

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

عفت حبیبی^{*}، دکتر شیرین قربانی^{**}، دکتر علی جارالله^{*}، 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 روشهای:** در بررسی حاضر، ۱۸۰ نمونه مدفعه 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 سروولوژی 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 سروتایپ G₁, G₉, G₈, G₆, G₄, G₂, G₃ در آزمایشات الایزا نشان داد که سروتایپ‌های G1 و G4 شایع‌ترین تیپ‌های سرمی در حال گردش در بین اطفال و نوزادان آلوده در تهران می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه، سروتایپ‌های G1 و G4 بیشترین فراوانی را نشان دادند. همچنین بیشترین شیوع فصلی روتاویروسی در فصل سرما مشاهده شد. **واژگان کلیدی:** روتاویروس، تیپ سرمی، اطفال.

تعیین می‌شود (۳). روتاویروس انسانی گروه A (HRV) شایع‌ترین عامل اسهال و استفراغ شدید در نوزادان در جهان می‌باشد (۶). تا حال، ۷ سروتایپ G از گروه A روتاویروس انسانی توسط مطالعات خنثی سازی تعیین شده است که ۴ سروتایپ (G₁ تا G₄) انتشار عمده‌ای دارند. مطالعات اخیر نشان داده است که برخی سروتایپ‌ها در مناطق خاصی از جهان شایع‌ترند. از قبیل سروتایپ G₉ که در هند (۷) و سروتایپ G₅ 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 روشهای

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

مقدمه

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 VP₁, VP₂ و VP₃ و ژنوم می‌باشد. لایه میانی شامل VP₆ و لایه خارجی شامل گلیکوپروتئین VP₇ و اسپایکهای دایمر VP₄ است (۴,۵).

شاخص سروتایپ براساس دو پروتئین کاپسید خارجی VP₄ (سروتایپ‌های P، بخارط اینکه پروتئین حساس به پروتئاز است) و VP₇ (سروتایپ‌های G، بخارط اینکه گلیکوپروتئین است)

تعیین تیپ سرمی روتاویروس گروه A در کودکان

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

ابتدا ته هر چاهک با ایمونوگلبولین G از HRV با سروتایپ‌های I_1 , G_2 , $(D)G_3$, $(DS-1)G_4$, $(Ito)G_5$, $(ST3)G_6$, $(HAL)G_8$, $PA169G_9$ و $(W161)G_{10}$ پوشانیده شد. نمونه‌ای به نسبت ۱۰ درصد وزن/ حجم از سوسپانسیون مدفعو در بافر فسفات سالین (PBS) با سانتریفیوژ در $2000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه میان گریز گردید و مایع رویی در آزمایشات الایزا به کار گرفته شد. آنتی‌زن 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، ایمونوگلبولین G گوسفند کنزوگه شده با آنزیم پراکسید از ضدایمونوگلبولین انسانی را در رقت $1/1000$ در PBS-Tween 20 حاوی ۱ درصد از BSA تهیه و به مجموعه افزودیم. پلیتها به مدت ۱ تا $1/5$ ساعت در $37^\circ C$ انکوبه شدند. در انتهای محاصله سوبسکپت ABTS (2,2 Azinobis diethylbenzothiazolin 6-sulfonic acid) به حفره‌ها اضافه شد.

پلیتها در حرارت اتاق به مدت ۲۰ تا $30^\circ C$ دقیقه در تاریکی نگاه داشته شد و سپس به وسیله اسپیکتروفتومتر، طیف سنجی نمونه‌ها با کاربرد فیلتر با اندازه منفذ 420 nm 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 کریں 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 $10 \mu\text{L}$ میکرولیتری از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مذکور در رقت $1/50$ 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 حداقل تا $24^\circ C$ ساعت پس از مراجعه بیماران به مراکز پزشکی جمع‌آوری گردید. از هر بیمار نمونه مدفعو در دو لوله جداگانه برداشت گردید. نمونه‌های مدفعوی به لوله‌های حاوی بافر TNC ($10\text{mM Tris-}1\text{ mM CaCl}_2$, $100\text{mM NaCl}, \text{HCl, PH}=7.4$) 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 پلیتها تا صاف پلی استیرن ۹۶ چاهکی (F-8 Immunomodules, NUNC, Denmark) ابتداء مقدار $100 \mu\text{L}$ میکرولیتر از محلول گاماگلبولین 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 گرم‌گذاری گردید. سپس سه بار شستشو با بافر (PBS-Tween) انجام شد. بعد از این مرحله $100 \mu\text{L}$ میکرولیتر از نمونه‌های مورد آزمایش (سوسپانسیونهای مدفعوی) 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 $100 \mu\text{L}$ میکرولیتر از آنزیم کنزوگه که در بافر کنزوگه رقیق شده بود به چاهکها اضافه شد و انکوباسیون در دمای $30^\circ C$ به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. بعد از سه بار شستشو، $50 \mu\text{L}$ میکرولیتر از سوبسکپت A:۳ و ۳ و ۵ و ۵ تترامتیل بنزیدین (DAKO, UK) (TMB) و $50 \mu\text{L}$ میکرولیتر از سوبسکپت B: پراکسیدهیدروژن H_2O_2 (DAKO, UK) در چاهکها اضافه و انکوباسیون در دمای $30^\circ C$ به مدت 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 می‌گردید. جذب فتوомتری محتوی چاهکها در 450 nm ناتومتر 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 آنتیزن با تیپ سرمی همانند بودند. نمونه هایی که در آزمایشات قبلی تیپ سرمی آنها تعیین شده بود با روش بدام اندازی و دکوراسیون کاملاً متمایز می گردیدند. از ۱۰ نمونه مدفوع حاوی روتاویروس در این بررسی، ۳ نمونه بخوبی با آنتی بادی G₁ و ۴ نمونه بهوضوح با آنتی بادی G₄ 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 رنگ آمیزی با محلول استات اورانیم ۲ درصد با PH=۴ صورت گرفت (۱۲). به منظور کنترل آزمایش از سرم نرمال در بدام اندازی پیکرهای ویروسی بعنوان شاهد استفاده گردید. در نهایت نمونه های تهیه شده مورد بررسی و مشاهده در میکروسکوپ TEM قرار گرفت.

تکنیک دکوراسیون

در این بررسی از پولکهای مسی دارای پوشش Formvar و غبار کردن استفاده شد. به این ترتیب که این پولکها به مدت ۱۵ دقیقه روی قطرات ۱۰-۱۵ میکرومتری سوسپانسیون حاوی ویروس نهاده شد. بعد از این مرحله، سطح پولک را توسط بافر فسفات شسته و آن را روی قطره ای از آنتی بادی های مونوکلونال مذکور در رقت ۱/۵۰ قرار دادیم. بعد از ۱۵ دقیقه، سطح پولکها را با آب مقطر استریل شسته و بالافاصله عمل رنگ آمیزی با محلول استات اورانیم ۲ درصد، با PH=۴ انجام شد (۱۲، ۱۳).

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

یافته ها

بحث

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

در این بررسی، برای تعیین تیپ های سرمی گروه A از HRV در نمونه های مدفوع آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی خنثی کننده برای VP₇ در EIA ساندویچی به کار رفت. سروتاپ های G₁ و G₄ 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 نمونه های مدفوع فراهم بود. گاهی عدم موفقیت برای تعیین تیپ سرمی نمونه ها ممکن است مربوط به عدم حضور اپی تپ های قابل تشخیص با آنتی بادیهای مونوکلونال به کار رفته (که دچار تغییر در سویه شده اند) باشد. علاوه بر این حضور فاکتورهای محافظتی در نمونه های مدفوع نیز در این خصوص موثر

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 می دهد که ۶۵٪ نمونه ها زیر ۳ سال و ۳۵٪-۷٪ 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 الایز:

با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال تیپ های سرمی G₁, G₂, G₃, G₄, G₆, G₈ و G₉ در بررسی های الایزا معین گردید که ده نمونه به کار برده شده که از نظر حضور روتاویروس (HRV) مثبت بودند، دارای تیپ های سرمی G₁ و G₄ می باشند. از ۱۰ نمونه تحت بررسی، ۴ نمونه دارای تیپ سرمی G₁, ۵ نمونه دارای تیپ سرمی G₄ و ۱ نمونه واکنش بخصوص با هیچ یک از سروتاپ های فوق نشان نداد.

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 طولانی تر بر روی نمونه های 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 آلودگی های 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 مطالعه ای 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 diarrhoeal diseases in young children: Rotavirus and cholera immunization. Bull WHO 1985; 63: 569-83.
7. Ramachadran 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, Alifier 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 diarrhoeal 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.