

بررسی فراوانی و ارزیابی بالینی عفونت همزمان روتاویروس با عوامل آدنوویروس و آستروویروس

سید داود موسوی نسب^۱، مصطفی قادری^۲، فاطمه زالی^۳، رجب مردانی^۴، هومن کاغذیان^{۵*}

چکیده

از شش عامل مهم مرگ و میر کودکان و بالغین می باشد (۱). مرگ و میر ناشی از بیماری‌های گاستروانتریتی سالانه در حدود ۳/۵ تا ۵ میلیون مورد تخمین زده می‌شود که بیشترین این تعداد در کشورهای در حال توسعه گزارش شده است (۲). گاستروانتریت ویروسی یکی از شایع ترین بیماری‌ها در تمام گروه‌های سنی در سراسر کره خاکی بوده و سالانه در دنیا بالغ بر ۷۰۰ میلیون مورد بیماری اسهالی در کودکان زیر ۵ سال به وقوع می‌پیوندد (۳، ۴). روتاویروس، نورویروس، آدنوویروس و آستروویروس از عوامل مهم ایجادکننده گاستروانتریت حاد ویروسی در کودکان هستند. روتاویروسها در سراسر دنیا به عنوان مهمترین عامل گاستروانتریت کودکان می باشند (۵-۷).

آدنوویروس‌ها به‌طور معمول می‌توانند در قسمت‌های گوناگونی از بدن مثل مجاری تنفسی، چشم و مجاری گوارشی همانندسازی کرده و ایجاد عفونت کنند. سروتایپ‌های ۴۰ و ۴۱ آدنوویروس در ارتباط با اسهال می‌باشند (۸). عفونت با آستر ویروس فقط محدود به روده کوچک می‌شود. در چندین مطالعه آستروویروس‌های انسانی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل گاستروانتریت در نوزادان و کودکان بعد از روتاویروس‌ها شناسایی شده اند (۹، ۱۰). از مزایای تکنیک PCR نسبت به سایر روش‌های تشخیص عوامل عفونی، حساسیت بالا و اختصاصی بودن می باشد. همچنین ثابت شده است که روش الیزا دارای نتایج مثبت

گاستروانتریت ویروسی یکی از شایع ترین بیماری‌ها در تمام گروه‌های سنی در دنیا بوده و سالانه در دنیا بالغ بر ۷۰۰ میلیون مورد بیماری اسهالی در کودکان زیر پنج سال به وقوع می‌پیوندد. روتاویروس، نورویروس، آدنوویروس و آستروویروس از عوامل مهم ایجادکننده گاستروانتریت حاد محسوب میشوند. با توجه به اهمیت ارزیابی عفونت‌های همزمان در اسهال نوزادان، در این مطالعه فراوانی شیوع عفونت همزمان روتاویروس با عوامل آستروویروس و آدنوویروس و بررسی پارامترهای بالینی از جمله تب، مدت و شدت اسهال در موارد مثبت عفونت همزمان مورد بررسی قرار گرفت. بررسی در این تحقیق عفونت همزمان روتاویروس با عوامل آدنوویروس و آستروویروس در بین ۲۸ نمونه مثبت روتاویروس جمع‌آوری شده از کودکان زیر پنج سال مبتلا به گاستروانتریت مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، فراوانی تعداد عفونت همزمان روتاویروس - آدنوویروس دو مورد و عفونت روتاویروس - آستروویروس در چهار کودک بود. ارزیابی مستندات موجود در پرونده بیماران و ارتباط آن با اهداف مطالعه کنونی نشان می‌دهد که در عفونت مثبت همزمان فقط افزایش طول مدت اسهال گزارش شده و علائم خاصی دیگری از جمله افزایش طول مدت تب و شدت اسهال نبوده است. بر اساس نتایج به دست آمده، تشخیص همزمان عوامل اسهال ویروسی به جهت پیش بینی طول مدت اسهال و احتمال ایجاد سایر علائم بالینی الزامی بوده و در روند درمان میتواند کمک کننده باشد.

واژگان کلیدی: گاستروانتریت، اسهال، روتاویروس، آدنوویروس، آستروویروس

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲

مقدمه

گاستروانتریت حاد از معضلات بهداشتی قرن حاضر و یکی

۱- گروه آربویروس‌ها و تب‌های خونی‌دهنده ویروسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۳- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۵- گروه تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی، انستیتو پاستور، تهران، ایران kaghazianh@pasteur.ac.ir

استفاده قرار گرفت. برای استخراج ژنوم ویروس از کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit شرکت Roche آلمان استفاده گردید. روش استفاده از کیت طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ده درصدی از مدفوع نمونه ها انجام گردید.

انجام تست RT-PCR و ارزیابی محصولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز

آستروویروس یک RNA ویروس بوده و برای ساخت cDNA از کیت RevertAid RT Reverse Transcription Kit شرکت فرمتاز استفاده گردید. بر اساس پروتکل کیت شرکت سازنده، آزمایش رونویسی معکوس شامل بافر 4μl: 5X dNTPs 2μl، رندوم هگزامر: 1μl، M-، RNase MVLVRT(200U): 1μl، یک میکرولیتر بازدارنده RNA، 5μl: RNA و DEPC-water: 5.5μl در دما ۴۲ درجه سانتی گراد و به مدت یک ساعت انجام گردید. دو جفت پرایمر اختصاصی برای انجام واکنش PCR برای آستروویروس و آدنوویروس به صورت جداگانه استفاده گردید که توالی این پرایمرها در جدول شماره یک آمده است. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) از کیت (Amplicon, Denmark) استفاده گردید جهت انجام این واکنش به ترتیب ۵ میکرولیتر از محصول cDNA و DNA که با ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر (۱۰μM) از هرکدام از پرایمرهای ذکر شده و با آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵ میکرولیتر رساندیم. با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر تحت برنامه دمایی ۹۴ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه) برای واسرشتی اولیه و سپس ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه)، ۶۰ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۳۰ ثانیه) و بدنبال آن طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. برای آشکارسازی نتایج PCR از ژل آگارز ۲ درصد

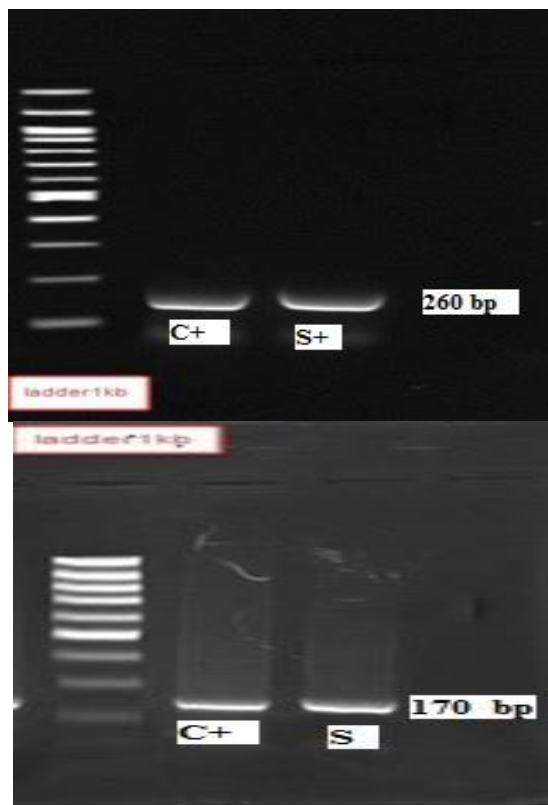
و منفی کاذب می باشد و این روش حساسیت لازم برای انجام دقیق آزمون، بخصوص در مواردی که غلظت ویروس در نمونه کم باشد را ندارد (۱۱، ۱۲). علی رغم ارزیابی عفونت های همزمان اسهال ویروسی و انتروکولیت نکروزکننده در کشور توسط محققین، بررسی عفونت های همزمان روتا ویروس در کودکان میتواند در ارزیابی روند بیماری و طول دوره ی بیماری کمک کننده باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی شیوع عفونت همزمان آستروویروس و آدنوویروس در نمونه های مثبت روتاویروس و مقایسه مشخصات بالینی بیماران از جمله طول مدت اسهال می باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه ی توصیفی و مقطعی بر روی ۲۸ نمونه ی آرشیوی کودکان کمتر از ۵ سال مبتلا به گاستروانتریت روتاویروسی جمع آوری شده در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران در فاصله ی سال های ۹۴ تا ۹۵ از انجام شد. براساس مطالعه قبلی نتایج تست این نمونه برای روتاویروس با روش PCR تایید شده است. اطلاعات مربوط به هر بیمار شامل؛ سن، جنس، طول مدت اسهال و درجه حرارت بدن در پرسشنامه های تنظیم شده ثبت شده است. کد اخلاق از دانشگاه تربیت مدرس به شماره ی 52/5140 جهت اخذ نمونه ها صادر شد.

استخراج ژنوم ویروسی از نمونه های بالینی

رقیق سازی نمونه های مدفوعی به صورت ده درصد توسط محلول PBS انجام گردید. به طور خلاصه ۱۰ گرم یا به اندازه یک نخود نمونه در داخل ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول حل کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد با ۱۲ هزار دور سانتریفیوژ شد. محلول سوسپانسیون رویی حاصل، جهت استخراج RNA مورد



شکل ۱- نتایج حاصل از واکنش PCR

سمت راست: نمونه مربوط به آدنوویروس (S+) و کنترل مثبت (C+) با طول باند 260 bp ، سمت چپ: نمونه های مربوط به آستروویروس (S+) و کنترل مثبت (C+) با طول باند 170 bp

بحث

در مطالعه حاضر شیوع عوامل آدنوویروس و آستروویروس را در ۲۸ نمونه روتاویروس مثبت انجام گردیده و در شش مورد عفونت همزمان مشاهده گردید. برای تشخیص عوامل اسهالی آدنوویروس و آستروویروس از تکنیک مولکولی مبتنی بر PCR استفاده گردید. با مروری بر مطالعات گذشته می توان گفت که این مطالعه اولین گزارش در مورد بررسی عفونت های آستروویروسی و آدنوویروسی به طور همزمان در نمونه های اسهالی مثبت روتاویروسی می باشد. در مطالعات گذشته میزان عفونت همزمان آدنوویروس و روتاویروس در ایتالیا و ترکیه به ترتیب ۱,۳ و ۸ درصد

با ولتاژ ۱۱۰ استفاده شد و نتایج با ژل داگ مشاهده و ثبت گردید (شکل ۱).

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی استفاده شده جهت تکثیر آستروویروس و آدنوویروس

طول محصول	ژن	توالی پرایمر
170 bp	TCT YAT AGA CCG YAT TAT TCA AAT TCY ACA TCR TCA CCA A	Astrovirus
260 bp	GCCACCGABACGTACT TCAGYCTG GGCRGTGCCGAGTAG GGTTTRAA	Adenovirus

نتایج

نتایج مشاهدات نشان می دهد که عفونت همزمان بین روتاویروس و عوامل اسهال ویروسی دیگر وجود دارد. به طوریکه در مورد روتاویروس - آدنوویروس تعداد دو مورد از کودکان و در مورد روتاویروس - آستروویروس در چهار مورد مشاهده گردید. علاوه بر این مستندات موجود در پرونده بیماران و ارتباط آن با اهداف مطالعه کنونی نشان می دهد که نتایج مثبت عفونت همزمان تنها باعث افزایش طول مدت اسهال شده و علائم خاصی دیگری از جمله طول مدت تب و شدت اسهال بوجود نیاورده هست. به طوریکه افزایش تب در این نوزادان محسوس نبوده است. موارد عفونت همزمان به طور کامل در کودکان زیر ۱۲ ماه و در جنس مذکر مشاهده شده است.

ترکیبی و درمان گاستروانتریت توجه می‌کند (۱۸). چندین مطالعه از جمله در ایتالیا، نیجریه و برزیل گزارش کرده اند که عفونت روتاویروس با آدنوویروس نسبت به سایر عوامل ویروسی فراوانی بالاتری دارد اما مطالعه کنونی همانند مطالعه اکداگ و همکاران در هند نشان می‌دهد که همزمانی عفونت روتاویروس با استروویروس نسبت به آدنوویروس دارای فراوانی بیشتری می‌باشد.

مطالعه‌ی انجام شده بر روی ۶۰ کودک مدرسه‌ای به ظاهر سالم در نیجریه بیانگر بروز روتا ویروس در ۳ درصد کودکان، ۳،۳ درصد مبتلا به آدنو ویروس و ۱،۷ درصد آلوده به هر دو عامل بودند. بر اساس نتایج، تفاوت معنی داری در میزان شیوع عفونت تک/همزمان با روتاویروس و آدنوویروس در بین شرکت کنندگان در مطالعه بر اساس سن و جنسیت وجود نداشت. عدم آگاهی از روتاویروس و آدنوویروس، سابقه اسهال، خام خوردن میوه‌ها و سبزیجات شسته نشده، بهداشت ضعیف دست‌ها پس از بازی با اسباب بازی‌ها و همسالان، و عدم رعایت بهداشت معاینات منظم پزشکی برخی از عوامل خطر شناسایی شده در این مطالعه است (۱۹).

برخلاف مطالعات قبلی که انتروکولین نکروزان و ... در عفونت همزمان عوامل اسهال ویروسی گزارش شده در این مطالعه هیچ علائم خاصی از اسهال مربوط به عفونت همزمان آدنوویروسی و استروویروسی مشاهده نگردید. از لحاظ توزیع سنی تمام عفونت‌های همزمان مشاهده شده در بین اطفال زیر ۱۲ ماه مشاهده گردید که این نتایج مشابه با گزارشات Moyo از تانزانیا و اکداگ از هند می‌باشد. این ارتباط سنی می‌تواند به خاطر نبود ایمنی کافی و تماس یا فرو بردن اجسام غیر بهداشتی مختلف در دهان باشد (۲۰).

در بررسی‌های انجام شده قسمت‌های مرکزی ایران، عفونت آدنوویروس‌ها و روتاویروس‌ها به ندرت به‌عنوان

گزارش شده است (۱۳، ۱۴). برخلاف مطالعه‌ای که توسط معتمدی فر در شیراز انجام شده است و عفونت همزمان آدنوویروس و روتاویروس چهار درصد گزارش شده است در مطالعه حاضر فراوانی عفونت آدنوویروسی در نمونه‌های مثبت روتا ویروس ۷،۱ درصد می‌باشد که نشان دهنده شیوع بیشتر عفونت همزمان در مکز مورد مطالعه هست (۱۵). در مطالعه دیگری بیان شده است که اغلب استروویروس به همراه عوامل دیگری شناسایی می‌گردد و این می‌تواند اثر تعاملی این ویروس با سایر عوامل عفونت‌زا باشد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان بروز روتا با استروویروس در مقایسه با آدنوویروس بیشتر بود. در مطالعه مزگانی و همکاران در اهواز نیز میزان عفونت استروویروس در بین نمونه‌های روتا مثبت ۸ درصد بوده است. در مطالعه کنونی شیوع عفونت همزمان استروویروس و روتاویروس ۱۴،۲ درصد گزارش شده است که به نسبت شیوع بالایی دارد (۱۷).

در مطالعه‌ی آکتاش و همکاران در سال ۲۰۱۹، حداقل یک پاتوژن ویروسی در ۵۹،۲ درصد از نمونه‌های مدفوع شناسایی شد. روتاویروس شایع‌ترین عامل مشاهده شده (۳۲،۳ درصد) و پس از آن نورو ویروس (۲۰،۳ درصد)، آدنو ویروس (۹،۶ درصد) و استروویروس (۵،۶ درصد) بود. همه نمونه‌ها از نظر پاتوژن‌های باکتریایی منفی بودند. ۲۷ نمونه (۷،۲ درصد) از نظر کرم‌های روده‌ای و تک یاخته‌ها مثبت بودند. در مجموع ۳۹ عفونت همزمان (۱۰،۴ درصد) شامل ۳۸ مورد دوگانه و ۱ مورد سه‌گانه شناسایی شد. بیشترین میزان عفونت همزمان بین نوروویروس به همراه روتاویروس و نوروویروس به اضافه آدنوویروس مشاهده شد. عفونت‌های منفرد یا همزمان ویروس‌های انتروپاتوژنیک به میزان قابل توجهی در کودکان ارزروم در ترکیه رخ می‌دهد. این مطالعه به ضرورت در نظر گرفتن عفونت‌های ویروسی متعدد در مطالعات روی واکسن‌های

- Utilization Pattern in the Management of Gastroenteritis. *Int J Pharm Pharmacol*. 2017;1.
- Oude Munnink B VdHL. Viruses causing gastroenteritis: the known, the new and those beyond. *Viruses*. 2016;8(2):42-.
 - Liu Y XZ, Zhang Q, Jin M, Yu JM, Li JS, Liu N, Cui SX, Kong XY, Wang H, Li HY. Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed Luminex-based assay. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(7):2384-9.
 - Alsuwaidi AR, Al Dhaheri, K., Al Hamad, S. et al. Etiology of diarrhea by multiplex polymerase chain reaction among young children in the United Arab Emirates: a case-control study. *BMC Infect Dis*. 2021;21(7).
 - Jiang S DH, Chu W. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology*. 2005;51(5):393-8.
 - Koci MD. Immunity and resistance to astrovirus infection. *Viral immunology*. 2005;18(1):6-11.
 - Olortegui MP RS, Yori PP, Salas MS, Trigos DR, Mondal D, Bodhidatta L, Platts-Mills J, Samie A, Kabir F, Lima A. . Astrovirus infection and diarrhea in 8 countries. *Pediatrics*. 2018;141(1).
 - Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2000;38(2):87-91.
 - Lin HC KC, Lu C, Lee C, Chiu T, Lee P, Tseng H, Hsu H, Lee C, Huang L. . Enteric adenovirus infection in children in Taipei. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2000;33(3):176-80.
 - Karampatsas K OL, Seah ML, Tong CY, Prendergast AJ. . Clinical characteristics and complications of rotavirus gastroenteritis in children in east London: A retrospective case-control study. *PloS one*. 2018;13(3).
 - Topkaya AE AB, Ozakkaf F, Chapan N. . Examination of rotavirus and enteric

عوامل مسبب گاستروانتریت یافت شدند. اگرچه گاستروانتریت ویروسی در ناحیه مرکزی ایران فراوانی کمتری نسبت به گاستروانتریت باکتریایی داشت، اما برای درک بهتر بومی بودن واقعی و احتمال شیوع آنتریت ویروسی غیرمنتظره، باید همه عوامل آنتروپاتوژن را برای مدت طولانی‌تری تحت نظر گرفت (۲۱).

از آنجاییکه بیشتر موارد روتاویروس در جنس مذکر بوده است بنابراین بیشتر موارد عفونت همزمان در مورد استروویروس و آدنوویروس در جنس مذکر شناسایی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، تشخیص همزمان چندین عامل اسهال ویروسی به جهت پیش بینی طول مدت اسهال و احتمال ایجاد سایر علائم بالینی ضروری میباشد. با توجه به شیوع اسهال های ویروسی در کودکان، استفاده از روش های سریع مولکولی آزمایشگاهی برای تشخیص سریع چندین عامل اسهال بایستی در نظر گرفته شود. همچنین توصیه به افزایش رعایت بهداشت در کودکان نیز در کاهش عفونت همزمان گاستروانتریت ویروسی موثر می باشد. البته با توجه به محدودیت های مطالعه حاضر از جمله کم بودن تعداد نمونه های روتاویروس مثبت، مطالعه ی تکمیلی پیشنهاد میگردد.

فهرست منابع

- Chow CM LA, Hon KL. Acute gastroenteritis: from guidelines to real life. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2010;3:97-.
- Leung AK RW. Acute Gastroenteritis in Children. *Pediatric Drugs*. 2007;9(3):175-84.
- Clark B MM. A review of viral gastroenteritis. *Current opinion in infectious diseases*. 2004;17(5):461-9.
- Rakesh B HJ. Assessment of Incidence, Clinical Profile, Risk Factors and Drug

- adenovirus in children with acute gastroenteritis. *Turkmikrobiyolcemderg*. 2006;36(4):210-3.
15. Motamedifar M AE, Shirazi PT. Frequency of rotavirus and adenovirus gastroenteritis among children in Shiraz, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013;15(8):729.
 16. Meyer CT BI, Antonio M, Adeyemi M, Saha D, Oundo JO, Ochieng JB, Omore R, Stine OC, Wang D, Holtz LR. Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade Astroviruses in Kenya and The Gambia. *Virology journal*. 2015;12(1):78.
 17. Mozhgani SHR S-ZA, Makvandi M, Kalvandi GR, Shamsi-Zadeh A, Jalilian SH, Parsa-nahad M. Astrovirus and rotavirus co-infections in children with gastroenteritis who were referred to Ahvaz Aboozar Hospital, Southern Iran. *Jundishapur journal of microbiology*. 2012;1:352-4.
 18. Aktash O. A, H., & Timurkan, M. O. A molecular study on the prevalence and coinfections of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in children with gastroenteritis. *Minerva Pediatrica*. 2019;71(5):431-7.
 19. Enitan SS, Ihongbe, J. C., Ochei, J. O., Oluremi, A. S., & Ajulibe, G. E. . Detection of rotavirus and adenovirus Co-infection among apparently healthy school aged children in Ilishan-remo community of Ogun state, Nigeria. *Asian J Pediatr*. 2019:1-12.
 20. Pativada M NS, Ganesh B, Rajendran K, Ramamurthy T, Ganguly S, Bhattacharya MK, Ghosh M, Kobayashi N, Krishnan T. . Emerging trends in the epidemiology of human astrovirus infection among infants, children and adults hospitalized with acute watery diarrhea in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(1):1685-93.
 21. Abbasi E, Mondanizadeh, M., van Belkum, A., & Ghaznavi-Rad, E. . Low frequency of adenovirus, rotavirus, and norovirus in pediatric diarrheal samples from Central Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases, (In Press)*. 2021.