

## شیوع ژنوتایپ‌های مخلوط روتاویروسی در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد بستری شده در شهرستان مرودشت در سال های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷

محمدکارگر\*<sup>۱</sup>، مریم زارع<sup>۲</sup>

۱. PhD، میکروبیولوژی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم  
۲. M.Sc، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

\*نشانی برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، تلفن ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳، mkargar@jia.ac.ir  
دریافت مقاله: دی ماه هشتاد و هشت پذیرش برای چاپ: فروردین هشتاد و نه

### چکیده

**سابقه و هدف:** روتاویروس‌ها مهم ترین عامل ایجاد کننده گاستروانتریت‌های شدید ویروسی و اسهال آبکی در کودکان زیر ۵ سال در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند. هدف از این پژوهش، تعیین ژنوتایپ های پروتئین ۷ روتاویروس‌ها با روش *Nested-RT-PCR* در کودکان بستری شده زیر ۵ سال در شهرستان مرودشت به مدت یک سال می‌باشد.

**روش کار:** در این پژوهش ۱۴۱ نمونه از کودکان بستری شده زیر ۵ سال مبتلا به اسهال شدید در بیمارستان مطهری شهرستان مرودشت جمع‌آوری شد. ابتدا گروه A روتاویروس با روش آنزیم ایمنونواسی (EIA) شناسایی و سپس ژنوتایپ نمونه‌های مثبت با استفاده از ۹ پرایمر اختصاصی با روش *Nested-RT-PCR* تعیین گردید.

**یافته‌ها:** از مجموع نمونه های مورد بررسی با روش الایزا، در ۴۰ نمونه روتاویروس شناسایی شد. فراوانی ژنوتایپ‌های  $G_1$ ،  $G_2$  و  $G_4$  به ترتیب ۵٪، ۱۲/۵٪ و ۱۰٪ بود. ژنوتایپ‌های  $G_3$ ،  $G_8$  و  $G_9$  در هیچ یک از موارد به صورت انفرادی شناسایی نشد. همچنین در این بررسی فراوانی ژنوتایپ‌های مخلوط (دو سویه‌ای) و غیرقابل تایپ به ترتیب ۶۰٪ و ۱۲/۵٪ بود.

**نتیجه گیری:** فراوانی ژنوتایپ‌های مخلوط (دو سویه‌ای) بیانگر شدت عفونت، به علت سطح بهداشت پایین یا در اثر انتقال گونه‌های نوترکیب از حیوان به انسان می‌باشد. همچنین فراوانی قابل توجه ژنوتایپ‌های غیرقابل تایپ، لزوم استفاده از سایر پرایمرها را به منظور شناسایی ژنوتایپ‌های غیرمعمول نشان می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** روتاویروس‌های انسانی، ژنوتایپینگ، ژنوتایپ های مخلوط، *Nested-RT-PCR*

### مقدمه

روتاویروسی عموماً در فصل زمستان و موارد خیلی کمی از افزایش در فصول دیگر نیز گزارش شده است. اما در کشورهای گرمسیری، عفونت‌های روتاویروسی در تمام طول سال مشاهده می‌شود و هیچ نوع ارتباط فصلی در این زمینه وجود ندارد و یا حداقل ارتباط کمی گزارش شده است (۵).

روتاویروس های گروه A دارای یک کپسید داخلی و خارجی هستند که ژنوم ۱۱ قطعه‌ای از RNA دو رشته‌ای را در بر گرفته است. ۲ پروتئین کپسید خارجی ویروس یعنی  $VP_7$  که به وسیله قطعات ۷ و ۸ و ۹ وابسته به گونه کد می‌شود و  $VP_4$  که به وسیله ژن قطعه ۴ کد می‌شود، تعیین کننده تایپ‌های G و P ویروسی می‌باشند. پایش‌های سروتیپی گسترده نشان داده که سروتایپ‌های  $G_1$  تا  $G_4$ ، متداول ترین سروتایپ‌ها ی شناخته شده در سرتاسر جهان هستند. اما اخیراً افزایش غیرمعمول سروتایپ‌های  $G_5$ ،  $G_6$ ،  $G_8$ ،  $G_9$ ،  $G_{10}$  و  $G_{12}$  نیز گزارش شده است (۴ و ۶).

اولین واکسن روتاویروسی که مجوز استفاده از آن صادر شده روتا شیلد (Rotashield) است که واجد متداول ترین سروتایپ‌های شایع روتاویروسی  $G_1$  تا  $G_4$  می‌باشد. اما، به دلیل امکان ارتباط این واکسن با انسداد یا کلاپس روده از بازار جمع‌آوری شد، هر چند که شواهد آن نیز به صورت قطعی اثبات نشده است (۴).

پاتوزن‌های ویروسی، متداول ترین دلیل گاستروانتریت حاد در کشورهای در حال توسعه و پیشرفته هستند. روتاویروس‌های انسانی و آدنوویروس‌ها بزرگترین عوامل شیوع حاد و بیشترین موارد همه‌گیری گاستروانتریت در کودکان زیر ۲ سال هستند (۱). روتاویروس‌ها سالانه باعث ایجاد یکصد و یازده میلیون مورد گاستروانتریت در میان کودکان جهان می‌شوند که اغلب با درمان‌های خانگی، قابل درمان می‌باشند، اما از این تعداد ۲۵ میلیون مورد منجر به درمان بالینی و ۲ میلیون مورد به بستری شدن در بیمارستان منتهی می‌شود. همچنین سالانه ۶۰۰ هزار مورد از این کودکان، به ویژه در کشور های در حال توسعه در اثر عفونت روتاویروسی می‌میرند (۲).

شیوع عفونت های روتاویروس به طور عمده در ماه های سردتر اتفاق می‌افتد و به همین دلیل به عنوان بیماری زمستانی شناخته می‌شود (۳). روتاویروس‌ها به گروه های A تا E طبقه‌بندی شده اند. روتا ویروس های گروه A بیشترین شیوع و بیماری زایی را در میان سایر گروه‌ها دارند (۴).

ظاهراً انسان اصلی ترین مخزن عفونت‌های روتاویروسی محسوب می‌شود. انتشار از طریق قطرات معلق یا تماس مستقیم مدفوعی - دهانی، از راه های اصلی انتقال بیماری است. در کشورهای معتدل شیوع اسهال‌های

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 داخلی aAT<sub>8</sub>، aBT<sub>1</sub>، aCT<sub>2</sub>، aDT<sub>4</sub>، aET<sub>3</sub>، aFT<sub>9</sub> به عنوان پرایمرهای (Forward)F و پرایمر End<sub>9</sub> به عنوان پرایمر R (Reverse)، مرحله دوم PCR انجام شد. در این مرحله توالی های کوچکتر واقع درون محصول مرحله اول تکثیر می یابد و به این ترتیب قطعاتی با طول متفاوت ایجاد می گردد. در مرحله آخر، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR مرحله دوم به ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برآمید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه UV Transilluminator مورد بررسی قرار گرفت (۵).

تجزی و تحلیل نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS، آزمون مربع کای، ANOVA و Binomial انجام شد. مرز معنی داری روی  $P < 0.05$  قرار داده شد.

### یافته ها

در این پژوهش ۱۴۱ نمونه از ابتدای دی ماه ۱۳۸۶ تا ابتدای دی ماه ۱۳۸۷ از کودکان بستری شده زیر ۵ سال بیمارستان شهید مطهری مرودشت جمع آوری گردید مطابق 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، ۴۸-۶۰ ماه تقسیم بندی شدند، تا توزیع فراوانی نمونه ها در کودکان زیر ۵ سال به تفکیک مشخص شود. بیشترین نمونه های جمع آوری شده در فصل بهار مربوط به گروه سنی ۹-۱۱ ماه با فراوانی ۸/۰۵۱ درصد و در فصل های تابستان، پاییز و زمستان، هر ۳ متعلق به گروه سنی ۱۲-۱۷ ماه به ترتیب با فراوانی ۱۲/۷۷ درصد، ۳/۵۵ درصد، ۷/۰۹ درصد بودند. اما کمترین فراوانی در فصول بهار و پاییز و زمستان هر ۳ متعلق به گروه سنی ۱۸-۲۳ ماه بود. به این ترتیب که هیچ نمونه ای از این گروه های سنی در این فصول جمع آوری نشد. در فصل تابستان نیز کمترین فراوانی مربوط به گروه سنی ۰-۲ ماه بود (۰/۷۱ درصد). با استفاده از آزمون ANOVA مشخص شد که بین فصل و گروه سنی رابطه معناداری وجود دارد ( $P < 0.02$ ). با استفاده از آزمون LSD مشخص شد که تنها تفاوت بین فصول بهار و تابستان معنادار است ( $P < 0.02$ ) (جدول ۱). از مجموع نمونه های جمع آوری شده، ۴۰ مورد (۲۸/۳۷٪) از نظر وجود روتا ویروس با روش الایزا مثبت ارزیابی شدند. سپس ژنوتایپ نمونه های مثبت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

بیشترین فراوانی ژنوتایپ های روتا ویروسی جدا شده مربوط به ژنوتایپ های مخلوط (دوسویه ای) بود که ۶۰ درصد از کل نمونه های مثبت را شامل می شد. پس از آن G<sub>2</sub> با ۱۲/۵٪، G<sub>4</sub> با ۱۰ درصد و G<sub>1</sub> با ۵ درصد، بیشترین فراوانی جداسازی روتا ویروس را تشکیل می دادند. همچنین کمترین فراوانی ژنوتایپ ها، مربوط به G<sub>3</sub>، G<sub>8</sub> و G<sub>9</sub> بود که در هیچ یک از نمونه های مثبت به صورت انفرادی دیده نشد. از کل ژنوتایپ های مخلوط، G<sub>1</sub>G<sub>8</sub> با ۴۶ درصد، G<sub>2</sub>G<sub>8</sub> با ۲۵ درصد، G<sub>2</sub>G<sub>4</sub> با ۱۳ درصد، G<sub>3</sub>G<sub>8</sub> با ۸ درصد و G<sub>3</sub>G<sub>4</sub> و G<sub>1</sub>G<sub>4</sub> هر کدام با ۴ درصد، به ترتیب فراوان ترین ژنوتایپ های دو سویه ای را تشکیل می دادند. با استفاده از آزمون Binomial مشخص شد که بین فراوانی ژنوتایپ های مخلوط جدا شده و تعداد کل نمونه ارتباط معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). بیشترین فراوانی ژنوتایپ های جدا شده (۴۰٪) مربوط به گروه سنی ۱۷-۱۲ ماه بود (نمودار ۱). بین گروه سنی و ژنوتایپ های شناسایی شده ارتباط معنی داری وجود نداشت. همچنین ۱۲/۵ درصد از نمونه های روتا ویروس با پرایمر های مورد بررسی تعیین تایپ نشدند.

در حال حاضر هیچکدام از واکسن های روتا ویروسی در سیستم های ایمن سازی متداول، به صورت گسترده مورد استفاده قرار نگرفته است. گذشته از این واکسن های دیگری نیز در مراحل ارزیابی پایایی هستند. به دلیل تغییرات ناحیه ای در شیوع سویه های مختلف و یافتن این نکته مهم که ممکن است بعضی از سروتایپ های نادر، اهمیتی بیش از تصورات قبلی داشته باشد، پایش هدایت شده روتا ویروسی در تمام کشورهای دنیا به ویژه در کشورهای در حال توسعه می تواند راهی برای واکسیناسیون همگانی کودکان در آینده باشد. ما در پژوهش های قبلی شیوع ژنوتایپ های متداول روتا ویروسی را در شهر های تهران، شیراز و جهرم مورد بررسی قرار دادیم (۷ و ۵).

هدف از این پژوهش، تعیین سروتایپ های شایع و ژنوتایپ های پروتئین VP<sub>7</sub> روتا ویروس ها در شهر مرودشت می باشد.

### روش کار

۱۴۱ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال بستری شده به دلیل گاستروانتریت شدید در بیمارستان شهید مطهری مرودشت استان فارس به صورت مقطعی توصیفی جمع آوری گردید. در تمام موارد اطلاعات مربوط به سن، جنس، محل سکونت، علائم بالینی و درجه حرارت بدن در پرسشنامه تنظیمی ثبت

و نمونه ها تا شروع آزمون های تشخیصی، در  $20^{\circ}\text{C}$  نگهداری و فریز گردید. در ابتدا گروه A روتا ویروسی با تست EIA (کیت DRG ساخت کشور آلمان) تشخیص داده شد. برای این منظور یک سوسپانسیون از نمونه مدفوع با استفاده از بافر موجود در کیت تهیه شد و رقیق سازی مدفوع انجام گرفت. برای انجام آزمون الایزا، ابتدا کف چاهک های پلیت با آنتی بادی پلی کلونال روتا ویروسی بر ضد پروتئین VP<sub>6</sub> گروه A پوشانده شد. سپس نمونه رقیق شده مدفوع بیمار هم زمان با آنتی بادی پلی کلونال کونژوگه به چاهک اضافه و پس از یک ساعت سوبسترای آنزیم اضافه گردید و واکنش با اضافه کردن اسید و تغییر رنگ از آبی به زرد متوقف گردید. غلظت رنگ تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. جذب طول موج بالاتر از ۰/۱۵ به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شد.

برای استخراج RNA از محلول RNx<sup>TM</sup>-Plus شرکت سیناژن استفاده شد. این محلول حاوی فنل و ایزوتیو سیانات می باشد که باعث جدا شدن کپسید از RNA می شود. میزان ۵۰۰ میکرولیتر از این محلول را با ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی مدفوعی تیمار شده مخلوط و یکنواخت گردید و سپس به آن کلروفرم اضافه شد. در انتهای این مرحله RNA به صورت رسوبی سفید رنگ در کراتیوب ها باقی می ماند.

به منظور ساخت cdNA ابتدا مخلوط واکنش شماره ۱، شامل: ۲ میکرولیتر DMSO، ۲ میکرولیتر بافر ۵X، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر Beg<sub>9</sub>، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر End<sub>9</sub>، 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  $97^{\circ}\text{C}$  در دستگاه ترموسایکلر 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  $42^{\circ}\text{C}$  در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. به منظور انجام Nested RT-PCR، ابتدا با استفاده از جفت پرایمرهای خارجی Beg<sub>9</sub> و End<sub>9</sub>، کل قطعه مربوط به ژن VP<sub>7</sub> تکثیر و در طی ۲۸ چرخه

در مطالعات قبلی انجام گرفته در ایران، روتاویروس‌ها از نظر الکتروفور تایپینگ، RT-PCR، کشت سلولی و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی بررسی شده است. به عنوان نمونه ۲۰۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال زیر ۲ سال ، از نوامبر ۲۰۰۱ تا مارس ۲۰۰۲ در اهواز با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش یاد شده الکتروفرو تایپ غالب (Long) L با فراوانی ۷۸٪ و الکتروفرو تایپ کوتاه (Short) S با فراوانی ۲۰/۳ به عنوان دومین الگو معرفی شد. در این بررسی ۱ سویه مخلوط یافت شد که حاوی بیش از ۱۱ قطعه RNA بود. در بررسی دیگری در ایران مطالعه روتاویروس بر روی کشت سلولی BSC-1 و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی انجام شد(۵).

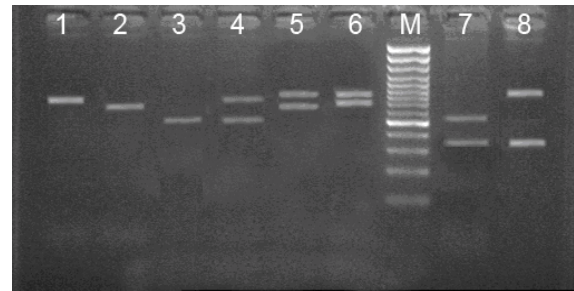
به دلیل شیوع بیشتر G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>8</sub> و G<sub>9</sub> سازمان بهداشت جهانی در برنامه پایش بیمارستانی استفاده از پرایمرهای مرتبط با این سرو تایپ‌ها را در دستور کار خود قرار داده است.

در برزیل نتایج ارزیابی شیوع روتاویروس ها در سال های ۱۹۹۸ تا ۱۹۹۹ نشان داد که تعداد قابل توجهی از ژنوتایپ های جداسازی شده (۴۰٪) مربوط به ژنوتایپ های مخلوط است که این مساله می تواند نشان دهنده چرخش بسیار زیاد و پیچیده ژنوتایپ های مخلوط در این کشور باشد(۸). در مطالعه دیگری که در پاراگوئه انجام شد G<sub>1</sub> (۲۱/۴٪)، G<sub>2</sub> (۱/۴٪) و G<sub>9</sub> (۵/۷٪) فراوان ترین ژنوتایپ های منفرد جدا شده بود. همچنین ۲۱/۴ درصد از ژنوتایپ‌ها، متعلق به ژنوتایپ‌های انسانی و حیوانی به صورت مخلوط بود و حدود ۱۵/۷ درصد از نمونه‌ها غیر قابل تایپ‌بندی بودند(۹).

در آرژانتین در سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۳ ژنوتایپ‌های G<sub>1</sub> و G<sub>4</sub> به عنوان ژنوتایپ غالب در بیش از ۸۰ درصد موارد جداسازی گردید. همچنین در این کشور برای اولین بار ژنوتایپ غیر متداول G<sub>12</sub> شناسایی شد(۱۰). مطالعه دیگری در هند نشان داد که عفونت‌های مخلوط شیوع بسیار بالایی دارند و سرو تایپ G<sub>1</sub>، اغلب در عفونت‌های مخلوط دیده می‌شود. در این مطالعه سرو تایپ G<sub>9</sub> که قبلاً جداسازی نشده بود ، به عنوان یک سرو تایپ متداول با فراوانی ۱۷ درصد گزارش گردید. در بعضی شهرهای هند، هشت گونه مختلف در زمان یکسان و با تعداد مساوی در حال چرخش بودند که نسبت به سایر کشورها دیده می‌شد، تنوع گونه ای بیشتری داشتند. پس از آن شیوع عفونت‌های مخلوط با چند ژنوتایپ به میزان بالایی مشاهده شد(۱۱).

پایش روتاویروس ها در بلغارستان، آلبانی، کروواسی، اسلوانی و جمهوری چک نشان داد که G<sub>1</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> در ترکیب با P[8] و G<sub>2</sub> در ترکیب با P[4] بین ۵۰ تا ۸۰ درصد از موارد شیوع را شامل می‌شدند(۲). در اسپانیا ۱۳/۹ درصد از تمام کشت های مثبت گزارش شده در طول دوره مطالعه، روتاویروس بوده‌اند و اوج شیوع بیماری در فصل زمستان گزارش شده است(۱۲). مطالعه دیگری در اسپانیا نشان داد که G<sub>1</sub> ژنوتیپ عمده شناسایی شده در ۵۳ درصد موارد بود و G<sub>4</sub> دومین ژنوتایپ متداول با فراوانی ۲۴ درصد بود. همچنین ژنوتایپ های G<sub>2</sub>, G<sub>9</sub> و G<sub>3</sub> روتاویروس و عفونت های مخلوط در ۱۴، ۶، ۲ و ۰/۶ درصد موارد دیده شد(۱۳).

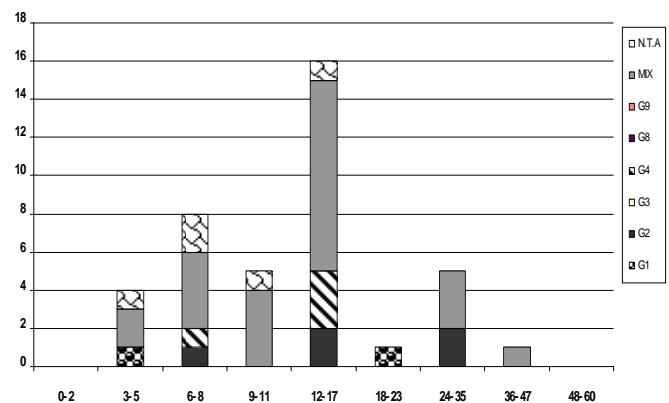
Arista و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در ایتالیا فراوانی زیاد گونه‌های سرو تیپ G<sub>4</sub> را به خوبی نشان دادند(۱۴).



شکل ۱: نمایش ژنوتایپ‌های تعیین شده با روش RT-PCR. به ترتیب از چپ به راست، (۱) ژنوتایپ‌های G<sub>1</sub> (۷۴۹bp)، G<sub>2</sub> (۶۵۲bp)، G<sub>3</sub> (۵۸۴bp)، G<sub>4</sub> (۷۴۹bp و ۵۸۴)، G<sub>6</sub> (۶۵۲ و ۸۸۵bp)، G<sub>8</sub> (۷۴۹ و ۸۸۵bp) و G<sub>9</sub> (۳۷۴ و ۵۸۳bp) و سایز مارکر (M) (۱۰۰bp) را نشان می‌دهد.

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبت روتاویروس‌های جداسازی شده با روش ELISA بر اساس فصل

فصل	مثبت	منفی	جمع
بهار	۸ (۵/۶۷٪)	۴۰ (۲۸/۳۷٪)	۴۸ (۳۴/۰۴٪)
تابستان	۲۱ (۱۴/۸۹٪)	۴۱ (۲۹/۰۸٪)	۶۲ (۴۳/۹۷٪)
پاییز	۸ (۵/۶۷٪)	۷ (۴/۹۶٪)	۱۵ (۱۰/۶۴٪)
زمستان	۳ (۲/۱۳٪)	۱۳ (۹/۲۲٪)	۱۶ (۱۱/۳۵٪)
جمع کل	۴۰ (۲۸/۳۷٪)	۱۰۱ (۷۱/۶۳٪)	۱۴۱ (۱۰۰٪)



## بحث

بررسی‌های انجام شده ، بر روی سرو تایپ‌های مختلف روتاویروسی نشان داده است که این ویروس از لحاظ فصلی، جغرافیایی، چرخش گونه‌ها و بازاری‌های غیر معمول بین روتاویروس های حیوانی و انسانی در مناطق مختلف ، تنوع بسیار گسترده‌ای دارد.

فصل تابستان دیده شد و در سایر فصل‌ها فراوانی یکسان بود. اما بیشترین فراوانی  $G_1$  در بهار و تابستان مشاهده گردید. اما این سوال مطرح می شود که چرا برخلاف سایر پژوهش‌ها که روتاویروس را به عنوان بیماری زمستانی معرفی می‌کنند، در پژوهش ما این بیماری در فصل تابستان شیوع بیشتری دارد؟ شاید دلیل این مساله نگرانی بیشتر والدین از اسهال‌های ایجاد شده در کودکان در فصل تابستان و پیگیری درمان‌های بالینی آن باشد. در حالی که اکثر افرادی که در فصول سردتر بیمار می‌شوند، تحت درمان‌های خانگی و سرپایی قرار می‌گیرند.

کمبود سطح بهداشت و عدم وجود سیستم‌های پیشرفته فاضلاب نیز از دلایل شیوع بیماری و به خصوص عفونت‌های مخلوط در این مناطق است. اما به طور کلی، برای بیان نتایج قطعی مربوط به شیوع ژنوتایپ‌های خاص در یک منطقه نیاز است که پایش در چند سال متوالی انجام گیرد. همچنین با طراحی پراب‌های جدید، می‌توان چرخش سایر ژنوتایپ‌های غیر متداول را نیز ارزیابی نمود.

### نتیجه‌گیری

شیوع بالای عفونت‌های مخلوط در این پژوهش، می‌تواند به دلیل تعداد زیاد مناطق روستایی و پایین بودن سطح بهداشت باشد. همچنین به دلیل متداول بودن کشاورزی و دامداری، امکان انتقال گونه‌های حیوانی به انسان و باز آرایشی‌های ژنتیکی بین سروتایپ‌های انسانی و حیوانی می‌تواند وجود داشته باشد. به همین دلیل پایش مکرر و شناسایی دقیق‌تر سویه‌های غیر قابل تایپ در پژوهش‌های بعدی برای شناسایی ژنوتایپ‌های غیر متداول پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، مراتب قدردانی خود را از جناب آقای دکتر رامین یعقوبی به دلیل حمایت اجرایی در این پژوهش اعلام می‌دارند.

تمامی این مطالعات نشان می‌دهد که سروتایپ‌های گوناگون بین سال‌های مختلف، افزایش و کاهش را در پراکنش و چرخش خود داشته است. به طوری که یک ژنوتایپ که در یک سال و در یک منطقه غالب است، ممکن است در سال‌های بعد در همان منطقه، حضور چشمگیری نداشته باشد.

در مطالعات انجام شده در شهرکرد طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲، ۷۸ درصد از نمونه‌ها روتاویروس مثبت گزارش شدند و از بین ۱۴۶ نمونه مثبت روتاویروسی ۱۳۹ مورد ( $G_1$  ۹۵٪) تایپینگ شد که  $G_1$  با فراوانی ۸۲ درصد، به عنوان ژنوتایپ غالب و  $G_2$  با فراوانی ۱۳ درصد به عنوان دومین ژنوتایپ معرفی شد (۱۵). در مطالعه انجام شده در تهران در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ مشخص شد که  $G_1$  تا ۲۸/۵۷٪ و پس از آن  $G_2$  با ۱۸/۶۸ درصد به عنوان ژنوتایپ‌های غالب می‌باشد و نمونه‌های مخلوط در این مطالعه ۱۰/۹۸ درصد بود (۵).

یکی از ویژگی‌های قابل توجه نتایج ما در این پژوهش، فراوانی قابل توجه ( $G_1$  ۶۰٪) جداسازی ژنوتایپ‌های مخلوط بود. درصد بالای عفونت مخلوط در شهرستان مرودشت می‌تواند به دلیل رایج بودن شغل کشاورزی، دامپروری و مهاجر پذیر بودن این شهرستان باشد که می‌تواند شرایط را برای چرخش ژنوتایپ‌های مخلوط را تسهیل نماید. همچنین ما در پژوهش قبلی با ارزیابی ۲۶۰ نمونه کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال شدید در چهار بیمارستان شهر تهران، فراوانی ژنوتایپ‌های مخلوط و غیر قابل تایپ را ۱۰/۹۸ درصد و ۲۱/۹۷ درصد شناسایی نمودیم (۵). گذشته از این در مطالعه مشابهی که ما بر روی ۱۶۳ نمونه کودکان زیر ۵ سال در شهرستان جهرم، واقع در استان فارس انجام دادیم، به ترتیب در ۱/۳۳ درصد و ۳۰/۶۶ درصد ژنو تایپ‌های مخلوط (دو سویه ای) و غیر قابل تایپ را تشخیص دادیم (۷).

نتایج پژوهش ما در مورد جداسازی فصلی روتاویروس‌ها در مرودشت نشان می‌دهد که بیشترین فراوانی در نمونه‌های مخلوط جدا شده در فصل تابستان (۳۰ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به فصل زمستان (صفر درصد) می‌باشد. در مورد نمونه‌های غیر قابل تایپ نیز بیشترین فراوانی، در

## REFERENCES

1. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Rotavirus and Adenovirus as causative Agent of Acute Viral Gastroenteritis children. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9): 3189-95.
2. Tcheremenskaia O, Marucci G, Petris SD, Ruggeri FM. Molecular Epidemiology of Rotavirus in Central and Southeastern Europe. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(7): 2197-2204.
3. Banerjee I, Ramani S, Primrose B, Moses P. Comparative study of the Epidemiology of Rotavirus in Children from a Community-Based Birth cohort and a Hospital in South India. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(7): 2468-74.
4. Adah MI, Wade A, Taniguchi K. Molecular Epidemiology of Rotaviruses in Nigeria: Detection of unusual strains with  $G_2P[6]$  and  $G_8P[1]$  Specificities. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (11): 3969-75.

5. Kargar M, Zaree-mahmod- abadi B, Tabatabaei H, Sadeghipour S, Nategh R. Genotyping of Protein Protein With Nested RT-PCR IN Children Hospitalized in Tehran. Iran. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2008; 12(39); 11-17.
6. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK .Detection and Genetic Characterization of Group A Rotavirus strains circulating among children with Acute Gastroenteritis in Japan. J Virology. 2007; 81(9): 4645-53.
7. Kargar M, Akbarzadeh A, Yaghobi R, Zaree B, Tabatabaei H, Genotyping of Rotavirus Strains in Fars and Tehran states, Iran. Proceeding of the 1<sup>st</sup> Emirates Hellenic Medical conference & Exhibition. 2007 Dec; Dubai, United Arab Emirates.
8. Silva MLR, Carvalho IP, Gouvea V. 1998-1999 Rotavirus Seasons in Juiz de fora, Minas Gerais, Brazil: Detection of an Unusual G<sub>3</sub>P[4] Epidemic Strain. J Clin Microbiol. 2002; 40(8): 2837-42.
9. Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M. Detection, Subgroup Specificity, and Genotype Diversity of Rotavirus Strains in Children with Acute Diarrhea in Paraguay. J Clin Microbiol. 2002; 40(5): 1709-14.
10. Castello AA, Arguelles MH, Rota RP, Olthoff A .Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and Emergence of the Infrequent Genotype G<sub>12</sub>. J Clin Microbiol. 2006; 44(6): 2046-50.
11. Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI. Great Diversity of Group A Rotavirus strains and High Prevalence of Mixed Rotavirus Infections in India. J Clin Microbiol. 2001; 39(10): 3524-29.
12. Lopez-de -Andres A, Jimenez-Garcia R, Carrasco-Garrido P). Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in Spain, 2001-2005. BMC Public Health. 2008; 8: 109.
13. Sanchez-Faquier A, Wilhelmi I, Colomina J, Cubero E. Diversity of Group A Rotavirus Types Circulating over a 4- Year period in Madrid, Spain. J Clin Microbiol. 2004; 42(4): 1609-13.
14. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V. Genetic Variability among serotype G<sub>4</sub> Italian Human Rotaviruses. J Clin Microbiol. 2005; 43(3): 1420-25.
15. Khalili B, Guevas LE, Reisi N, et al. Epidemiology of Rotavirus Diarrhea in Iranian Children. Journal of Medical Virology. 2004; 73: 309-312.