

ارزیابی مولکولی و سرولوژیکی گروه A روتاویروس های جدا شده از اسهال کودکان بستری در بیمارستان های شهرستان جهرم با روش RT-PCR

دکتر محمد کارگر^{۱*}، امین رضا اکبری زاده^{**}، دکتر رامین یعقوبی^{***}

*دانشیار گروه میکروبیولوژی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، **کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم،

***استادیار گروه ویروس شناسی - مرکز تحقیقات پیوند-دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۳ تاریخ تایید: ۸۷/۷/۴

چکیده:

زمینه و هدف: روتاویروس ها به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده گاستروانتریت حاد در کودکان و نوجوانان محسوب می شوند. سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۵ به تمامی کشورهای در حال توسعه شناسایی سروتایپ ها و ژنوتایپ های شایع این ویروس (پایش بیمارستانی) را پیشنهاد نموده است. هدف از این پژوهش، تعیین ژنوتایپ شایع روتاویروس ها با روش RT-PCR در کودکان بستری شده در بیمارستان های شهرستان جهرم به مدت یک سال است.

روش بررسی: در این پژوهش توصیفی-تحلیلی، ۱۶۳ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال شدید بستری شده در دو بیمارستان شهرستان جهرم جمع آوری شد. ابتدا گروه A روتاویروس با روش آنزیم ایمنونواسی (EIA) شناسایی و سپس ژنوتایپ نمونه های مثبت با استفاده از ۹ پرایمر اختصاصی با روش RT-PCR تعیین گردید. نتایج با استفاده از آزمون های مربع کای، t-test و آزمون دقیق فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: از مجموع ۱۶۳ نمونه جمع آوری شده ۷۵ (۴۶٪) مورد با روش الایزا از نظر وجود روتاویروس مثبت ارزیابی شدند. فراوانی ژنوتایپ های G1، G2، G3، G4، G9 و مخلوط (MIX) به ترتیب: ۱۳ (۱۷/۳۳٪)، ۱۰ (۱۳/۳۴٪)، ۲ (۲/۶۷٪)، ۲۳ (۳۰/۶۶٪)، ۲ (۲/۶۷٪) و ۲ (۲/۶۷٪) بود. بیشترین شیوع مربوط به فصل زمستان با فراوانی ۲۲/۶۹٪ و کمترین شیوع مربوط به فصل تابستان با فراوانی ۴/۲۹٪ بود (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: با توجه به شیوع بالای عفونت روتاویروس در جمعیت مورد پژوهش و به دلیل غیر قابل تایپ بودن تعداد زیادی از روتاویروس های جدا شده و همچنین شیوع ژنوتایپ های نادر، انجام پایش گسترده به صورت همزمان در سایر نقاط کشور پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: اسهال، روتاویروس های انسانی گروه A، کودکان بستری، RT-PCR.

مقدمه:

روتاویروسی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته تقریباً مشابه است، اما در کشورهای با سطح درآمد پایین مرگ و میر بیشتر می باشد (۶). مطابق با بررسی های انجام گرفته در مرکز کنترل بیماری ها (CDC) همه کودکان تا قبل از ۲۴ ماهگی حداقل یکبار در زندگی خود مبتلا به گاستروانتریت روتاویروسی می شوند (۷). در کشورهای معتدل شیوع اسهال های روتاویروسی عموماً در فصل زمستان و موارد خیلی کمی از افزایش در فصول دیگر نیز گزارش شده است (۸). طبقه بندی روتاویروس ها بر اساس اختلاف در پروتئین های

روتاویروس ها متعلق به خانواده رتوویریده و دارای هفت گروه عمده می باشند (A-G) (۱). روتاویروس های گروه A مهم ترین عامل اسهال شدید در بین نوزادان و کودکان می باشد (۲،۳). مطالعات اخیر نشان می دهد سالیانه ۶۰۰ هزار کودک به دلیل عفونت روتاویروسی در جهان از بین می روند (۴). همچنین مطالعات اپیدمیولوژی در کشورهای در حال توسعه نشان داده که روتاویروس ها ۶ درصد از کل موارد اسهال مربوط به بچه های بستری در بیمارستانها را تشکیل می دهند (۵). میزان اسهال

سانتی گراد نگهداری شد. برای انجام آزمایش الیزا کف چاهک های پلیت با آنتی بادی پلی کلونال روتاویروسی بر ضد پروتئین VP6 گروه A پوشیده شد. سپس نمونه رقیق شده مدفوع بیمار با آنتی بادی پلی کلونال کونزوگه با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز (Horse radish peroxidase) به چاهک اضافه و پس از یک ساعت سوبسترای آنزیم اضافه گردید. واکنش با افزودن اسید و تغییر رنگ از آبی به زرد متوقف گردید. سپس غلظت رنگ تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

استخراج RNA از محلول RNATM-Pluse شرکت سیناژن برای استخراج RNA استفاده شد. این محلول حاوی ایزوسیانات و فنل می باشد که باعث جدا شدن کپسید از RNA می شود. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از مدفوع بیمار شده را داخل میکروتیوپ ۱/۵ استریل ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول RNATM-Pluse به آن اضافه و پس از مخلوط کردن سریع، به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط فوق افزوده و پس از ۱۵ ثانیه تکان شدید، به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. فاز آبی را به میکروتیوپ استریل دیگری منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه کرده و به آرامی محتویات میکروتیوپ را مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. میکروتیوپ ها را به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ و پس از خارج کردن مایع رویی، ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد را به میکروتیوپ ها افزوده و در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی را دور ریخته و اجازه می دهیم تا اتانول در دمای اتاق خارج و رسوب تقریباً خشک شود. در مرحله آخر RNA استخراج شده را در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر حل کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. برای تهیه cDNA ابتدا مخلوط واکنش شماره ۱ شامل ۲۰ میکرولیتر

کپسید VP7(G) و VP4(P) انجام می گیرد. تاکنون ۱۴ نوع از G تایپ و ۲۱ نوع از P تایپ مختلف در گونه های روتاویروسی های انسانی و حیوانی شناسایی شده است (۹). در تمامی دنیا ژنوتایپ های G1 تا G4 گستردگی بیشتری دارند (۱۰). علاوه بر این ژنوتایپ های دیگری نیز مانند G5، G8، G9 و G10 نیز در کشورهای مختلف گزارش شده است (۱۱). به دلیل مرگ و میر قابل توجه عفونت های اسهال روتاویروس، سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۵ به تمامی کشورها پایش بیمارستانی را برای شناسایی ژنوتایپ های شایع به منظور طراحی واکسن مناسب پیشنهاد نموده است. هدف از این پژوهش، پایش بیمارستانی و تعیین ژنوتایپ های شایع روتاویروسی در دو بیمارستان شهید مطهری و پیمانیه شهرستان جهرم مطابق با پروتکل پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی از آبان ماه ۱۳۸۴ تا مهرماه ۱۳۸۵ جمعاً ۱۶۳ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال بستری در بیمارستان های شهید مطهری و پیمانیه شهرستان جهرم به روش در دسترس تهیه شد. نمونه ها حداکثر ۴۸ ساعت پس از پذیرش مریض و تکمیل پرسشنامه، با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم منتقل گردید.

طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی، نمونه ها به گروه های سنی ۰-۲، ۳-۵، ۶-۸، ۹-۱۱، ۱۲-۱۷، ۱۸-۲۳، ۲۴-۳۵، ۳۶-۴۷ و ۴۸-۶۰ تقسیم بندی شدند تا توزیع فراوانی نمونه ها در کودکان زیر ۵ سال به تفکیک مشخص گردید (۱۲).

تست الایزا: گروه A روتاویروس ها با تست آنزیم ایمنونواسی (EIA) شرکت های IDEIATM و DRG کشور مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور یک سوسپانسیون از نمونه مدفوع در بافر موجود در کیت تهیه و نمونه ها تا قبل از آزمایش در دمای ۲۰- درجه

aET3، aDT4، aAT8، aFT9 به عنوان پرایمرهای (Forward) F و پرایمر End9 به عنوان پرایمر R (Reverse) استفاده می شود. مرحله دوم تکثیر RT-PCR که توالی کوچکتر واقع در درون محصول PCR مرحله اول تکثیر می یابد (جدول شماره ۱).

قطعه مورد انتظار مرحله اول ۱۰۶۲bp می باشد. در حالی که طول قطعات در مرحله دوم PCR، ۸۸۵bp، ۷۴۹bp، ۶۲۵bp، ۵۸۳bp، ۳۷۴bp، ۳۰۶bp بود که به ترتیب نمایانگر ژنوتایپ های G2، G1، G8، G4، G3، G9 می باشد (۱۱).

نمونه هایی که دو نوع ژنوتایپ روتاویروسی با هم تشخیص داده می شد در نتایج به عنوان مخلوط (MIX) معرفی شدند و نمونه هایی که با استفاده از پرایمرهایی مورد بررسی هیچگونه باندی مشاهده نشد، به عنوان غیر قابل تایپ (Non-Typeable=N.T.A) در نظر گرفته شد.

نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون های مربع کای، ANOVA و آزمون دقیق فیشر مورد بررسی قرار گرفت. مرز معنی دار بر روی $P < 0/05$ قرار داده شد.

DMSO، ۲ میکرولیتر بافر ۵x، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر Beg9، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر End9، ۱ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه تهیه و ۸ میکرولیتر از آن به هر میکروتیوب اضافه کرده و سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده به هر کدام از میکروتیوب ها اضافه و در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. سپس بلافاصله آن را بر روی یخ در زیر هود منتقل و ۷ میکرولیتر از مخلوط واکنش شماره ۲ شامل: ۲ میکرولیتر بافر ۵xRT، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، ۰/۵ میکرولیتر باز دارنده RNase و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به آن اضافه و مجدداً، ۶۰ دقیقه در حرارت ۴۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. روش *Nested RT-PCR* در ابتدا با استفاده از جفت پرایمر های خارجی (External) Beg9 و End9 (۱۱) کل قطعه ژن Vp7 تکثیر شده و در طی ۲۸ چرخه متوالی، قطعه مورد نظر با طول ۱۰۶۲ جفت باز تهیه می شود و سپس مقدار کمی از محصول PCR مرحله اول، به عنوان الگو به میکروتیوب دیگر منتقل می شود و با استفاده پرایمرهای داخلی aCT2، aBT1

جدول شماره ۱: توالی و موقعیت پرایمرهای استفاده شده به منظور تعیین ژنوتایپ های روتاویروس

اسم پرایمر	توالی اسید نوکلئیک	موقعیت
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28
End9*	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062- 1036
RVG9	GGTCACATCATACAATTCT	1062- 1044
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTTCG	178-198
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411-435
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709
aFT9	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	757-776

* End9 به عنوان پرایمر: Reverse و بقیه به عنوان پرایمر Forward استفاده شد.

یافته ها:

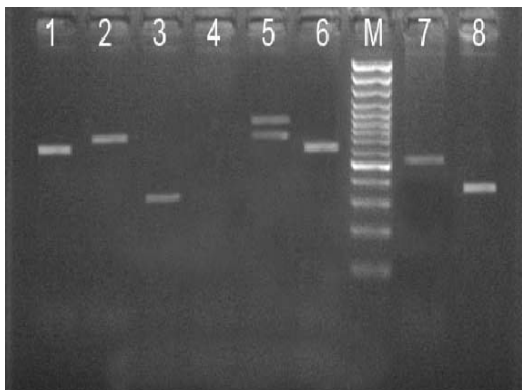
میزان فراوانی ژنوتایپ های G1، G2، G3، G4، G9 و مخلوط (MIX) به ترتیب ۱۷/۳۳، ۱۳/۳۴، ۲/۶۷، ۳۰/۶۶، ۲/۶۷ درصد بود (تصویر شماره ۱). از ژنوتایپ های جداسازی شده G1 در گروه سنی ۱۲ تا ۱۷ ماه (۸/۱) و G4 در گروه های سنی ۶ تا ۸ ماه (۸/۱) و ۱۸ تا ۲۳ ماه (۶/۶۷) و ۲۴ تا ۳۵ ماه (۵/۳۴) بیشترین فراوانی را داشتند (نمودار شماره ۱).

در کودکان آلوده به روتاویروس در این پژوهش، اسهال در ۱۰۰ درصد، استفراغ در ۷۷/۳۴ درصد، تب در ۶۸ درصد و تشنج در ۱۲ درصد دیده شد. با انجام آزمون آماری مربع کای مشخص شد که در تمامی نمونه ها بی که آلوده به روتاویروس بودند نسبت به نمونه های منفی اختلاف معنی داری از نظر علائم کلینیکی استفراغ و تشنج وجود نداشت. اما از نظر علائم بالینی (تب) اختلاف معنی داری به دست آمد. در حالی که با استفاده از آزمون آماری t-test در بین علائم کلینیکی فوق تنها بین ژنوتایپ G1 و تب اختلاف معنی داری یافت شد ($P < 0/01$).

بیشترین فراوانی نمونه های مورد پژوهش در بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب مربوط به گروه سنی ۹-۱۱ ماه (۶/۷۵)، ۲۴-۳۵ ماه (۵/۵۳)، ۸-۱۱ ماه (۶/۱۳) و ۱۲-۱۷ ماه (۹/۸۲) و کمترین فراوانی مربوط به گروه های سنی ۰-۲ ماه (۰/۶۱)، ۱۸-۲۳ ماه (۰/۱۰)، ۳۶-۴۷ ماه (۰/۶۱) و ۴۷-۳۶ ماه (۱/۸۴) بود.

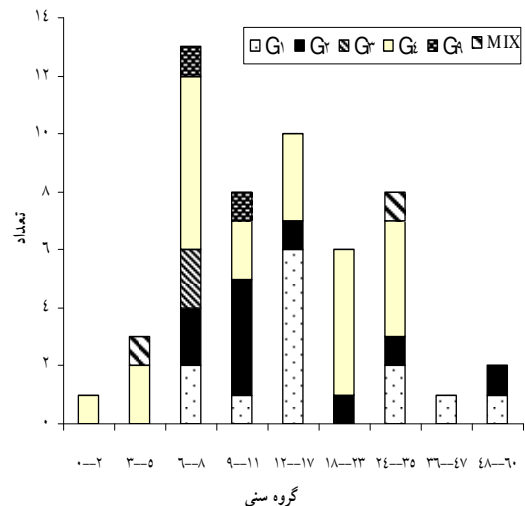
بیشترین نمونه های مورد بررسی مربوط به فصل زمستان و گروه سنی ۱۲ تا ۱۷ ماه (۹/۸۷) بود. با روش الایزا از مجموع ۱۶۳ نمونه، ۷۵ مورد (۴۶/۰۲) از نظر وجود روتاویروس مثبت ارزیابی شدند. میزان جدا سازی این ویروس در جنس مذکر (۲۸/۸۳) و در جنس مؤنث (۱۷/۱۸) بود. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که ارتباط معنی داری بین جداسازی ویروس و جنسیت وجود دارد ($P < 0/01$).

بیشترین شیوع ویروس مربوط به فصل زمستان با فراوانی ۲۲/۶۹ درصد و کمترین شیوع مربوط به فصل تابستان با فراوانی ۴/۲۹ درصد بود. همچنین بین جداسازی ویروس و فصل رابطه معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$).



تصویر شماره ۱: تایپ های G تعیین شده روتاویروس گروه A با روش RT-PCR توسط پرایمرهای اختصاصی، بر روی ژل آگاروز.

M: سایز مارکر. باند ۲: ژنوتایپ G1 (۷۴۹ bp)، باندهای ۱ و ۶: ژنوتایپ G2 (۶۵۲ bp)، باند ۸: ژنوتایپ G3 (۳۷۴ bp)، باند ۷: ژنوتایپ G4 (۵۸۳ bp) و باند ۳: ژنوتایپ G9 (۳۰۶ bp) و باند ۵: ژنوتایپ G1G8



نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی ژنوتایپ های روتاویروس های جدا شده با روش RT-PCR بر اساس گروه سنی بر اساس آزمون ANOVA $P > 0/05$ بین ژنوتیپ های جدا شده در گروه های سنی مختلف

بحث:

و G9 سازمان بهداشت جهانی در برنامه پایش بیماری‌ستانی توصیه استفاده از این پرایمرها را داشته است. مطالعات انجام شده بر روی انتشار تیپ های روتاویروسی در کشورهای مختلف اهمیت تغییرات منطقه ای و موقتی را در چرخش G تایپ ها مشخص می کند. شیوع سروتایپ های غیر معمول در یک منطقه خاص ممکن است در نتیجه بازآرایی (Reassortment) بین روتاویروس های حیوانی و انسانی ایجاد شود. به علاوه ژنوتایپ های ترکیبی نیز ممکن است انتقال بین گونه روتاویروس را بین حیوان و انسان نشان دهد و یا ممکن است سروتایپ غالب در حیوانات یک منطقه به ساکنین مجاور با آن محل، سرایت کرده باشد و در آنها ایجاد بیماری کند. در پژوهش ما توزیع فراوانی ژنوتایپ های G1،G2،G3،G4،G8،G9،MIX به ترتیب ۱۷/۳۳، ۱۳/۳۴، ۲/۶۷، ۳۰/۶۶، ۲/۶۷ و ۲/۶۷ درصد بود. اگرچه در اغلب مناطق دنیا G1 به عنوان ژنوتایپ غالب گزارش شده، اما در سال های مختلف شیوع این ژنوتایپ نوسان داشته است. به عنوان نمونه در فرانسه در طی سال های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۷ ژنوتایپ G1 به عنوان فراوانترین ژنوتایپ معرفی شد، اما در سال های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۸ ژنوتایپ G4 در این کشور غالب بوده است (۱۸) که با پژوهش ما مطابقت دارد. با وجود این که در بیشتر پژوهش های انجام شده در ایران G1 به عنوان ژنوتایپ غالب گزارش شده، ما در این پژوهش G4 را به عنوان ژنوتایپ غالب شناسایی نمودیم که این مساله به دلیل تغییرات ناحیه ای و نوسان در شیوع سویه های مختلف روتاویروسی می باشد. همچنین فراوانی ژنوتایپ G2 در این پژوهش با فراوانی این ژنوتایپ در کردستان عراق (۱۷٪) در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد (۱۵). در فرانسه و غنا در سال ۱۹۹۸، G3 غالب ترین ژنوتایپ شناسایی شده است. اما فراوانی این ژنوتایپ در منطقه مورد پژوهش در کشور ما تنها ۲/۶۷ درصد بود که با فراوانی ژنوتایپ به دست آمده در طی سال های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۶ در استرالیا (۱۹) تقریباً مشابهت

نتایج این پژوهش، مطالعات پیشین در خصوص درگیری کودکان کم سن (زیر ۵ سال) به روتاویروس های گروه A به عنوان مهمترین عامل اسهال حاد در کودکان کشورهای توسعه یافته یا در حال توسعه را تایید می کند. در بررسی های انجام شده در سال های قبل در ایران، روتاویروس از نظر کشت سلولی، RT-PCR، مشاهده با میکروسکوپ الکترونی و الکتروتایپینگ مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفته است. در اهواز در طی نوامبر ۲۰۰۱ تا مارس ۲۰۰۲ ارزیابی شیوع عفونت روتاویروسی تنها با استفاده از روش الکتروتایپینگ مورد بررسی قرار گرفته است (۸). در پژوهش های قبلی نویسنده و همکاران در سال ۱۳۸۶ مطابق توصیه سازمان بهداشت جهانی از روش های سروتایپینگ و ژنوتایپینگ به صورت همزمان برای ارزیابی شیوع عفونت روتاویروسی در تهران استفاده گردید (۱۳). در این پژوهش از مجموع نمونه ها ۴۶/۰۲ درصد از نظر روتاویروس با روش الایزا مثبت ارزیابی شد که تقریباً با نتایج نویسنده و همکاران در مورد پایش بیماری‌ستانی روتاویروس ها در کودکان بستری شده در شهر تهران مطابقت دارد (۱۴). در سایر پژوهش ها نشان داده شد که بین جداسازی روتاویروس ها و فصل در مناطق جغرافیایی مختلف به ویژه در نیمکره شمالی ارتباط معنی داری وجود دارد. کشور ما نیز با توجه به اینکه در نیمکره شمالی واقع شده است حداکثر شیوع اسهال های روتاویروسی در فصل سرد وجود دارد. در بررسی های انجام شده در هند (۱۴)، عراق (۱۵)، برزیل (۱۶)، شهرکرد (۱۱) و تهران (۱۳) نیز این شیوع فصلی گزارش شده است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. اما در پژوهش انجام شده در شهر تهران در سال ۲۰۰۸ نشان داده شد که بیشترین شیوع اسهال روتاویروسی مربوط به فصل بهار می باشد (۱۷). این مساله نشان می دهد که ممکن است شیوع فصلی در یک منطقه در طی سال های مختلف متفاوت باشد. به دلیل شیوع بیشتر ژنوتایپ های G1،G2،G3،G4،G8

شناسایی نمودیم. این مساله ضرورت پایش مکرر بیمارستانی در کشور برای شناسایی ژنوتایپ های متداول در حال چرخش برای بدست آوردن اطلاعات لازم به منظور ارایه به سازمان جهانی بهداشت برای برنامه همگانی واکسیناسیون منطقه ای را نشان می دهد.

نتیجه گیری:

به طور کلی نتایج ما شیوع بالای عفونت روتاویروسی در جمعیت مورد پژوهش از کودکان در شهرستان جهرم را نشان داد. به دلیل غیر قابل تایپ بودن تعداد زیادی از روتاویروس های جدا شده و همچنین شیوع ژنوتایپ های نادر انجام پایش گسترده به صورت همزمان در سایر نقاط کشور مطابق با پروتکل پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از جناب آقای مهدی کارگر، کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل حمایت های اجرایی و عملی ابراز می دارند.

دارد. در پژوهش ما ژنوتایپ G9 به عنوان سومین ژنوتایپ شایع با فراوانی ۲/۶۷ درصد بدست آمد که دقیقاً مشابه نتایج بدست آمده در ایالات متحده آمریکا می باشد (۲۰). پیدایش سریع ژنوتایپ G9 در سرتاسر جهان به عنوان ژنوتایپ های عفونی اصلی در انسان از نظر استراتژی برنامه واکسیناسیون حایز اهمیت می باشد. در مطالعات انجام شده در شهرکرد طی سال های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲، ۷۸ درصد (۱۱) و در تهران در سال ۲۰۰۸ (۱۳) میزان شیوع روتاویروس ها به ترتیب ۷۸ و ۳۵ درصد گزارش شده است. در واقع به علت عدم رعایت بهداشت امکان بازآرایی طبیعی ویروس بین سویه های مختلف انسانی و حتی بین سویه های انسانی با حیوانی و ایجاد ژنوتایپ نوظهور فراهم می گردد. در غنا در سال ۱۹۹۸ (۲۱) و بنگلادش در سال ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۴ (۲۲) عفونت ترکیبی G1G2 با فراوانی ۲ درصد دیده شد که این نتایج با یافته های ما در این پژوهش تقریباً مشابه بود. در بررسی های صورت گرفته در ایرلند طی سال های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ برای اولین بار ژنوتایپ های G8 و G9 در برخی از عفونت های مخلوط شناسایی گردید. همچنین یک مورد ژنوتایپ مخلوط G1G8 نیز در این کشور شناسایی گردید (۲۳). ما نیز در این پژوهش برای اولین بار ژنوتایپ مخلوط G1G8 را

منابع:

- 1.Zamanzad B, Validi M, Kheiri S, Maghsoudi R. [The prevalence and antibacterial susceptibility pattern of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains isolated from less than 5 years old children with diarrheal hospitalized in Shahrekord Hajar Hospital-2007. J Shahrekord Univ of Med Sci. 2010; 11(4): 11-18.]Persian
- 2.Sanchez-Fauquier A, Montero V, Moreno S, Sole M, Colomina J. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. Emerg Infect Dis. 2006 Oct; 12(10): 1536-41.
- 3.Parashar UD, Alexande rJP, Roger I. Prevention of Rotavirus Gastroenteritis among Infants and Children. MMWR. 2006 Aug; 55(RR-12): 1-13.
- 4.Rahman M, Sultana R, Podder R, Faruque A, Matthijnssens J, Zaman KH, et al. Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. Virol J. 2005 Mar; 2: 24.
- 5.Nguyen VM, Nguyen VT, Huynh PL, Dang DT, Nguyen TH, Phan VT, et al. Vietnam rotavirus surveillance network. The epidemiology and disease burden of rotavirus in Vietnam: sentinel surveillance at 6 hospitals. J Infect Dis. 2001 Jun; 183(12): 1707-12.

6. Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Barnes G, Bishop R. Rotavirus Serotype G9P [8] and acute gastroenteritis outbreak in children, Northern Australia. *CDC EID*. 2004; 10(9): 1593-600.
7. Zaki AM, DuPont HL, el Alamy MA, Arafat RR, Amin K, Awad MM, et al. The detection of enteropathogens in acute diarrhea in a family cohort population in rural Egypt. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Sep; 35(5): 1013-22.
8. Kazemi A, Tabatabaie F, Agha-Ghazvini MR, Kelishadi R. The role of rotavirus in acute pediatric diarrhea in Isfahan, Iran. *J Pak Med Sci*. 2006; 22(3): 282-85.
9. Samarbafzadeh A, Mazaheri Tehrani E, Makvandi M, Taremi M. Epidemiological aspects of rotavirus infection in Ahwaz, Iran. *J Health Popul Nutr*. 2005 Sep; 23(3): 245-9.
10. Ray PG, Kelkar SD. Prevalence of neutralizing antibodies against different rotavirus serotypes in children with severe rotavirus-Induced diarrhea and their mothers. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Jan; 11(1): 186-94.
11. Khalili B, Cuevas LE, Reisi N, Dove W, Cunliffe NA, Hart CA. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Iranian children. *J Med Virol*. 2004 Jan; 73(2): 309-12.
12. WHO. Generic protocols for (i) hospital –based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children and (ii) a Community – based survey on utilization of health care services for gastroenteritis in children WHO. CH 1211 Geneva 27, Switzerland this document is available on the Internet at: www.who.int/vaccines-document. 2002; 1-35.
13. Kargar M, Zaree–Mahmood–abadi B, Tabatabaei H, Sadeghipour S, Nategh R. Genotyping of VP7 protein with Nested RT-PCR in children hospitalized in Tehran. *Iranian J Infec Dis & Trop Med*. 2008; 12(39): 11–17. [Persian]
14. Jaki JM, Al-Rabaty AA, Saravanan P, Ananthan S, Ananthasubramanian M. Rotavirus infection among infants and young children in Chennai, South India. *Indian J Med Microbiol*. 2004 Oct-Dec; 22(4): 212-21.
15. Ahmed HM, Coulter JB, Nakagomi O, Hart CA, Jaki JM, Al-Rabaty AA. Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdistan. *Emerg Infect Dis*. 2006 May; 12(5): 824-6.
16. Cardoso DD, Soares CM, Dias e Souza MB, de Azevedo Mda S, Martins RM, Queiroz DA, et al. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Jan; 98(1): 25-9.
17. Modarres S, Modarres S, Oskoi NN. Rotavirus infection in infants and young children with acute gastroenteritis in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health J*. 1995; 1: 210-4.
18. Bon F, Fromantin C, Aho S, Pothier P, Kohli E. G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr; 38(4): 1681-3.
19. Bishop RF, Masendycz PJ, Bugg HC, Carlin JB, Barnes GL. Epidemiological patterns of rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol*. 2001 Mar; 39(3): 1085-91.
20. Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Wood PA. Surveillance of Rotavirus Strains in the United States Identification of Unusual Strains. *JCM*. 2000; 38(7): 2784-2787.
21. Asmah RH, Green J, Armah GE, Gallimore CI, Gray JJ, Iturriza-Gómara M. Rotavirus G and P genotypes in rural Ghana. *J Clin Microbiol*. 2001 May; 39(5): 1981-4.
22. Armah GE, Steele AD, Binka FN, Esona MD, Asmah RH, Anto F. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun; 41(4): 2317-22.
23. O'Mahony J, Foley B, Morgan S, Morgan JG, Hill C. VP4 and VP7 genotyping of rotavirus samples recovered from infected children in Ireland over a 3-year period. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun; 37(6): 1699-703.

