علل عمده مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه مربوط به اسهال و به دنبال آن از دست دادن آب بدن می‌باشد (۱۵).

روتاویروس‌ها جنسی از خانواده رتوویریده (Reoviridae) و عامل اصلی گاستروانتریت شیرخواران و کودکان می‌باشند که در سال ۱۹۷۳ توسط بی‌شاپ (Bishop) و همکاران کشف شدند (۹,۱۸,۱۹,۲۶). روتاویروس‌ها بر اساس خواص آنتی‌ژنتیکی به سه شش‌گروه A-F تقسیم می‌شوند (۶,۱۱,۱۲,۲۰,۲۳). گروه A، خود دارای دو زیرگروه شناخته شده سروتایپ II و I می‌باشد (۱۳,۱۴,۱۷,۲۶). تاکنون سیزده سروتایپ گروه A شناسایی شده که در انسان غالباً سروتایپ‌های یک تا چهار باعث گاستروانتریت می‌شوند. تعداد ژنوم در الگوی الکتروفوروتایپ برای روتاویروس‌های انسانی بر روی ژل الکتروفوروز، ۲ و ۳ و ۲ و ۴ می‌باشد که نشان دهنده دو ژن خیلی کوچک، سه ژن کوچک، دو ژن متوسط و چهار ژن بزرگ می‌باشد. همچنین بر اساس فاصله حرکت دو ژن خیلی کوچک روی ژل، الگوی الکتروفوروتایپ به دو دسته S=short که نشان‌دهنده فاصله کم دو قطعه ژن ۱۰ و ۱۱ و L=long که نشان‌دهنده فاصله زیاد دو قطعه ژن ۱۰ و ۱۱ می‌باشد تقسیم می‌گردد. S در برگزیده سروتایپ شماره دو و L در برگزیده سروتایپ‌های شماره یک و سه و چهار می‌باشد.

اسهال کودکان یک مسأله مهم بهداشتی در ایران به شمار می‌رود. تاکنون مطالعات زیادی در مورد روتاویروس‌ها در ایران انجام نگرفته و در این تحقیق برای اولین بار در کشور ما بررسی الگوهای مختلف الکتروفوروتایپ روتاویروس‌ها انجام می‌گیرد که هدف آن تعیین زیرگروه‌ها، سروتایپ‌ها و الکتروفوروتایپ‌های موجود روتاویروس در تهران و زاهدان می‌باشد و برای شناسایی منشأ اپیدمی‌های روتاویروسی در کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. مشخص نمودن منشأ اپیدمی‌ها از روی الگوی الکتروفوروتایپ، در کشورهایی مانند سوئد، فرانسه (۲۳)، ایتالیا (۲۲,۲۸)، تایلند (۲۱)، ونزوئلا (۲۷)، استرالیا (۴)، غنا (۳)، استونی (۱۶)، برزیل (۲۴) و کره جنوبی به صورت گسترده‌ای، با روش این مطالعه صورت گرفته است.

مواد و روش کار

الف: بیماران

تعداد ۴۵۰ نمونه مدفوع کودکان زیر ۲ سال مبتلا به اسهال از شهریور ماه تا اسفند ماه ۱۳۷۲ از بیمارستان‌های اطفال دانشگاه علوم پزشکی تهران و زاهدان جمع‌آوری گردید. در این مطالعه کودک مبتلا به اسهال بیش از سه بار در روز دفع آبکی یا مدفوع شل داشته و طی بیست و چهار ساعت یک نوبت از وی نمونه‌گیری به عمل آمده است.

ب: شناسایی نمونه‌های مثبت روتاویروس

از ۴۵۰ نمونه مدفوع، سوسپانسیون، در بافر فسفات ۱۰mM به اضافه محلول فیزیولوژیک NaCl با pH مساوی ۷/۴ تهیه و جهت تجسس آنتی‌ژن‌های اختصاصی گروه A روتاویروس‌ها به روش الیزا (ELISA=Enzyme Linked Immunosorbent Assay) و با استفاده از کیت Laboratories North Chicago III Rotazyme Abbott طبق بروشور کمپانی سازنده تحت بررسی قرار گرفت. از مجموع ۱۶۰ نمونه مثبت، نمونه‌هایی که با این روش ۲+ یا بیشتر بودند (۷۳ نمونه) جهت آنالیز ژنوم روتاویروس به روش SDS-PAGE انتخاب گردید. مواد مصرفی در این تحقیق با درجه خلوص بسیار بالا از کمپانی Merk, Sigma و LKB تهیه شده و سیستم الکتروفوروز مدل LKB Broma-Macrodrivel 2301 می‌باشد.

ج: آنالیز ژنوم روتاویروس

جهت تهیه ژنوم روتاویروس، ۰/۲۵ گرم مدفوع با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر استات ۰/۱ مولار با PH=۵ محتوی ۰/۱٪ سدیم دودسیل سولفات مخلوط و سپس با استفاده از فنل - کلروفرم در ۷۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی آن که حاوی ژنوم روتاویروس بود جهت آنالیز به روش SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت (۲۷). جهت رنگ‌آمیزی ژل و ظهور قطعات ژنوم جدا شده از روش نیترات نقره استفاده گردید (۲,۲۲). طبقه‌بندی الگوی الکتروفوروتایپ‌های روتاویروس بر اساس روش Lourenco و همکاران صورت گرفت (۲۱). از نمونه کنترل منفی به عنوان شاهد و از نمونه SA11 به عنوان استاندارد و کنترل مثبت استفاده گردید.

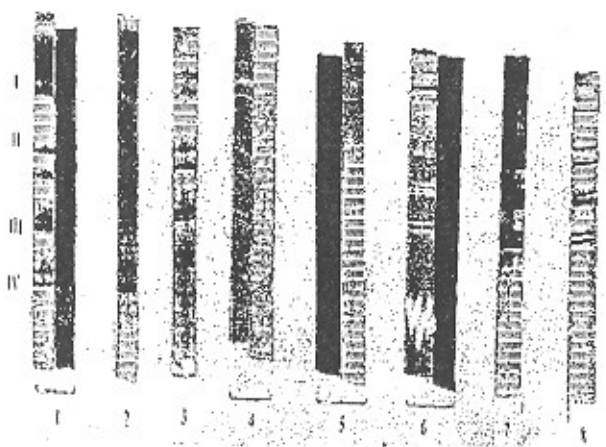
نتایج

در تهران ۸ الگوی متفاوت الکتروفوروتایپ S و ۲۶ الگوی متفاوت نوع I شناسایی گردید (شکل ۳ و ۲). علاوه بر این در تهران یک الگوی الکتروفوروتایپ مخلوط I و S و دو مورد حرکت غیرطبیعی ژنوم روتاویروس که مشابه الگوی ۲ و ۳ و ۲ بود نیز شناسایی گردید (شکل ۴). در جدول ۱ تعداد الکتروفوروتایپ‌های جدا شده و مقایسه آنها با یکدیگر نشان داده شده است.

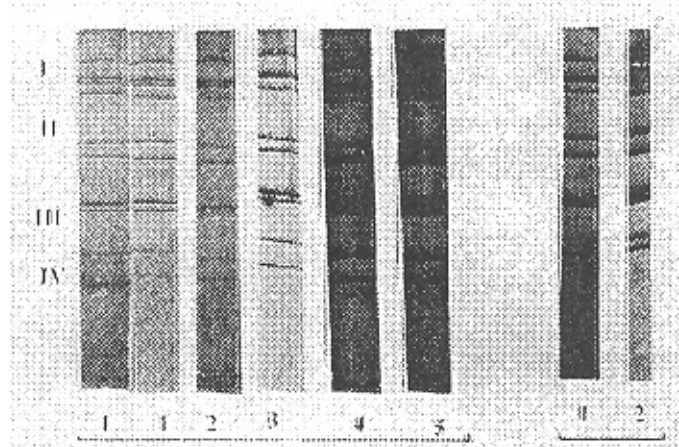
جمعاً ۷۳ نمونه مدفوع با روش الکتروفوروز مورد بررسی قرار گرفت. به رغم بیشتر از ۲۰ بودن هر ۷۳ نمونه، به علت ناکافی بودن مقدار بعضی از نمونه‌ها جهت استخراج ژنوم، فقط در ۵۶ نمونه (۸ نمونه مربوط به زاهدان و ۴۸ نمونه مربوط به تهران) الگوی مشخص الکتروفوروتایپ ظاهر گردید. از نمونه‌های زاهدان دو الگوی متفاوت الکتروفوروتایپ S و ۵ الگوی متفاوت الکتروفوروتایپ I شناسایی شد (شکل ۱).

جدول ۱: فراوانی الکتروفوروتایپ‌های شناسایی شده در شهرهای تهران و زاهدان با استفاده از روش SDS-PAGE با رنگ‌آمیزی تیره

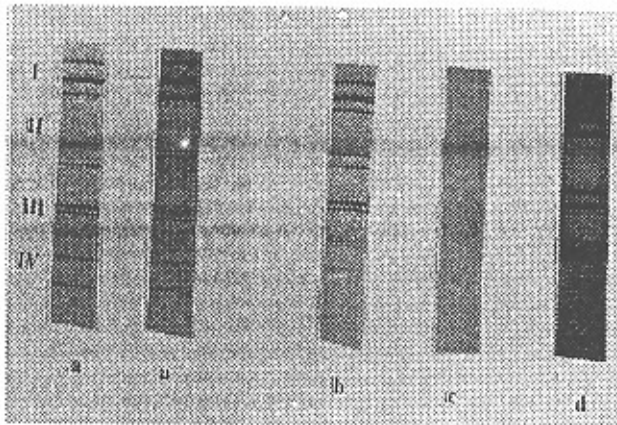
| شهر | | فراوانی الکتروفوروتایپ | | زیرگروه I | | | | زیرگروه II | | | |
|------------------------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|---|------|---|------|--|--|
| | | سر تیب ۲ الگوی S الکتروفوروتایپ | | سر تیب ۱ الگوی I الکتروفوروتایپ | | سر تیب‌های ۱، ۳، ۴ الگوی I الکتروفوروتایپ | | سر تیب‌های ۱، ۳، ۴ الگوی I الکتروفوروتایپ | | | |
| تعداد نمونه آزمایش شده | درصد | تعداد الکتروفوروتایپ | درصد | تعداد نمونه آزمایش شده | درصد | تعداد الکتروفوروتایپ | درصد | تعداد نمونه آزمایش شده | درصد | | |
| تهران | ۱۲ | ۲۵ | ۲۳/۵ | ۳۶ | ۷۵ | ۲۶ | ۷۶/۵ | | | | |
| زاهدان | ۲ | ۲۵ | ۲۸/۵ | ۶ | ۷۵ | ۵ | ۷۱/۵ | | | | |
| جمع | ۱۴ | ۲۵ | ۲۴/۶ | ۴۲ | ۷۵ | ۳۱ | ۷۵/۴ | | | | |



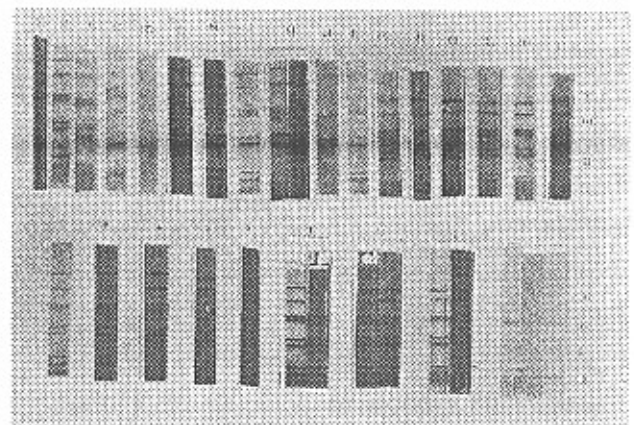
شکل ۲: ۸ نمونه از الگوهای الکتروفوروتایپ نوع S بدست آمده توسط روش SDS-PAGE با رنگ‌آمیزی تیره از نمونه‌های جمع‌آوری شده در تهران



شکل ۱: ۵ نمونه از الگوهای الکتروفوروتایپ نوع S (قسمت الف) و ۲ نمونه از الگوی الکتروفوروتایپ نوع I (قسمت ب) به دست آمده توسط روش SDS-PAGE با رنگ‌آمیزی تیره در نمونه‌های جمع‌آوری شده در زاهدان



شکل ۴: ۲ نمونه از الگوهای الکتروفوروتایپ غیرطبیعی تهران (a)، مخلوط L و S (b)، کنترل منفی (C) و کنترل مثبت SALL (d) که توسط روش SDS-PAGE و با رنگ آمیزی تیره مشخص شده است



شکل ۳: ۲۶ نمونه از الگوهای الکتروفوروتایپ نوع L بدست آمده توسط روش SDS-PAGE با رنگ آمیزی تیره از نمونه های جمع آوری شده در تهران

بحث

مطالعه عفونت های روتاویروسی در ایران قبلاً در تهران و تبریز انجام گرفته است (۲). در مطالعه ای که در تهران و زاهدان انجام گرفت، به ترتیب در ۴۲٪ و حدود ۳۰٪ از کودکانی که با تشخیص اسهال حاد در بیمارستان های کودکان تهران و زاهدان بستری شده بودند، عامل به وجود آورنده اسهال روتاویروسی بود (۱).

شناخت و تشخیص سریع اسهال روتاویروسی در کشور و اقدام برای معالجه - به جز در موارد خاص - نیاز به بستری شدن در بیمارستان ندارد. جایگزینی آب و الکترولیت های از دست رفته بدن، برای معالجه بیمار کافی می باشد که این پیشنهاد از نظر اشغال تخت های بیمارستانی و تحمل هزینه های سنگین درمان در بیمارستان، هم برای خانواده بیمار و هم برای دولت می تواند حائز اهمیت باشد.

از هفت الگوی الکتروفوروتایپ مشخص شده در زاهدان ۲۸/۵٪ آن از نوع S و ۷۱/۵٪ آن از نوع L می باشد. در زاهدان حدود ۷۵٪ اسهال های روتاویروسی توسط زیرگروه II (سروتایپ های ۱، ۳ و ۴) و در حدود ۲۵٪ نیز توسط زیرگروه I (سروتایپ ۲) روتاویروس گروه ۸ انسانی ایجاد می شود. از ۳۶ الگوی الکتروفوروتایپ مشخص شده در تهران ۲۳/۵٪ آن دارای الگوی S و ۷۶/۵٪ آن دارای الگوی L بودند. در تهران نیز حدود ۷۵٪ اسهال های روتاویروسی توسط زیرگروه II و ۲۵٪ آن توسط زیرگروه I روتاویروس گروه ۸ انسانی ایجاد می شود.

بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده میزان بروز اسهال روتاویروسی توسط الگوهای S و L و زیرگروه های I و II در تهران و زاهدان یکسان می باشد و از نظر بروز اسهال روتاویروسی توسط طرح های S و L با سایر نقاط دنیا نیز مطابقت دارد (۷، ۱۴، ۲۳).

در تهران سه الگوی الکتروفوروتایپ خاص شناسایی گردید که یک الگوی آن ترکیبی از الکتروفوروتایپ S و L و دو الگوی دیگر غیرطبیعی و دارای الگوی ۲ و ۳ و ۳ و ۴ می باشند که نیاز به مطالعه بیشتری دارد. احتمالاً موارد غیرطبیعی الگوی الکتروفوروتایپ در نتیجه آلودگی به بیش از یک نوع روتاویروس با الگوی L بوده است. نظیر این مورد در مطالعه ای که در تایلند و برزیل انجام شده نیز مشاهده شده است (۱۶، ۲۶). تعداد الگوی الکتروفوروتایپ شناسایی شده در تهران و زاهدان جمعاً چهل و یک مورد می باشد که در مقایسه با الکتروفوروتایپ های شناخته شده در دیگر نقاط جهان بیشتر است. در مطالعه ای که در استرالیا، تایلند و فرانسه انجام گرفته است به ترتیب تعداد الگوهای الکتروفوروتایپ شناسایی شده ۹، ۲۹ و ۲۶ عدد می باشد (۲۱، ۲۳، ۲۴). به نظر می رسد تنوع الگوی الکتروفوروتایپ در ایران قابل توجه باشد.

با توجه به بررسی الگوهای الکتروفوروتایپ S و L در دو شهر تهران و زاهدان به نظر می رسد الگوی الکتروفوروتایپ شهرهای مختلف متفاوت است. با توجه به اینکه عفونت روتاویروسی به شکل اپیدمی و عفونت های بیمارستانی مطرح

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان برای تخصیص اعتبار لازم جهت اجرای پروژه تحقیقاتی و نیز بخش وپروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران و همچنین مرکز تحقیقات بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌باشد، با استفاده از این روش می‌توان منشأ اپیدمی‌ها و عفونت‌های بیمارستانی مربوط به این ویروس را به سادگی مشخص و کنترل نمود، به علاوه این تکنیک روش دقیقی برای تمایز عفونت‌های روتاویروسی از دیگر عوامل عفونی که باعث گاستروانتریت می‌شوند بوده و کمک مؤثری جهت درمان صحیح بیمار برای پزشکان است.

Summary

Determination of Electrophoretype of Rotaviruses Causative Agents of Diarrhea in Children Under Two Years Old Referred to Tehran and Zahedan Hospitals

M. Saeb¹, PhD; A. Morady², MS; T. Mokhtariadzad³, PhD; and J. Sajedianfard⁴, DVM

1. Associate Professor of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, 2. Instructor, Department of Virology, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran

3. Associate Professor of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran, 4. Department of Basic sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Rotavirus infections are one of the etiological agents of infantile and children's gastroenteritis. In this study 450 fecal samples from children under 2 years old from cities of Tehran and Zahedan were collected. Of these specimens, 73 samples which were considered as moderately positive (++) by ELISA were selected. SDS-PAGE analysis showed fifty six different rotavirus electrophoretotypes from which eight and forty eight patterns belonged to Zahedan and Tehran samples respectively. Basically, from eight patterns of Zahedan samples, five (71.5%) were related to L and two (28.5%) to S rotavirus group A which includes seven different electrophoretotypes. From forty eight patterns of Tehran samples, thirty six belonged to L series with twenty six different electrophoretotypes (76.5) and twelve to S types with eight different electrophoretotypes (23.5%). In addition, a mixed S and L electrophoretotype and two abnormal genom of rotavirus with the pattern of 2 & 3 & 3 & 4 were identified. Different electrophoretotype of rotaviruses in Tehran and Zahedan showed a high diversity in comparison with electrophoretic patterns from other countries.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1997; 4(3): 101-106

Key Words: Rotavirus, Infantile diarrhea, Electrophoretotype, Viral diseases

منابع

1. مرادی، عبدالوهاب. مقایسه شیوع اسهال روتاویروسی در کودکان زیر شش سال مراجعه کننده به بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی تهران و زاهدان، پایان‌نامه دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت. ۷۱-۷۲.
2. Amini S, Solati A, Fayaz A and Mahmoodi M. Rotavirous in children with acute diarrhea in Tehran. *MJIRI* 1990; 4(1): 25-28.
3. Armah GE, Mingle JA, Dodoo AK *et al.* Seasonality of rotavirus infection in Ghana. *Ann Trop paediatr* 1994; 14(3): 223-229.
4. Bishop RF, Unicomb LE and Barnes GL. Epidemiology of human rotavirus

- serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol* 1991; 29(5): 862-868.
5. Bos P, Kirsten M, Cronje RE and Steele AD. Monitoring of rotavirus infection in a paediatric hospital by RNA electrophoresis. *S Afr Med J* 1995; 85(9): 887-891.
 6. Bremont M, Juste-Lasage P, Chabanne-Vautherot D, Charpilienne A and Cohen J. Sequence of the four larger proteins of a porcine group C rotavirus and comparison with the equivalent group A rotavirus proteins. *Virology* 1992; 186(2): 684-692.
 7. Contreras JF, Menchaca GE, Padilla Noriega L *et al.* Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(4): 506-508.
 8. Cook SM, Glass RI, Le Baron CW and Ho M. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull W H O* 1990; 68(2): 171-177.
 9. Cukor G and Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. *Microbiol Rev* 1984; 48(2): 157-179.
 10. Dupuis P, Beby A, Bourgion A, Lussier-Bonneau MD and Agius G. Epidemic of viral gastroenteritis in an elderly community. *Presse Med* 1995; 24(7): 356-358.
 11. Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53(4): 410-449.
 12. Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Field BN(Ed). *Virology*. 2nd ed., New York, Raven Press., 1990: pp329-1352.
 13. Gerna G, Sarasini A, Aristi S *et al* Prevalence of human rotavirus serotypes in some European countries from 1981-1988. *Scand J Infect Dis* 1990; 22(1): 5-10.
 14. Gerna G, Sarasini A, Di Matteo A *et al* Serotype 3 human rotavirus strains with subgroup I specificity. *J Clin Microbiol* 1990; 28(6): 1342-1347.
 15. Ginesberg HS. Reoviruses and epidemic acute gastroenteritis viruses. In: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN and Ginsberg HS (Eds). *Microbiology*. 4th ed., Philadelphia, J. B. Lippincott CO., 1990; pp1075-1088.
 16. Ginevskaya VA, Amitina NN, Eremeeva TP, Shirman GA, Priimagi LS and Drozdov SG. Electropherotypes and serotypes of human rotavirus in Estonia in 1989-1992. *Arch Virol* 1994; 137(1-2): 199-207.
 17. Hermann JE. Rotavirus. In: Bennet MD (Ed). *Principles of infectious disease*. 3rd ed., 1995; pp1234-1239.
 18. Hilpert H. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. *J Infect Dis* 1987; 156(1): 158-166.
 19. Kapikian AZ and Chanock RM. Rotaviruses. In: Field BN(Ed). *Virology*. 2nd ed., New York, Raven Press., 1990; pp1354-1404.
 20. Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS and Thompson JH: *Meical microbiology*. St. Louis, The C.V. Mosby Company., 1990; pp615-628.
 21. Pipittajan P, Kasempimolporn S, Ikegami N, Wasi C and Sinarachatanant P. Molecular epidemiology of rotaviruses associated with pediatric diarrhea in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 1990; 9(3): 617-624.
 22. Ruggeri FM, Marziano ML, Tinari A, Salvatori E and Donelli G. Four year study of rotavirus electrophoretotypes from cases of infantile diarrhea in Rome. *J Clin Microbiol* 1989; 27(7): 1522-1526.
 23. Shif I, Silberstein I, Aboudy Y, Mendelson E, Mates A and Gotlieb-stematsky T. Uniformity of serotype and electrophoretotype in local human rotavirus isolates during each of three successive cold seasons. *Int J Epidemiol* 1992; 21(2): 399-405.
 24. Stewien KE, Mehnert DU, Harsi CM, Stewien ET, Candeias JM and Tanaka K. Serotypes and electrophrototypes of human rotavirus detected in the city of Sao Luis (MA), Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27(6): 1355-1361.
 25. Szucs G, Matson DO, Uj M *et al.* Group A rotavirus G type prevalence in two region of Hungary. *Arch Virol* 1995; 140(10): 1693-1703.
 26. Urasawa T, Taniguchi K, Kobayashi N *et al.* Antigenic and genetic analysis of human rotavirus with dual subgroup specificity. *J Clin Microbiol* 1990; 28(12): 2837-2841.
 27. Urquidi V. Molecular epidemiology of human rotavirus infection in Coro, Venezuela. *Acta Cient Venez* 1989; 40(1): 33-39.
 28. Vial PA, Kotloff KL and Losonsky GA. Molecular epidemiology of rotavirus infection in a room for convalescing newborns. *J Infect Dis* 1988; 157(4): 668-673.