شناسایی الگوی RNA Electrophoretic و آنالیز فیلوژنتیک ژنوتیپ های روتا ویروس [Ptype] (VP4) در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد در تهران

سمیرا اسکندریان[1]*، شهرزاد مدرس گیلانی[2]، علی اکبررهبری منش[3]، رخشنده ناطق[4]، رزیتا عدالت[5]، امیر سهرابی [5]، مهدیه معتمدی راد[6]، علی اکبر سیاری[7]

1. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات
2. متخصص ویروس شناسی ، استاد بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران
3. متخصص کودکان،بیمارستان کودکان بهرامی تهران
4. متخصص ویروس شناسی، استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
5. کارشناس ارشد ویروس شناسی، بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران
6. کارشناس میکروبیولوژی، بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران
7. متخصص کودکان، بیمارستان کودکان مفید تهران

* نشانی برای مکاتبه: تهران ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، دانشکده علوم پایه ،گروه زیست شناسی، تلفن 22562653،
samiraeskandarian@yahoo.com

دریافت مقاله: اسفند هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود

چکیده

سابقه و هدف: *روتا ویروس عامل مهم اتیولوژیک بیماری گاستروانتریت حاد در کودکان و از علل مهم مرگ و میر کودکان جهان می باشد . در این مطالعه نخست اقدام به تعیین میزان بروز عفونت روتا ویروس در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد شد، ونیز ژنوتیپ P روتا ویروسهای اخذ شده از بیماران تعیین گردید و نهایتاً Phylogenetic Tree مربوطه ترسیم شد .*

روش کار: *با استفاده از تکنیک RNA-PAGE اقدام به شناسایی روتا ویروس گروه A گردید و نیز با تکنیک Multiplex RT-PCR Semi-nestedو پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ های P روتا ویروس شناسایی و با تعیین سکانس تعدادی از ژنوتیپ های ویروس آنالیز فیلوژنتیک سویه های ویروس صورت پذیرفت.*

یافته ها: *از 285 بیمار با گاستروانتریت حاد 83 نمونه (29٪) روتا ویروس گروه A مشخص گردید و نیز ژنوتیپ های P[8] (81/9٪)، P[4] (8/4٪)، P[6](7/2٪) وژنوتیپ میکس (2/4٪) شناسایی شد که ژنوتیپ P[8] بالاترین انسیدانس را داشته است .ژنوتیپ های P[8] شناسایی شده در چرخش در تهران با روتا ویروس های اخذ شده در سایر کشورهای آسیا نیزهمولوژی بالا داشته اند .*

نتیجه گیری: *دراین بررسی روتا ویروس ژنوتیپ P[8]در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد شایعترین سویه ویروسی بوده است. نتایج این بررسی جهت کاربرد واکسن مناسب روتا ویروس در کودکان ایران راه گشا خواهد بود.*

واژگان کلیدی: *روتاویروس ، گاستروانتریت ،ژنوتیپ VP4*

مقدمه

روتا ویروسهای گروه A عامل مهم اسهال شدید کودکان در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته جهان است. بیماری اسهال یکی از معمول ترین بیماری ها در گروه سنی کودکان زیر 5 سال، در سراسر جهان می باشد که سالانه باعث بیش از 600000 مرگ ومیر درکودکان است و80٪ متعلق به آفریقا و جنوب آسیا می باشد(1). در سال1973 Bishop و همکاران روتا ویروس انسانی را همراه با اسهال همه گیر در کودکان و اطفال زیر 5سال به خصوص در سنین 6-24 ماهگی ، شناسایی نمودند(2).از آن به بعد عده ای از ویروسها همراه با گاستروانتریت شدید در کودکان مشخص گردید. مطالعات نشان داده است در 15 سال اخیر در ویتنام بیش از 50٪ کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد در بیمارستان ها ، به علت عفونت به روتا ویروس بستری بوده اند(3). همچنین با بررسی در 9 کشور آسیایی نشان داده شد، حدود 45٪ از کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد بستری در بیمارستان ها ،روتا ویروس مثبت بوده اند(4). گاستروانتریت ویروسی در مقایسه با اسهال باکتریایی و انگلی، شیوع و مرگ و میر بیشتری در کشورهای در حال توسعه دارد(5). گروه A روتا ویروس ها از عوامل اتیولوژیک مهم اسهال شدید در کودکان می باشد که تهیه

روتا ویروس ها با ساختمان بیست وجهی بدون پوشش از خانواده رئوویریده با ژنوم RNA دورشته ای 11 سگمانته هستند. دو پروتئین روتا ویروسی VP7(گلیکوپروتئین یا آنتی ژن G-Type) مربوط به کپسید خارجی وVP4 (پروتئین حساس به پروتئاز یا آنتی ژن P-Type) مربوط به اسپیک های کپسید خارجی از پروتئین های ساختمانی هستند که باعث القا آنتی بادی های خنثی کننده می شوند و این دو پروتئین اساس سیستم طبقه بندی برای ژنوتیپ های روتا ویروسی می باشند به طور دقیق تا کنون 19تایپ G و28 تایپP شناخته شده است(7). از روش های شناسایی روتا ویروس ها می توان تکنیک های الکترون میکروسکوپی- RNA- PAGE -الیزا - لاتکس آگلوتیناسیون و تکنیک RT-PCR را نام برد(8).

در این مطالعه چگونگی چرخش ژنوتیپ های VP4 روتا ویروسی در کودکان مبتلا به گاسترولنتریت حاد در طی سالهای 1387-1389 در تهران بررسی گردید .

روش کار

285 نمونه مدفوع از کودکان زیر5 سال با گاستروانتریت حاد بستری در بیمارستانهای تخصصی کودکان مفید و بهرامی تهران طی سالهای 89-1387 به همراه پرسشنامه بیماران جمع آوری شد. برای شناسایی عفونت روتا ویروس از تکنیک RNA-PAGE استفاده شد. جهت استخراج RNA در تکنیک PAGE نخست از محلول سدیم – استات(1M+ SDS 1%) و نیز فنل و کلروفرم استفاده گردید و پس از سانتریفیوژدر نهایت فاز رویی که حاوی RNA ژنومی می باشد را به اتانول اضافه نموده و سپس در 20- قرار گرفته شد. تکنیک تشخیصی PAGE بر اساس حرکت RNA الکتروفورتیک بر روی ژل پلی اکریل آمید 10٪ صورت می گیرد که پس از رنگ آمیزی با روش نیترات نقره 11 سگمنت ژنوم روتا ویروس در ژل قابل روئیت می باشند (9).

جهت ژنوتایپینگ ،نخست استخراج RNA از نمونه های روتا ویروس مثبت با بهره گیری از کیت QIAamp Viral RNA (کیا ژن) صورت گرفت و سپس جهت انجام تکنیکRT-PCR به ازای هر نمونه 4 µl از PCR بافر ،2 µl از dNTP mix ، 2 µl از بافرmgcl2(25Mm) ، Ribonuclease Inhibitor0/5 µl، Random Hexamer0/5µl و 1µl آنزیم M.Mulv مورد استفاده قرار گرفته است ودر نهایت نمونه ها در ترموسایکلر با شرایط مناسب قرار گرفت. در ادامه ،از تکنیک semi Nested –PCR استفاده گردید. در مرحلهٔ اول ، cDNA همراه با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (Con2-Con3)و ترکیبات PCR بافر 10x، mgcl2(25mM) ، dNTP(10mM) و آنزیم Taq Polymerase در ترموسایکلر با شرایط مناسب قرار گرفت. برای مشاهده قطعه VP4 که bp877 می باشد از ژل آگارز 1/5٪ استفاده شد و در صورت مشاهده باند مورد نظر ،مرحله دوم صورت پذیرفت. این مرحله با پرایمرهای اختصاصی P[4]، P[6]، P[8] ، P[9] وCon3می باشد و بسته به ژنوتایپهای مختلف قطعات با اندازه های متفاوتی بدست آمد.همچنین پس از تعیین ژنوتیپ های روتا ویروس ،حدود یک سوم از نمونه ها سکانس گردید وسکانسها برای ثبت در Gen Bank از طریق سایت www.ncbi.com فرستاده شد در نهایت با بهره گیری از برنامه Clustal W ، نزدیکی سکانسهای P Type شناسایی شده و با سکانسهای ارائه شده دیگر کشورها در GenBank مقایسه گردید و Phylogenetic Tree با استفاده از مدل neighbor- joining در برنامه MEGA4 ترسیم گردید(10).

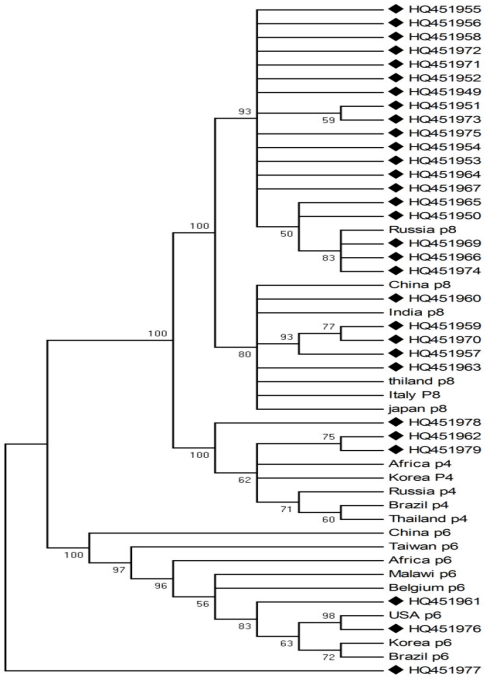
یافته ها

در این پژوهش 285 نمونه مدفوع از کودکان بیمار زیر 5 سال با بیماری گاستروانتریت حاد بستری در بیمارستان های تخصصی کودکان مفید و بهرامی طی سالهای 89-1387جمع آوری شد و با تکنیک PAGE -RNA مشخص شد که 83 (29٪) ازنمونه ها روتا ویروس مثبت بوده و202 (71٪)روتا ویروس منفی می باشند و نیزمشخص شد که بیش از 90٪ از نمونه های روتا ویروس مثبت ، از RNA Long pattern پیروی نموده و الکتروفروتایپ RNA Short Pattern به عنوان دومین الگوبوده است.

توزیع گاستروانتریت روتا ویروس در دختران و پسران تقریباً مشابه بوده است، به طوری که در 46٪ دختران و 54٪ پسران عفونت روتا ویروس مشخص گردید. میزان شیوع در کودکان کمتر از 12 ماه سن 46٪، 12 تا 24 ماه 36٪، و 2 تا 5 سال 18٪ بود. میزان بیماری در فصل بهار و تابستان هرکدام 14/5٪، پاییز 21/5٪، و زمستان 49/5٪ بود.

در این مطالعه ژنوتیپ VP4 غالب در بیماران با گاستروانتریت روتا ویروس(81/9٪) P[8] وسپس (8/4٪) P[4] ، (7/2٪)P[6] و ژنوتیپ میکس 2/4٪ شناسایی شد که P[4][8] و P[6]P[4] را شامل شد.

آنالیزومقایسه نمونه های بدست آمده با یکدیگرو با سایرنمونه ها از نقاط مختلف جهان در بیماران با گاستروانتریت حاد روتا ویروس، توسط درخت فیلوژنتیک صورت گرفت به طوری که موارد شناسایی شده وثبت شده دربانک ژن با پیشوند HQمشخص گردیده است(نمودار 1).



نمودار 1. مقایسه سکانس ژنوتیپ های Pشناسایی شده با سکانس ژنوتیپ های سایر کشورها با ترسیم Phylogenetic Tree توسط برنامه MEGA4 مدل neighbor jouining با bootstrap 1000

بحث

روتا ویروس گروه A مهمترین انتروپاتوژن ویروسی در کودکان زیر 5 سال با گاستروانتریت شدید ، در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته جهان است. این ویروس از لحاظ فصلی ،جغرافیایی ، چرخش گونه ها ونوترکیبی غیر معمول بین روتا ویروس های انسانی و حیوانی در مناطق مختلف تنوع بسیار گسترده ای دارد.

در این مطالعه با بهره گیری از تکنیک تشخیص مولکولی RNA_PAGE اقدام به شناسایی روتاویروس گروه A در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد در تهران گردید. به طوری که 29٪ از کودکان با گاستروانتریت حاد روتا ویروس شناسایی گردید، که با مطالعات گذشته در کشورمان نظیر مرودشت 28/4٪ در سالهای 1387-1386،مشهد 28/8٪ درسال 85-1384 ،اصفهان 30/8٪در سال 1385، گرگان 15٪ در سال 1385 ،تهران 35٪ در سال 1385-1384 و 37٪در سال79 – 1378،مازندران61/4٪ درسال1383و66/9٪ در سال1384، اهواز 29/5٪ درسال1381 و تهران 15/7٪ در سال 1376-1375 قابل مقایسه می باشد(20-11). قابل ذکر است که روش های تشخیصی در این مطالعات بر اساس به کارگیری تکنیک ELISA و روش های مولکولی بوده است .به نظر می رسد بیشترین شیوع گاستروانتریت روتا ویروس در استان مازندران در سالهای 1384-1383 اتفاق افتاده است.

همچنین مطالعات مشابهی در سایرنقاط جهان به طور مثال در ایتالیا 34/9٪در سال 2008 ، کشور پرتغال 55/2٪ در سال 2007 ، در ژاپن 19/4٪در سالهای 2006 و2005 ،کردستان عراق عفونت روتا ویروس 37٪ در سال 2005 ،عربستان صعودی28٪درسالهای 2005و 2004 ،ترکیه 23/4٪ درسالهای 2000تا 2002، و در کره 78/2٪در سالهای 2002 تا 2004 گزارش شده است. همچنین در مطالعاتی که در36 بیمارستان در9 کشور آسیایی در سال 2004 انجام شده میانگین عفونت روتا ویروس به میزان 45٪ در کودکان زیر 5 سال مبتلا به گاستروانتریت حاد مشخص شده است (28-21).

در این مطالعه، الکتروفروتایپ های روتا ویروس RNA Long Pattern با فراوانی بیش از 90 ٪ در چرخش بوده و سویه غالب و پایدار محسوب شده است. در مطالعه ای که در سالهای 1380 تا 1383 درتهران انجام شده سویه های روتا ویروس RNA Long Pattern الگوی غالب بوده درحالی که سویه های روتا ویروس RNA Short Pattern با چرخش ناپایدارمشاهده شده است(5). همچنین در بررسی که در اهوازانجام گرفت الکتروفروتایپ Long 78٪ بوده و سویه های ویروسی با الگوی Short 22٪ معرفی گردید(19) . در آفریقای جنوبی طی بررسی اپیدمیولوژی مولکولی گاستروآنتریت روتاویروس در شیرخوران بستری در بیمارستان مشخص شد که 69٪ Long Types و 27٪ Short Types هستند وسویه های Long Types به نسبت Short Types پایداری بیشتری نشان دادند (29) .

در این مطالعه مشخص شد که میزان اسهال روتا ویروس در دختران و پسران تقریباً مشابه بوده است.همچنین در مطالعات پیشین نیز تفاوت معنی داری از لحاظ جنس برای عفونت روتا ویروس گزارش نشده است.

در این تحقیق بیشترین شیوع گاستروانتریت روتا ویروس در کودکان زیر 2 سال مشاهده شد .طبق گزارشات ثبت شده در مطالعات مختلف ، کودکان زیر دوسال بیشترین آمار عفونت روتا ویروسی را نشان داده اند که بیشترین میزان بین سنین 6 تا 24 ماهگی می باشد. در ایتالیا 67/6٪ از کودکان زیر 2 سال بودند (21) که با میزان عفونت روتا ویروس در کشورهای در حال توسعه قابل مقایسه می باشد (9) .

در این مطالعه بیشترین موارد گاستروانتریت روتا ویروس کودکان در فصول سرد سال(زمستان و پاییز) مشاهده شد که با گزارشات اخیردر ارتباط با توزیع فصلی عفونت روتا ویروس در کشورمان مطابقت دارد (12-13). در استرالیا مطالعاتی در طی 10 سال صورت گرفت که شیوع بیماری گاستروانتریت روتا ویروس را از نظر دمایی و رطوبت بررسی کرد و نشان داد که بیشترین میزان عفونت روتا ویروسی در زمستان و سپس بهار بوده است و کمترین میزان در تابستان می باشد و همچنین نشان داده شد که دما و رطوبت با میزان شیوع این بیماری رابطه دارد (30)و نیز در گزارش جامعی که در کشورهای اروپایی (فرانسه، بلژیک، ایتالیا، آلمان ،سوئد ،اسپانیا، انگلیس) صورت گرفت نیز حداکثر شیوع فصلی بیماری ،در ماههای سرد سال نشان داده است(31).

درمطالعهٔ ما که طی سالهای89 -1387در تهران در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد انجام شد روتا ویروس ژنوتیپ (81/9٪) P[8] سویه غالب ویروسی وسپس ژنوتیپ های (8/4٪) P[4] و(7/2٪)P[6] سویه های روتا ویروس در چرخش بودند. در مطالعاتی که طی سالهای گذشته در ایران ،عربستان صعودی وژاپن انجام شده ،ژنوتیپ های P[8] وP[4] گزارش شدند (25-23-32). درکنیا در سالهای1999و2000 ژنوتیپ P[6] سویه ویروسی غالب بوده در حالی که در سالهای بعد تایپP[8] غالب شناخته شده است (33). در ژاپن درطی 28 سال (1981- 2008) ژنوتیپ غالب P[8]G1 بوده است (34). در ترکیه در سالهای 2000و2001 ، کردستان عراق در سال 2005 و در بسیاری از کشورها هر سه تایپ VP4(P[8] ،P[4] وP[6]) شناسایی شد که با آمار مطالعاتی ما تشابه دارد وغالب ترین سویه در ترکیه G4P[8] (44٪) ودر عراق G1P[8]و G2P[4] (50٪>) بوده اند (24-26) در کره که بیشترین آمارعفونت روتا ویروسی(78/2٪) را در میان کودکان با گاستروانتریت حاد نشان داده است ، P[8] سویه غالب (53٪)بوده و P[4]وP[6] به میزان مشابه (حدود 15٪) ، P[9] (2/3٪) و ژنوتیپ های غیر معمول G8P[8]وG12P[6] گزارش شده است(27). در میان کشورهای آسیایی هند بیشترین میزان بیماری گاستروانتریت روتاویروس را به خود اختصاص داده است به طوری که تایپ غیر معمول P[19]وP[11] علاوه بر3 تایپ معمول روتا ویروس انسانی با سویه G9P[19]و G10P[11] ، گزارش شده است(35). در تحقیق ما 2/4٪ سویه میکس(P[4]P[6]وP[8]P[4]) مشاهده شد ودر برزیل نیز در سال 2007 تایپ های میکس از VP4 گزارش شد که شامل P[8]P[6]، P[6]P[4]وP[4]P[6]P[8] بودند و در همان سال در پرتغال تایپ P[8]P[4] نیز گزارش شد(22-36) .

بطور معمول گاستروانتریتهای ویروسی با علائم بالینی اسهال آبکی، تب و استفراغ همراه است و معمولا دل پیچه در این موارد بندرت مشاهده می شود .در این میان اسهال از همه علائم بیشتر شیوع را دارد. یافته های این

درآنالیزفیلوژنتیک سویه های روتا ویروس مشخص شد که سویه های P[8] در چرخش در کودکان تهران از نظر سکانس نوکلئوتیدی با ژنوتیپ های P[8] در چرخش در کشور روسیه بیشترین همولوژی را دارد و در مرتبه دوم با سکانسهای مشخص شده در کشور های آسیایی از جمله چین ، هند، تایلند و ژاپن نزدیکی دارند و نهایتاً این سویه های در چرخش با سویه های P[8] کشورهای اروپایی(ایتالیا) نیز تشابه بسیار نزدیکی دارند. ژنوتیپ های P[4] در چرخش در این مطالعه با سویه های در گردش در کشورهای آسیا ، آفریقا، اروپا و آمریکای جنوبی دارای همولوژی ونزدیکی بالایی می باشد . همچنین ژنوتیپ های P[6] شناسایی شده دارایی همولوژی بالایی با سویه های در چرخش در کشورهای آسیایی، اروپایی ، آفریقایی و آمریکای شمالی و جنوبی داشته اند. در نتیجه میتوان ذکر کرد ،تشابه سکانس نوکلئوتید ژنوتیپ VP4 شناسایی شده در این مطالعه با کشور های مختلف جهان، می تواند بیانگر چرخش جهانی سویه های ژنوتیپ های P[8]، P[4] و P[6] در سالهای 2009 و 2010 باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهد که روتا ویروس عامل مهم گاستروانتریت حاد کودکان زیر 5 سال در تهران می باشد و P[8] سویه روتا ویروسی غالب بوده ونیز سویه های ویروسی شناسایی شده در این مطالعه با روتا ویروسهای در چرخش با کشورهای آسیایی قرابت آنتی ژنیک بالا داشته اند.

تشکر وقدردانی

از زحمات و همکاری صمیمانه پرسنل بخش ویروس شناسی انستیتو پاستور و نیز کادر پرستاری بیمارستان کودکان بهرامی و مفید که در انجام مراحل مختلف این تحقیق مارا یاری نمودند سپاسگزاری می نماییم.

REFERENCES

1.Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS , Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg Infect Dis; 2006 Feb ;12 (2): 304–6.

2.Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. Arch Virol Suppl; 1996;12: 119–289.

3.Kiulia NM, Kamenwa R, Irimu G, Nyangao JO, Gatheru Z, Nyachieo A, et al. The Epidemiology of Human Rotavirus Associated with Diarrhoea in Kenyan Children: A Review. Journal of Tropical Pediatrics ; 2008 July;1-5

4. Bresee JS, Fang ZY, Wang B, Wilopo SA , Kilgore P, Kim JS ,et al. First report from the Asian rotavirus surveillance Network. Emerg Infect Dis. 2004 June;10:988–95.

5.Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect; 2003 April ; 9(4) :247-62.

6.ate JE, Simonsen L,Viboud C, Steiner C, Patel MM, Curns AT ,et al.Trends in Intussusception Hospitalizations Among US Infants, 1993–2004: Implications for Monitoring the Safety of the New Rotavirus Vaccination Program.Pediatrics. 2009 May; 121(5):1125-32.

7.Hyser JM and Estes MK. Rotavirus Vaccines and Pathogenesis: 2008. Curr Opin Gastroenterol. 2009 January .25(1); 36–43.

8.esselberger U .Reoviruses in specific viruses and viral infections. In: Topley & wioson,s, virology. 9 th edition.London: Arroled Press1998.,537-545.

9.Long-Croal LM, Wen X, Ostlund EN and Hoshino Y . Concentration of acrylamide in a polyacrylamide gel affects VP4 gene coding assignment of group A equine rotavirus strains with P[12] specificity. Virology Journal 2010, 7:136.

10.amura K ,Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4:Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA)software version 4.0.molecular biology and avolution.2007;24:1596-99.

11.Kargar M, Zare M. High Frequency of Mixed Genotypes Rotavirus among Children Hospitalized With Acute Gastroenteritis.2007-2008. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2010 July;15(49):1-5. (Full Text in Persian).

12.Sadeghian A, Hamedi A, Sadeghian M and Sadeghian H. Incidence of Rotavirus Diarrhea in Children Under 6 years Referred to the Pediatric Emergency and Clinic of Ghaem Hospital, Mashhad, Iran , Acta Medica Iranica, 2010;48(4):263-5

13.Kazem A, Tabatabaie F, Agha Ghazvini MR, Kelishadi R .The role of Rotavirus in Acute Pediatric Diarrhea in Isfahan,Iran, Pak J Med Sci ; 2006 Sep; 22 (3): 282-85.

14.oradi AV, Tabaraei AJ, Roushandel GR, Ghaemi A, Bazori M. Frequency of Acute Rota-Viral Diarrhea in Children Under 6 years in Gorgan,in 2006.Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2010 March;15(48):55-59 (Full Text in Persian).

15.Kargar M, Zaree-Mahmod- abadi B, Tabatabei H, Sadeghipour S, Nategh R. Genotyping of VP_7 Protein with Nested RT-PCR, in Children Hospitalized in Tehran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine.2007 Jan;12(39):11-17(Full Text in Persian).

16.Habibi E,Ghorbani S, Jarollahi A, Zali MR. Serotyping of group A rotaviruses in children less than 7 years old in Tehran.Journal of the faculty of medicine.2004 Oct;28(3):211-214(Full Text in Persian).

17.Hamkar R, Yahyapour Y., Noroozi M., Jalivand S., Adibi L., Vaziri S, et al.Prevalence of Viral Agents among Children with Acute Gastroenteritis in Mazandaran Province, 2004-2005. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine.2007;12(39):35-40(Full Text in Persian).

18.Yahyapour Y, Savadkoohi R, Hajian K, Jalilvand S, Hamkar R . Prevalence of rota, adeno and astrovirus in children with acute gastroenteritis in Babol, Iran. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2008;10(1),(Full Text in Persian).

19.Samarbafzadeh A, Mazaheri Tehrani E, Makvandi M and Taremi M. .Epidemiological aspects of rotavirus infection in Ahwaz, Iran. Journal of Health, Population and Nutrition. 2005 sept ; 23(3): 245–9.

20.Modarres Sh, Modarres Sh and Nassiri Oskoii N**.** Rotavirus infection in infants and young children with acute gastroenteritis in the Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health Journal **,** 1995; 1(2), 210-14.

21.uccotti G, Meneghin F, Dilillo D, Romanò L, Bottone R, Mantegazza C ,et al. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. BMC Infectious Diseases, 2010 July ,10:218.

22.Antunesa H, Afonsoa A, Iturriza M, Martinhod I, Ribeirod C, Rochaeet S, et al. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. Journal of Clinical Virology. 2009 March.45; 76–78.

23.Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, et al. Detection and Genetic Characterization of Group A Rotavirus Strains Circulating among Children with Acute Gastroenteritis in Japan. Journal of Virolog , 2007 May;81(9): 4645–53.

24.hmed HM, Coulter JBS, Nakagomi O, Hart CA, Jamal MZ, Rabaty AA, et al. Molecular Characterization of Rotavirus Gastroenteritis Strains, Iraqi Kurdistan. Emerging Infectious Diseases, 2006 May; 12(5): 824-26.

25**.**Kheyami AM, Nakagomi T, Nakagomi O, Winifred D, Hart A and Cunliffe NA. Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children in Saudi Arabia: First Detection of G9 and G12 Strains. Journal of Clinical Microbiology.2008 Apr;46(4) :1185–91.

26 .taloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. Epidemiol Infect. 2005;133(4):673–8.[abstract]

27.Le VP, Kim JY, Cho SL, Nam SW, Lim I, Lee HJ ,et al. Detection of Unusual Rotavirus Genotypes G8P[8] and G12P[6] in South Korea . Journal of Medical Virology, 2008 Sept , 80:175–182.

28.Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson E.A.S, Tam J, Soenarto Y, et al. First report from the Asian rotavirus surveillance Network. Emerg Infect Dis. 2004 June;10(6):988–95.

29.Fiomah H, Griffiths AD. The molecular epidemiology of rotavirus-associated gastroenteritis in the Tramskei, southern Africa. Anna of trop pediatr. 1992; 12 : 259-264.

30.souza RM, Hall G and Bescer NG. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. Epidemiol Infect .2008; 136, 56–64.

31.Damme PV, Giaquinto C, Maxwell M, Todd P and Wielen MV. Distribution of Rotavirus Genotypes in Europe,2004–2005: The Reveal Study, Rotavirus Genotype Distribution in Europe. The Journal of Infectious Diseases.2007; 195:17–25.

32.Farahtaj F, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Taremi M , Zali MR, Edalatkhah H, et al. Rotavirus VP7, VP4 and VP6 genotypes co-circulating in Tehran, Iran, between 2003 and 2004. Epidemiol Infect. 2007;135: 834–8.

33.iulia NM, Kamenwa R, Irimu G, Nyangao JO, Gatheru Z, Nyachieo A ,et al. The Epidemiology of Human Rotavirus Associated with Diarrhoea in Kenyan Children: A Review, Journal of Tropical Pediatrics .2008 July; 1-5.

34Dey SK, Ushijima H, Phathammavong O, Chanit W, Okitsu S, Mizuguchi M, et al .Seasonal trend and serotype distribution of rotavirus infection in Japan, 1981-2008. Pediatr Infect Dis J. 2010 Feb;29(2):166-7.[abstract]

35.Ramani S and Kang G. Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. Indian J Med Res. 2007 May ; 125(5): 619–32.

36.Freitas ERL, Soares CMA, Fiaccadori FS, Souza M, Parente JA, Costa PSS, et al. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 June;27:1065–69.

37.Taremi M, Farahtaj F, Gachkar L, Adalatkhah H, Zali MR, Fayaz A. Epidemiological survey of Rotavirus infection among children less than 5 years with acute diarrhea admitted in Markaz Tebbi pediatric hospital, Tehran, 2003-4. Iranian Journal of Infectious Diseases and tropical Medicine.2005; 10(31)20-28(Full Text in Persian).