

## بررسی شیوع و ژنوتایپینگ روتاویروس در کودکان مبتلا به اسهال حاد در تبریز

مریم صناعی<sup>۱</sup>، هوتن رادپور<sup>۲</sup>، دکتر عبدالعلی استقامتی<sup>۳</sup>، دکتر عباسعلی کشتکار<sup>۴</sup>، ملیحه نصیری<sup>۵</sup>، زهرا نوچی<sup>۶</sup>، سیدرضا محبی<sup>۷</sup>، دکتر فرامرز درخشان<sup>۸</sup>، دکتر محمد رضا زالی<sup>۹</sup>

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، محقق ویروس شناسی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (مؤلف مسؤول)، تلفن تماس: sanaeimaryam@yahoo.com ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۸

۲- کارشناس میکروبیولوژی، محقق ویروس شناسی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- مرکز مدیریت بیماریها، معاونت سلامت، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- اپیدمیولوژیست، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۵- کارشناس ارشد آمار زیستی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۶- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۷- کارشناس ارشد ویروس شناسی، محقق ویروس شناسی مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۸- فوق تخصص گوارش، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۹- فوق تخصص گوارش، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** روتا ویروس یکی از مهمترین عوامل ایجاد اسهال حاد در کودکان زیر ۵ سال می باشد. از این رو بررسی نمونه های اسهالی کودکان جهت تشخیص میزان شیوع روتاویروس، تعیین ژنوتایپ غالب به دلیل جلوگیری از مصرف نابجای آنتی بیوتیک و استفاده از واکسن ضروری به نظر می رسد. هدف این مطالعه بررسی میزان شیوع روتاویروس و ژنوتایپ غالب آن در جمعیت کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال حاد در تبریز می باشد.

**روش بررسی:** در طی یک سال (۸۵-۱۳۸۴)، در کل ۲۱۳ نمونه از تمام کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال حاد مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان تبریز، جمع آوری و آزمایش الایزا جهت بررسی وجود آنتی ژن گروه A روتاویروس انجام شد. سپس نمونه های مثبت در کوتاه ترین زمان ممکن تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه دایره تحقیقات ناشی از غذا منتقل شدند و برای تعیین تایپهای G و P از RT-PCR استفاده شد.

**یافته ها:** از کل ۲۱۳ نمونه جمع آوری شده، ۱۱۳ نمونه از نظر آنتی ژن روتاویروس گروه A مثبت بودند، شیوع عفونت روتاویروس در جمعیت مورد بررسی ۵۴٪ بود. تعیین ژنوتایپ با آزمایش RT-PCR نشان داد که از این تعداد نمونه ۴/۲۱٪ G1، ۳/۱۷٪ G1+G4، ۵/۱٪ G2+G4، ۳/۱٪ G2 و ۳/۱٪ G1+G2+G4 و یک مورد (۱٪) G4+G9. در مورد P تایپ، ۴/۶۸٪ P[8]، ۲/۱۲٪ P[8+4]، ۲/۱۲٪ P[4] و ۲/۶٪ P[6] تعیین شدند.

**نتیجه گیری:** یافته های ما شیوع بالا عفونت با روتاویروس را نشان می دهد بنابراین پیشنهاد می گردد در بررسی علت اسهال در کودکان روتاویروس مورد توجه بیشتری قرار گیرد، همچنین شایعترین ژنوتایپ P[8] G4 می باشد که می تواند راهنمای جهت استفاده از واکسن باشد.

**کلید واژه ها:** اسهال، روتاویروس، ژنوتایپ، تبریز

وصول مقاله: ۸۷/۳/۲۱ اصلاح نهایی: ۸۷/۱۱/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۱

## مقدمه

روتاویروس برای نخستین بار در سال ۱۹۷۳ در سلولهای اپیتلیال دئودونوم یک کودک مبتلا به اسهال توسط میکروسکوپ الکترونی معرفی شده و اکنون به عنوان عامل عمده اسهال کودکان بخصوص نوزادان و همچنین حیواناتی نظیر گاو و خوک در سراسر دنیا شناخته شده است (۱). روتاویروس به طور سالیانه عامل ۱۱۱ میلیون مورد اسهال تک گیر، ۲۵ میلیون مراجعه به پزشک، ۲ میلیون بستری در بیمارستان و ۵۹۲۰۰۰-۳۵۲۰۰۰ مورد مرگ و میر در کودکان زیر ۵ سال در دنیا می شود (۲). میزان شیوع روتاویروس در بنگلادش ۲۴٪ (۳)، در اردن ۳۳٪ (۴)، کویت ۴۰٪ (۵)، ترکیه ۳۷٪ (۶)، هند ۷۱-۵٪ (۷)، ژاپن ۲۴/۴٪ (۸) و در چین ۴۱٪ (۹) گزارش گردیده است.

روتاویروس عضو خانواده رتوویریده (Reoviridea) می باشد، قطر این ویروسها حدود ۶۰ تا ۸۰ نانومتر است. ذرات روتاویروس دارای ۱۳۲ کپسومر بوده و فاقد پوشش هستند. روتاویروسها کپسید سه لایه دارند.

روتاویروس در هفت گروه A-G تقسیم بندی می شود که گروه A باعث ایجاد گاستروانتریت در انسان بخصوص کودکان می شوند. اما سایر روتاویروسها که خصوصیات آنتی ژنی مجزایی دارند نیز باعث شیوع اسهال در کودکان و بالغین می شوند (۱۰).

بررسی های اپیدمیولوژیک مولکولی بر روی روتاویروسها و بر اساس تفاوت در حرکت، یازده قطعه ژنوم RNA دو رشته ای در الکتروفورز، بر روی ژن پلی آکریل آمید را مشخص کرده است. بر اساس این بررسی ها، ناهمگونی زیادی در ژنوم ویروسها دیده می شود، اما از تفاوت های موجود در ژنوم در الکتروفورز

نمی توان برای تعیین سروتیپ استفاده نمود. ژنوم ویروسی پروتئین های ساختمانی VP (Structural viral protein) و پروتئین های غیر ساختمانی NSP (nonstructural protein) را کد می کنند. تاکنون سه گروه عمده آنتی ژن در روتاویروس شناخته شده است که دو گروه عمده آن شامل VP4 و VP7 پروتئین های کپسید خارجی هستند و دارای اپی توپ هایی هستند که در واکنش خنثی سازی ویروس اهمیت زیادی دارند.

روتاویروس بر اساس P (VP4) تایپ و G (VP7) تایپ به ترتیب به ۱۴ و ۲۰ نوع سروتیپ مختلف تقسیم بندی می شود. P یک نوع پروتئین حساس به حرارت (Protease-sensitive protein) است که توسط قطعه ۴ رونویسی می شود و G گلیکوپروتئین (Glycoprotein) که توسط قطعه ۹ رونویسی می شود (۱).

روتاویروس با سروتایپ (ژنوتایپ) G1-G4 و P [8], P [4] از شایعترین ژنوتیپ های گزارش شده در سراسر دنیا می باشد. گزارشهای مختلف G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [8] را مسؤول اصلی ایجاد کننده اسهال در کودکان و شیرخواران می دانند (۱).

با توجه به گزارش شیوع روتاویروس در کودکان و شیرخواران در شهرهای مختلف ایران اطلاعات در مورد ژنوتیپ غالب ایجاد کننده اسهال و همچنین تنوع الگوی ژنوتیپی محدود می باشد. لذا در راستای هدف مهمی چون ایمن سازی کودکان در برابر روتاویروس، این مطالعه به بررسی شیوع و الگوی ژنوتیپی روتاویروس در کودکان مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان کودکان در تبریز پرداخته است.

## روش بررسی

بر اساس مطالعه مقطعی (Cross-sectional) در طی اسفند ۱۳۸۴ تا اسفند ۱۳۸۵ (به روش سرشماری) از تمامی کودکان زیر ۵ سال که با علائم اسهال حاد به مرکز طبی کودکان تبریز مراجعه کرده بودند، نمونه مدفوعی گرفته شد و بر اساس تست الایزا وجود آنتی ژن گروه A روتاویروس بررسی شد (Dakocytomation, Denmark). نمونه‌های مثبت در اولین فرصت در جعبه سرد حاوی یخ (دمای زیر ۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه بیماریهای ناشی از غذا و اسهال‌های مزمن جهت ژنوتایپینگ به تهران منتقل شدند و تا انجام آزمایشات بعدی در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند.

استخراج RNA ویروسی: برای آماده سازی نمونه‌های مدفوعی ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه در ۲۰۰ میکرولیتر بافر سالین فسفات به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند و پس از قرار دادن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، RNA به روش کیت QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen/Westburg, Leusden, the Netherland) استخراج گردید سپس cDNA سازی به روش RT-PCR انجام شد.

برای تایید روتاویروس بودن نمونه از PCR تشخیصی مربوط به ژن VP6 استفاده شد که شامل تکثیر یک قطعه ۳۸۲ جفت بازی مربوط به RNA شماره ۶ می‌باشد.

برای انجام ژنوتایپینگ که شامل P تایپینگ و G تایپینگ است دو مرحله PCR انجام می‌شد. برای مرحله اول G تایپینگ تکثیر ژن VP7 و در مرحله دوم با استفاده از محصول مرحله اول جهت تشخیص نوع تایپ که از روش multiplex-PCR استفاده شد و در مورد P تایپینگ نیز مرحله اول تکثیر VP4 و با استفاده

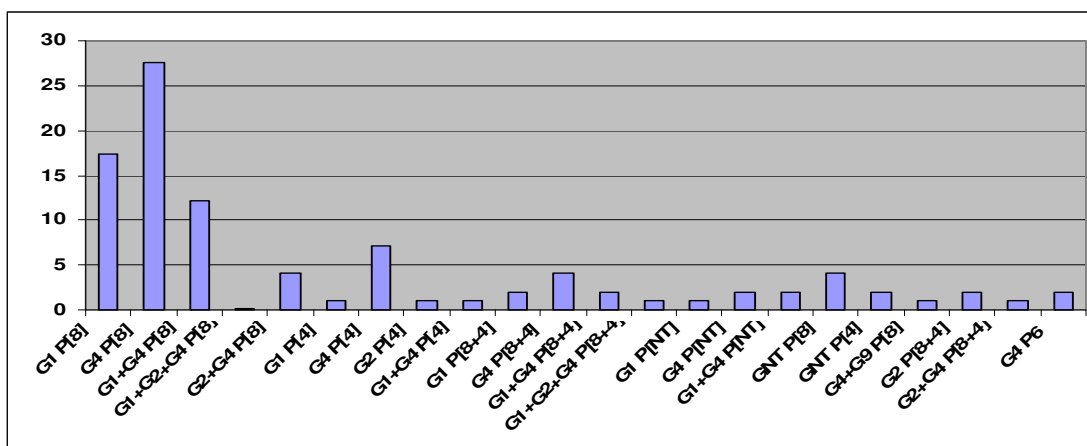
از محصول قسمت اول مرحله تایپ دوم انجام می‌شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است (۲۹-۲۶). برای G تایپینگ، انجام هر واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل  $4/8 \mu\text{l}$  10X buffer II، Taq Polymerase  $1 \mu\text{l}$ ، dNTP  $1 \mu\text{l}$ ،  $MgCl_2$   $2/5$ ، primer VP7-R  $1 \mu\text{l}$  از تمام پرایمرهای استفاده شده در G تایپ یک میکرولیتر به این حجم اضافه می‌گردد،  $Rnase$  free H2O  $31/5 \mu\text{l}$  و سرانجام یک میکرولیتر cDNA بعنوان الگو به حجم نهایی افزوده می‌شود. مراحل PCR شامل  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۴ دقیقه، یک سیکل،  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۱ دقیقه،  $42^{\circ}\text{C}$ ، ۲ دقیقه،  $72^{\circ}\text{C}$ ، ۱ دقیقه شامل ۳۰ سیکل سپس  $72^{\circ}\text{C}$ ، ۷ دقیقه یک سیکل و نهایتاً در  $15^{\circ}\text{C}$  وارد hold می‌شود.

برای P تایپینگ، انجام هر واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر به ترتیب حجم‌های استفاده شده با پرایمرهای مخصوص به خود که در جدول یک بیان شده، همانند مرحله قبل می‌باشد. مراحل PCR شامل  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۴ دقیقه، یک سیکل،  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۱ دقیقه،  $45^{\circ}\text{C}$ ، ۲ دقیقه،  $72^{\circ}\text{C}$ ، ۱ دقیقه شامل ۳۰ سیکل سپس  $72^{\circ}\text{C}$ ، ۷ دقیقه یک سیکل و نهایتاً در  $15^{\circ}\text{C}$  وارد hold می‌شود.

محصول به دست آمده در PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ با رنگ آمیزی اتدیوم بروماید مشاهده شد.

سرانجام نتایج این مطالعه با بکارگیری نرم افزار تحقیقاتی SPSS/PC 13 (SPSS, Chicago, IL) مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. تست chi-square در آزمون آماری برای معنی دار بودن ارتباط بین شیوع روتاویروس در گروه‌های سنی کودکان، مؤنث و مذکر بودن و شیوع فصلی استفاده شد.





نمودار ۲: فراوانی و تنوع ژنوتیپ روتاویروس در کودکان مبتلا به اسهال در تبریز

X = درصد فراوانی ژنوتیپ

Y = تنوع ژنوتیپ

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در G تایپینگ و P تایپینگ در دو مرحله برای سوبه‌های روتاویروس

Primer	Sequence 5-3	Position (nt)	Amplicon	reference
<b>G-typing(a)</b>				
<b>1<sup>st</sup> round</b>				
VP7-F	ATG TAT GTT ATT GAA TAT ACCAC	51-71	881	Iturriza-Go'mara et al.(2002)
VP7-R	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC	914-933	881	
<b>2nd round</b>				
G1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	314-335	618	Gouvea et al.(1990)
G2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411-435	521	Gouvea et al.(1990)
G3	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G	250-269	681	Iturriza-Go'mara et al.(2004)
G4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480-499	452	
G8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	178-198	754	Gouvea et al.(1990)
G9	CTT GAT GTG ACT AY(a) AAT AC	757-776	179	Gouvea et al.(1990)
G10	ATG TCA GAC TAC AR(b)A TAC TGG	666-687	266	Iturriza-Go'mara et al.(2004)
VP6-F	GAC GGV(c) GCR (b)ACT ACA TG GT	747-766	382	
VP6-R	GTC CAA TTC ATN(d) CCT GGT G	1126-1106	382	Iturriza-Go'mara et al.(2004)
<b>P-typing(b)</b>				
<b>1<sup>st</sup> round</b>				
Con3	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	11-32	876	Gentsch et al.,1992
Con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	868-887	876	Gentsch et al.,1992

2 <sup>nd</sup> round					
P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGAGTC	474-494	483	Gentsch et al., 1992	
P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259-278	267	Iturriza-Go'mara et al. (2004)	
P[8]	TCT ACT GGR TTR CAN TGC	339-356	345	Iturriza-Go'mara et al. (2004)	
P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385-402	391	Iturriza-Go'mara et al. (2004)	
P[10]	ATC ATA GTT AGT AGT AGG	575-594	583	Iturriza-Go'mara et al. (2004)	
P[11]	GTA AAC ATC CAG AAT GTG	305-323	312	Iturriza-Go'mara et al. (2004)	

Con-3

b=(R=A or G) d=(Y=C or T)

a=(V=A,C or G)

c=(N=A,T,C or G)

جدول ۲: توزیع سنی کودکان مبتلا به عفونت روتاویروس در بیمارستان کودکان تبریز

مذکر (%)		مؤنث (%)		گروه سنی (ماه)
منفی	مثبت	منفی	مثبت	
۱۵	۸ (۳۴/۸)	۹	۵ (۳۵/۷)	۰-۶
۱۹	۲۵ (۵۶/۸)	۱۸	۱۷ (۴۸/۶)	۷-۱۲
۱۵	۱۸ (۵۴/۵)	۱۲	۱۲ (۴/۵)	۱۳-۱۸
۲	۱۰ (۸۳/۳)	۴	۴ (۵۰)	۱۹-۲۴
۱	۳ (۷۵)	۱	۱ (۵۰)	۲۵-۳۰
۰	۲ (۱۰۰)	۰	۱ (۱۰۰)	۳۱-۳۶
۱	۵ (۸۳/۳)	۳	۲ (۴۰)	+۳۶

## بحث

می‌دهد. این رقم در کشور پیشرفته‌ای چون آمریکا از ۱۹۷۳ تا ۱۹۸۳ بطور سالیانه ۵۰۴ مورد در کودکان یک ماهه تا چهار ساله اتفاق افتاده بود که نمایانگر اهمیت این ویروس می‌باشد (۱۲).

در مطالعات مشابه انجام شده میزان شیوع ۱۱/۴٪ در شیراز (۱۳)، ۱۵/۳٪ در تهران (۱۴)، ۳۰٪ در زاهدان (۱۵)، ۳۱/۵٪ در زنجان (۱۶) و ۷۸٪ در شهرکرد نشان می‌دهد (۱۷). در این مطالعه حدود ۵۴٪ از موارد اسهال

روتاویروس با اختصاص دادن ۳۰-۵۰٪ سهم گاستروانتریت در سراسر دنیا به خود یکی از مهمترین عوامل ایجاد اسهال حاد در کودکان و شیرخواران می‌باشد (۱۱). سالانه ۱۰/۶ میلیون مرگ در کودکان زیر ۵ سال بدلیل اسهال اتفاق می‌افتد که یک مورد از هر ۶ مورد عامل آن روتاویروس می‌باشد، ۱۸٪ آن یعنی بیش از دو میلیون مورد در کشورهای در حال توسعه رخ

بستن تدابیر ویژه و مراقبت‌های بیشتر جهت کنترل و جلوگیری از ابتلا کودکان به روتاویروس مؤثر واقع شود. با توجه به شیوع بالای روتاویروس، مشخص شدن ژنوتیپ غالب می‌تواند در جهت ایمن سازی کودکان کمک کننده باشد. بررسی‌های انجام شده ژنوتیپ G1-G4 را مسؤل ایجاد عفونت روتاویروس می‌دانند و تاکنون [8]G1P را تایپ غالب در دنیا معرفی کرده‌اند (۱). در دو مطالعه قبلی انجام شده در شهر کرد و تهران ژنوتیپ [8]G1P نوع غالب ایجاد کننده اسهال بودند در بررسی ما [8]G4P (۶/۲۷٪) ژنوتیپ غالب بود و در رتبه بعدی [8]G1P (۳/۱۷٪) قرار داشت. در ژنوتیپ روتاویروس‌های جدا شده در تبریز علاوه بر ژنوتیپ‌های غالب مشابه با سایر گزارش‌های دنیا، ژنوتیپ‌های مخلوط (Mixed-type) هم مشاهده شد که [8]G1+G4P (۲/۱۲٪) بیشترین نوع آن بود تایپ‌های [8]G1+G2+G4P (۲٪) و [8]G1+G2+G4 P (۱٪) نیز جداسازی شد. در عراق نوع (38%)G1(۲۳)، در ژاپن به یک نسبت G1-G4 (۲۴) که (۴۰-۳۰٪) را شامل می‌شود، در اسپانیا (۶۱٪)، سوئد (۵۷/۱٪)، بلژیک (۲۸/۴٪) نیز G1 تایپ غالب بود (۲۲). در چین سروتیپ G3 (۹) و در هند G2 و G9 سروتیپ غالب می‌باشد (۲۵). سروتیپ (ژنوتیپ) نمونه‌های روتاویروس کودکان در تبریز و سایر مطالعات قبلی انجام شده در ایران با سروتیپ‌های شایع در دنیا مطابقت دارد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که روتاویروس به عنوان عامل بیماری‌زا در اسهال کودکان بخصوص اطفال زیر یک سال بیشتر مورد توجه قرار گیرد و از مصرف نابجای آنتی‌بیوتیک اجتناب شود. همچنین مشخص شدن ژنوتیپ غالب باعث فراهم نمودن بستر مناسب جهت

مربوط به روتاویروس بود. با توجه به اهمیت روتاویروس به عنوان ایجاد کننده اسهال در کودکان، تعداد بررسی‌های انجام شده در ایران محدود می‌باشد.

یافته‌های ما نشان دهنده شیوع بیش از ۸۰٪ روتاویروس در گروه سنی زیر دو سال با بیشترین نسبت در شیر خواران ۱۲-۷ ماهه بوده است، نتایج ما با گزارش WHO و کره مشابه بوده است (۱۹،۲۰). در کشورهای توسعه یافته ۸۰-۷۰٪ موارد عفونت روتاویروس در سنین قبل از ۲۴ ماه رخ می‌دهد (۱۸-۱۶)، با توجه به یافته‌ها، کودکان در شش ماهگی تا دو سالگی از مهمترین جمعیت‌های در معرض خطر عفونت با روتاویروس می‌باشند و تشخیص روتاویروس در نمونه‌های اسهال دارای اهمیت می‌باشد.

در تعداد محدودی از بررسی‌های گذشته در ایران الگوی فصلی بروز عفونت روتاویروس در ماههای سرد سال (اواخر زمستان و اوایل بهار) مشخص شده است (۱۴-۲۱). در مطالعه حاضر بیشترین موارد اسهال روتاویروس در فصل زمستان و بهار رخ داده بود، این نتایج مشابه سایر مناطقی که چون ایران آب و هوای معتدل دارند، می‌باشد. در آب و هوای معتدل بیشترین موارد اسهال روتاویروس در فصول سرد و معتدل سال گزارش شده است (۱۱). در ترکیه بعنوان یک کشور همسایه با آب و هوای سردتر از ایران دی-آذر زمان بیشترین بروز روتاویروس و در کویت بعنوان یک کشور همسایه با آب و هوای گرمتر از ایران، اردیبهشت-فروردین مشخص شده است. این زمان در کشورهای اروپایی در اوایل بهار مشخص شده است (۲۲). بعلاوه محدودیت اطلاعات نمی‌توان نقشه زمانی بروز عفونت روتاویروس را در نقاط جغرافیایی ایران تعیین کرد این امر می‌تواند فصل مناسب ایمن سازی کودکان و بکار

ایمن سازی کودکان علیه روتاویروس در شهر تبریز می‌شود.

### نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که شیوع روتاویروس در شمال ایران بالا می‌باشد که این نتیجه منطبق با سایر بررسی‌های انجام شده قبلی در ایران، تایید بر بالا بودن شیوع روتاویروس در کودکان دارند. با توجه به پر جمعیت بودن ایران و محدودیت گزارشات در مورد شیوع روتاویروس، می‌توان گفت علاوه بر رعایت بهداشت، مهمترین راه کاهش شیوع عفونت با این ویروس تهیه واکسن مناسب و استفاده آن می‌باشد بنابراین برای تعیین ژنوتیپ غالب در کودکان ایران

احتیاج به یک برنامه‌ریزی هماهنگ جهت نمونه‌گیری (برای میزان شیوع) و تعیین ژنوتایپ‌های شایع و تنوع ژنتیکی آن در کشور بخصوص استان‌های همسایه با عراق، افغانستان و پاکستان برای مشخص کردن نوع واکسن مورد نیاز کودکان می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

از همکاران ارجمند در بیمارستان کودکان تبریز که با جمع آوری و ارسال نمونه در این تحقیق مساعدت و همکاری نمودند سپاسگزاری می‌نمایم. از پرسنل محترم مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه پزشکی شهید بهشتی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند قدردانی می‌شود.

### Referenes

1. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR and Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis*, 1998; 4: 561-70.
2. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children, *Emerg Infect Dis*, 2003; 9: 565-72.
3. Rahman M, Sultana R, Ahmed G, Nahar S, Hassan ZM, Saiada F, Podder G, Faruque Abu SG. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13:18-24.
4. Youssef M, Shurman A, Bougnous ME, Rawashdeh M, Bretagene S, Strockbine N. Bacterial, Viral and parasitic enteric pathogens associated with Acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 28: 257-63.
5. Sethi SK, AL-Nakib W, Khuffash FA, Majeed HA. Acute diarrhea and rotavirus infection in young children in Kuwait. *Ann Trop Paediatr*, 1984; 4: 117-121.
6. Karadag A, Acikgoz ZC, Avi Z, Catal F, Gocer S, Gamderzade S. Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: epidermiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus negative cases. *Scand J Infect Dis*, 37: 269-75.
7. Broor S, Dhruaba G and Mathur P. Molecular epidemiology of rotaviruses in India, Review Article, *Indian J Med Res*, 118: 59-67.
8. Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol*; 2006; 151: 183-192.
9. Zhao-YF, Bei W, Paul E.K, Joseph SB, Li JZ, Li WS, Zeng QD, Jing YT, An CH, Hui S, Xiao BS, Batmunkh N, Erik Hn, Zhi YX, Roger I. Sentinel Hospital Surveillance for Rotavirus Diarrhea in the People's Republic of China, *J Infect Dis*, 2005; 192: S94-9.
10. Brooks GF. Jawetz, Melnick and Adelberg's *Medical Microbiology* 22 nd ed. 2001: 493-499.
11. Bern C, Martines J, De ZI, The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: A ten-year update. *Bull WHO*. 1992; 70: 705-714.
12. Bryce J, Bosch-pinto C, Shibuya K. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365: 1147-1152.
13. Hassanzadeh P, Al-e-Yasin F. The prevalence of bacterial and viral agents in fecal specimens of children in Shiraz *JOURNAL OF KERMAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES* 1379; 18: 16-11

14. Zarnani AH, Modarres SH, Jadali F, Sabahi F, Moazzeni SM, Vazirian F. Role of rotavirus in children with acute diarrhea in Tehran, Iran. *J Clin Microbiol.* 2004; 29: 189-193.
15. Saeb M, Morady A, Mokhtariazad T, Sajedianfard J. Determination of electrophoretype of Rotaviruses causative agents of diarrhea in children under two years old referred to Tehran and Zahedan hospitals. *JOURNAL OF KERMAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES* 1376; 3: 106-101
16. Kazemi A, Zomorrodi-Sofiani A, Esmaeil Zadeh A, Shykhi A, Movsavinassab N. The comparison of clinical and laboratory findings in gastroenteritis of rotavirus and others etiology in 2 months to 5 years old admitted patients, Zanjan 1383. *JOURNAL OF ZANJAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES & HEALTH SERVICES* 1385; 57: 32-38
17. Khalili BC, Uevas LE, Reisi N, Dove W, Cunliffe NA, Hart CA. *J Med Virol.* 2004; 73: 309-312.
18. Jacobson RM. The current status of the rotavirus vaccine. 1999; 17: 1690-9 18.
19. World Health Organization. Research priorities for diarrhoeal disease among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull World Health Organ* 1985; 63: 569-83.
20. Jung SK, Jung OK, Soo CCH, Young TJ, et al. Epidemiology profile of rotavirus infection in the republic of Korea :results from prospective surveillance in the Jeongeub District, 1 July 2002 through 30 June 2004. *J Infect Dis.*2005; 192: S49-56.
21. Samarbafzadeh A, Mazaheri Tehrani E, Makvandi M, Taremi M. Epidemiology Aspects of Rotavirus Infection in Ahwaz, Iran. *J Health Popul Nutr.* 2005; 23: 245-249.
22. Damme PV, Giaquinto C, Maxwell M, Todd P, Wielen MVD. Distribution of rotavirus genotype in Europe, 2004-2005: the reveal study. *J Infect Dis.* 2007; 195: S17-25.
23. Ahmed HM, Brian J, Coulter S, Nakagomi O, Hart CA, Zaki JM, AL-Rabaty AA, Dove W, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdistan .*Emerge Infect Dis.*2006; 12: 824-826.
24. Ushijima H. Rotavirus Infection in Asia. *Pediatrics International*; 2000; 42; 392-394.
25. Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR. Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3524-9.
26. Iturriza-Gomara M, Wong C, Blome S, Deseleberger U, Gary J. Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *J Virol*, 2002; 76: 6596-6601.
27. Iturriza-Gomara M, kang G, Gary J. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin virol*, 2004; 31: 259-265.
28. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 1365-1373.
29. Gouvea V, Glass RL, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid stool specimens: *J Clin Microbiol*, 1990; 28: 276-282.