

بررسی تعیین تیپ سرمی روتاویروس‌های گروه A در کودکان زیر ۷ سال در تهران

عفت حبیبی*، دکتر شیرین قربانی**، دکتر علی جاراللهی*، دکتر محمدرضا زالی*

* مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا

چکیده

سابقه و هدف: روتاویروس انسانی گروه A شایع‌ترین عامل اسهال و استفراغ شدید در نوزادان در جهان می‌باشد. **مواد و روشها:** در بررسی حاضر، ۱۸۰ نمونه مدفوع از اطفال و نوزادان با اسهال و استفراغ شدید از دو بیمارستان کودکان در تهران از دی ماه ۱۳۷۹ تا دی ماه ۱۳۸۰ جمع‌آوری شد که با استفاده از روش سرولوژی الایزا نمونه‌های آلوده معین گردید. **یافته‌ها:** عفونت گروه A روتاویروس در ۶۶ نمونه تشخیص داده شد. بررسی‌های تعیین تیپ سرمی نمونه‌های ویروسی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال هفت سروتیپ $G_1, G_2, G_3, G_4, G_6, G_8, G_9$ در آزمایشات الایزا نشان داد که سروتیپ‌های G_1 و G_4 شایع‌ترین تیپ‌های سرمی در حال گردش در بین اطفال و نوزادان آلوده در تهران می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه، سروتیپ‌های G_1 و G_4 بیشترین فراوانی را نشان دادند. همچنین بیشترین شیوع فصلی روتاویروسی در فصل سرما مشاهده شد. **واژگان کلیدی:** روتاویروس، تیپ سرمی، اطفال.

مقدمه

تعیین می‌شود (۳). روتاویروس انسانی گروه A (HRV) شایع‌ترین عامل اسهال و استفراغ شدید در نوزادان در جهان می‌باشد (۶). تا بحال، ۷ سروتیپ G از گروه A روتاویروس انسانی توسط مطالعات خنثی‌سازی تعیین شده است که ۴ سروتیپ (G_1 تا G_4) انتشار عمده‌ای دارند. مطالعات اخیر نشان داده است که برخی سروتیپ‌ها در مناطق خاصی از جهان شایع‌ترند. از قبیل سروتیپ G_9 که در هند (۷) و سروتیپ G_5 که در برزیل وجود دارد (۸). در بررسی حاضر، تیپ‌های سرمی در حال گردش در تهران و توزیع فصلی روتاویروس را طی یک سال تعیین نمودیم.

مواد و روشها

نمونه‌های مدفوع کودکان زیر ۷ سال مبتلا به اسهال حاد که در فاصله دی ماه ۱۳۷۹ تا دی ماه ۱۳۸۰ به مرکز طبی

روتاویروسها از مهمترین عوامل اتیولوژیک اسهال و استفراغ شدید در نوزادان و کودکان هستند. این ویروسها، بیش از ۹۰ درصد اطفال زیر ۳ سال را آلوده می‌کنند (۱) و عامل ۱ میلیون مورد مرگ در سال می‌باشند (۲). روتاویروسها، ویروسهای بیست وجهی و بدون پوشینه‌اند که به خانواده رئوویریده متعلق‌اند و شامل سه لایه پروتئینی هستند که ۱۱ قطعه RNA دو رشته‌ای را احاطه می‌کنند (۳). داخلی‌ترین لایه شامل VP_1, VP_2, VP_3 و ژنوم می‌باشد. لایه میانی شامل VP_6 و لایه خارجی شامل گلیکوپروتئین VP_7 و اسپایکهای دایمر VP_4 است (۴،۵).

شاخص سروتیپ براساس دو پروتئین کاپسید خارجی VP_4 (سروتیپ‌های P، بخاطر اینکه پروتئین حساس به پروتئاز است) و VP_7 (سروتیپ‌های G، بخاطر اینکه گلیکوپروتئین است)

برای تعیین تیپ‌های سرمی نمونه‌ها با استفاده از روش الایزا به صورت زیر عمل شد.

ابتدا ته هر چاهک با ایمونوگلوبولین G از HRV با سروتایپ‌های $(D)G_1$ ، $(DS-1)G_2$ ، $(ItO)G_3$ ، $(ST3)G_4$ ، $(PA169)G_6$ ، $(HAL 1166)G_8$ و $(W161)G_9$ پوشانیده شد. نمونه‌ای به نسبت ۱۰ درصد وزن/حجم از سوسپانسیون مدفوع در بافر فسفات سالین (PBS) با سانتیفریوژ در $2000g$ به مدت ۱۰ دقیقه میان گریز گردید و مایع رویی در آزمایشات الایزا به کار گرفته شد. آنتی‌ژن همولوگ هر سرو تایپ روتاویروس به عنوان کنترل بررسی به کار گرفته شد. PBS-Tween 20-Ca که حاوی ۲ درصد وزن/حجم بود در شیرخشک بی‌چربی به مجموعه افزوده شد. بعد از انکوباسیون در $37^{\circ}C$ به مدت ۳ ساعت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال روتاویروس انسانی (HRV) از تیپ‌های سرمی مذکور که در محلول PBS-Tween حاوی یک درصد سرم آلبومین گاوی (BSA) به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق شده بود را به چاهک‌ها افزودیم. سپس مجموعه در $37^{\circ}C$ به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد، ایمونوگلوبولین G گوسفند کنژوگه شده با آنزیم پراکسیداز ضدایمونوگلوبولین انسانی را در رقت ۱/۱۰۰۰ در PBS-Tween20 حاوی ۱ درصد از BSA تهیه و به مجموعه افزودیم. پلیت‌ها به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در $37^{\circ}C$ انکوبه شدند. در انتها، محلول سوبسترای ABTS (2,2 Azinobis diethylbenzothiazolin 6-sulfonic acid) به حفره‌ها اضافه شد.

پلیت‌ها در حرارت اتاق به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در تاریکی نگاه داشته شد و سپس به وسیله اسپکتروفوتومتر، طیف سنجی نمونه‌ها با کاربرد فیلتر با اندازه منافذ $420nm$ انجام گرفت (۱۱).

تعیین تیپ سرمی نمونه‌ها در میکروسکپ الکترونی توسط دو تکنیک بدام اندازی^۲ و دکوراسیون^۳ انجام گرفت.

تکنیک بدام/اندازی

در این روش از پولک‌های نیکلی میکروسکپ الکترونی که دارای لایه‌ای از فیلم حامل Formvar و پوشش کربن بودند، استفاده گردید. ابتدا روی قطراتی از محلول پروتئین A یک درصد قرار داده شد. پس از انکوباسیون ۴ ساعته، سطح پولک‌ها را توسط بافر فسفات شسته و بعد از آن پولک‌ها روی قطرات ۱۰ میکرولیتری از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مذکور در رقت ۱/۵۰ قرار داده شد و بعد از شستشوی مجدد، پولک‌ها روی قطرات

کودکان شهید حسن اهری و بیمارستان کودکان مفید مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. در مجموع، ۳۰۰ نمونه جهت بررسی جمع‌آوری گردید که از این تعداد ۱۸۰ نمونه جهت جداسازی روتاویروس و آزمایش الایزا مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها حداکثر تا ۲۴ ساعت پس از مراجعه بیماران به مراکز پزشکی جمع‌آوری گردید. از هر بیمار نمونه مدفوع در دو لوله جداگانه برداشت گردید. نمونه‌های مدفوعی به لوله‌های حاوی بافر TNC (10mM Tris- 1 mM CaCl₂), 100mM NaCl, HCl, PH=7.4 جهت انجام آزمایشات الایزا و میکروسکپ الکترونی منتقل شد. این لوله‌ها در $4^{\circ}C$ - و همچنین تعدادی در $20^{\circ}C$ - نگهداری شدند (۹).

روش الایزا که در این بررسی به کار رفت مطابق روشی است که قبلاً شرح داده شده است (۳،۴). در این آزمایشات از پلیت‌های ته صاف پلی استیرن ۹۶ چاهکی (F-8 Immunomodules, NUNC, Denmark) استفاده شد. ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول گاماگلوبولین اختصاصی در بافر پوششی که به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق شده بود، به حفرات پلیت اضافه شد و پلیت در $37^{\circ}C$ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت گرماگذاری گردید. سپس سه بار شستشو با بافر (PBS-Tween) انجام شد. بعد از این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های مورد آزمایش (سوسپانسیون‌های مدفوعی) و نمونه‌های کنترل (کنترل مثبت و منفی) به چاهک‌های جداگانه اضافه شد. سپس پلیت‌ها در $37^{\circ}C$ به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. بعد از این مرحله، سه بار شستشو توسط بافر انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنزیم کنژوگه که در بافر کنژوگه رقیق شده بود به چاهک‌ها اضافه شد و انکوباسیون در دمای $30^{\circ}C$ -۱۵ به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. بعد از سه بار شستشو، ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای A: ۳ و ۵ و ۵⁻ تترامیل بنزیدین (TMB) (DAKO, UK) و ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای B: پراکسید هیدروژن H_2O_2 (DAKO, UK) به چاهک‌ها اضافه و انکوباسیون در دمای $30^{\circ}C$ -۱۵ بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. نیم ساعت بعد نتایج بررسی و در جداولی که به این منظور تهیه شده بود، یادداشت شدند. در این واکنش، بروز رنگ آبی به منزله واکنش مثبت و عدم تغییر رنگ به عنوان واکنش منفی تلقی می‌گردد. جذب فوتومتری محتوی چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج^۱ ارزیابی شد (۱۰).

² Trapping

³ Decoration

¹ ELISA reader

تیپ سرمی روتاویروسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: آنتی بادیهای مونوکلونال بخوبی قادر به عکس العمل نزدیک با آنتی ژن با تیپ سرمی همانند بودند. نمونه‌هایی که در آزمایشات قبلی تیپ سرمی آنها تعیین شده بود با روش بدام اندازی و دکوراسیون کاملاً متمایز می‌گردیدند. از ۱۰ نمونه مدفوع حاوی روتاویروس در این بررسی، ۳ نمونه بخوبی با آنتی بادی G_1 و ۴ نمونه به وضوح با آنتی‌بادی G_4 دکور گردیدند.

سوسپانسیون حاوی ویروس نهاده شد. زمان انکوباسیون پولکهای تیمار شده با آنتی بادیهای مونوکلونال ۳ ساعت بود. سپس عمل شستشو با آب مقطر انجام شد و پس از آن عمل رنگ‌آمیزی با محلول استات اورانیم ۲ درصد با $PH=4$ صورت گرفت (۱۲). به منظور کنترل آزمایش از سرم نرمال در بدام اندازی پیکره‌های ویروسی بعنوان شاهد استفاده گردید. در نهایت نمونه‌های تهیه شده مورد بررسی و مشاهده در میکروسکپ TEM قرار گرفت.

تکنیک دکوراسیون

در این بررسی از پولکهای مسی دارای پوشش Formvar و غبار کربن استفاده شد. به این ترتیب که این پولکها به مدت ۱۵ دقیقه روی قطرات ۱۵-۱۰ میکرولیتری سوسپانسیون حاوی ویروس نهاده شد. بعد از این مرحله، سطح پولک را توسط بافر فسفات شسته و آن را روی قطره‌ای از آنتی بادی‌های مونوکلونال مذکور در رقت $1/50$ قرار دادیم. بعد از ۱۵ دقیقه، سطح پولکها را با آب مقطر استریل شسته و بلافاصله عمل رنگ‌آمیزی با محلول استات اورانیم ۲ درصد، با $PH=4$ انجام شد (۱۲، ۱۳).

نمودار ۱- شیوع فصلی روتاویروس از دی ماه ۱۳۷۹ تا دی ماه ۱۳۸۰ در تهران

یافته‌ها

نتایج آزمون الایزا:

یک نمونه وقتی مثبت در نظر گرفته شد که چگالی نوری آن بزرگتر یا مساوی با سه برابر چگالی نوری کنترل منفی بود. در این پژوهش از ۱۸۰ نمونه مورد بررسی، ۶۶ نمونه دارای روتاویروس شناخته شد. به عبارت دیگر، روتاویروسها در ۳۷٪ از کودکان زیر ۷ سال مورد بررسی وجود داشت. توزیع سنی مبتلایان به اسهال روتاویروسی در دو گروه سنی نشان می‌دهد که ۶۵٪ نمونه‌ها زیر ۳ سال و ۳۵٪ ۳-۷ سال داشتند. از بین ۱۸۰ نمونه که طی یک سال مورد بررسی قرار گرفت، روتاویروسها در فصل زمستان بیشترین فراوانی شیوع را نشان داد. توزیع فصلی روتاویروس در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج تعیین تیپ سرمی با استفاده از روش الایزا:

با استفاده از آنتی‌بادهای مونوکلونال تیپهای سرمی G_1 ، G_2 ، G_3 ، G_4 ، G_6 ، G_8 و G_9 در بررسی‌های الایزا معین گردید که ده نمونه به کار برده شده که از نظر حضور روتاویروس (HRV) مثبت بودند، دارای تیپ‌های سرمی G_1 و G_4 می‌باشند. از ۱۰ نمونه تحت بررسی، ۴ نمونه دارای تیپ سرمی G_1 ، ۵ نمونه دارای تیپ سرمی G_4 و ۱ نمونه واکنش بخصوص با هیچ یک از سروتاپیپ‌های فوق نشان نداد.

بحث

این بررسی مطالعات پیشین در خصوص درگیری کودکان کم سال (۳-۵ سال) به روتاویروسهای گروه A بعنوان مهمترین عامل اسهال حاد در کودکان کشورهای توسعه یافته یا در حال توسعه را تأیید می‌کند (۱۴-۱۶).

در این بررسی، برای تعیین تیپ‌های سرمی گروه A از HRV در نمونه‌های مدفوع آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی خنثی کننده برای VP_7 در EIA ساندویچی به کار رفت. سروتاپیپ‌های G_1 و G_4 بیشترین فراوانی را نشان دادند که با نتایج گزارش شده در منابع علمی جهان مطابقت دارد (۱۱، ۱۴).

در این بررسی، امکانات لازم برای تعیین تیپ سرمی ۱۰ نمونه (۱۵٪) از نمونه‌های مدفوع فراهم بود. گاهی عدم موفقیت برای تعیین تیپ سرمی نمونه‌ها ممکن است مربوط به عدم حضور اپی تپ‌های قابل تشخیص با آنتی‌بادهای مونوکلونال به کار رفته (که دچار تغییر در سوبه شده‌اند) باشد. علاوه بر این حضور فاکتورهای محافظتی در نمونه‌های مدفوع نیز در این خصوص موثر

در این بررسی در طول این ۱۲ ماه الگوی پذیرش بیمارستانی با اسهال حاد از ماهی تا ماه دیگر نوسان داشت. البته با توجه به طول زمان بررسی ما قادر به تعیین این نوسان بطور قابل اعتماد در طول ماه‌های مختلف نگردیدیم. با این حال شیوع فصلی روتاویروسی در این مطالعه با نوسان فصلی ذکر شده در کتابها مطابقت دارد. مطالعات جامعتر و طولانی‌تر بر روی نمونه‌های بیشتر در این زمینه رهگشا خواهد بود.

شناخته شده است (۱۷). از طرفی، آلودگی همزمان با دو تیپ سرمی از HRV ممکن است منجر به آلودگی‌های مخلوط و نتایج ضد و نقیض گردد. نوسان فصلی شیوع آلودگی HRV در نقاطی با آب و هوای معتدل گزارش شده و تأیید گردید که شیوع فراوانتری در فصول سردتر سال وجود دارد. الگوی اپیدمی سالانه HRV در آمریکای شمالی که حاصل مطالعه‌ای ۵ ساله در ۸۸ مرکز بهداشتی در آمریکا، کانادا و مکزیک است نیز الگوی مشابهی به دست داده است (۱۸).

REFERENCES

1. Kapikian AZ, Chanock RM, Howley PM, Melnick JL, Straus SE, editors. *Fields virology*. 3rd edition. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; p: 1657-1708.
2. Glass RI, Gentsch J, Smith JC. Rotavirus vaccines: success by reassortment? *Science* 1994; 265: 1389-91.
3. Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Kapikian AZ, Chanock RM, Howley PM, Melnick JL, Straus SE, editors. *Fields virology*. 3rd edition. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; p: 1625-55.
4. Prasad BVV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by 3D cryo-electron microscopy. *Nature* 1990; 343: 476-79.
5. Shaw AL, Rothangel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W. Three-dimensional visualization of rotavirus hemagglutinin structure. *Cell* 1993; 74: 693-701.
6. Zoysa de I, Feachem RG. Interventions for the control of diarrheal diseases in young children: Rotavirus and cholera immunization. *Bull WHO* 1985; 63: 569-83.
7. Ramachandran MBK, Das A, Kumar SS, Bahmbal N, Kesari H, et al. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 436-39.
8. Leite JP, Alifler AA, Woods P, Glass RI. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: Characterization by RT-PCR, probe hybridization and sequence analysis. *Arch. Virol* 1996; 141: 2365-74.
9. Colomina J, Teresa Gil M, Codoner P, Buesa J. Viral proteins VP2, VP6 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection. *J Med. Virol* 1998; 56: 58-65.
10. Ciarlet M, Crawford SE, Barone C, Conner ME. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induced active protective immunity. *J Virol* 1998; 72: 9233-46.
11. Sherif FR, Mamdouh KG, Safinaz E, EL-Saifi AF. Serotyping of group A rotaviruses in Egyptian neonates and infants less than 1 year old with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2996-98.
12. Mnhy BWJ, editor. *Virology; A practical approach*. Oxford University Press. 1991; p: 151-62.
13. Hoppert M, Holzenburg K, editors. *Electron microscopy in microbiology*. BIOS Scientific Publishers. 1998; p: 11-78.
14. Bern C, Glass RI. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: Kapikian AZ, editor. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 3rd edition. Marcel Dekker, New York, 1998; p: 1-26.
15. Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, Jin S, Smith JC, Wood PA, et al. The epidemiology of rotavirus diarrhea in United States: Surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 1996; 174: S5-S11.
16. Ryan MJ, Ramsay M, Brown D, Gray N, Farrington J, Wall CP. Hospital admissions attributable to rotavirus infection in England and Wales. *J Infect Dis* 1996; 174: S12-S78.
17. Ward RL, Neal MC, Clemens JD, Sack DA, Rao M, Huda N, et al. Reactivates of serotyping monoclonal antibodies with culture adapted human Rotavirus. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 449-56.
18. Gouvea V, Hames J, Glass RI. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA. *J Infect Dis* 1990; 162: 362-67.