

مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی

دوره ۱۰ شماره ۱ بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۶۶ - ۵۳

فراوانی نسبی و تعیین سروتایپ انتروویروس های غیر پولیوی جدا شده از بیماران فلج شل حاد ایران در سال های ۲۰۰۰-۱۹۹۵

شهره شاه محمودی: استادیار، آزمایشگاه فلج اطفال ایران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران - نویسنده رابط:

shahmahmoodi@tums.ac.ir

سید محسن زهرایی: استادیار، مرکز مدیریت بیماریها، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

محمد مهدی گویا: استاد، مرکز مدیریت بیماریها، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

طه موسوی: مرکز مدیریت بیماریها، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

سید مسعود حسینی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مرجان استوار اسفندآبادی: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

محمود محمودی: استاد، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

حمیده طباطبایی: محقق، آزمایشگاه فلج اطفال ایران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

سیده مریم یوسفی: محقق، آزمایشگاه فلج اطفال ایران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

یعقوب ملایی کندلوسی: کارشناس، آزمایشگاه فلج اطفال ایران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

سحر عباسی: کاردار، آزمایشگاه فلج اطفال ایران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

رخشنده ناطق: استاد، آزمایشگاه فلج اطفال ایران، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: آزمایشگاه فلج اطفال ایران به عنوان یک آزمایشگاه کشوری و عضوی از مجموعه آزمایشگاه های پولیوی سازمان جهانی بهداشت دریافت کننده نمونه بیماران مبتلا به فلج شل حاد از سراسر ایران است تا ویروس پولیو را در این نمونه ها شناسایی نماید. علاوه بر ویروس پولیو، این آزمایشگاه انتروویروس های غیر پولیوی (NPEVs) را نیز در این نمونه ها شناسایی می کند. از آنجا که NPEVs در سالهای اخیر به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده فلج شل حاد پس از ویروس وحشی پولیو در نظر گرفته شده اند، در این مطالعه فراوانی سروتایپ های مختلف NPEVs که در سالهای پیش از ریشه کنی ویروس پولیوی وحشی (۲۰۰۰-۱۹۹۵) در ایران از بیماران فلج شل حاد جدا شده اند مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: نمونه های مدفوع بیماران فلج شل حاد طبق دستورالعمل استاندارد سازمان بهداشت جهانی جمع آوری شده و مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: در طی سال های ۲۰۰۰-۱۹۹۵، ۲۱۸۰ نمونه مدفوع از بیماران مبتلا به فلج شل حاد دریافت شد. کوساکی ویروس B و اکو ویروس های ۶، ۱۱، ۷ و ۱۳ بیشترین فراوانی را در بیماران فلج شل حاد داشتند و به ترتیب ۲۳/۷ درصد، ۱۴/۴ درصد، ۱۲/۷ درصد، ۱۱ درصد و ۱۰/۲ درصد، انتروویروس های جدا شده از این بیماران را تشکیل دادند. چهار مورد اکوویروس ۲۰ در این بیماران شناسایی شد که در دو مورد آن بیمار فوت کرده و یک مورد دچار فلج دائمی شده است. تاکنون موارد مرگ و میر و فلج باقیمانده (باقیمانده فلج پس از ۶۰ روز) از اکوویروس ۲۰ گزارش نشده است.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه حدود ۱۰ سال است که ویروس وحشی پولیو در کشور ما ریشه کن شده ولی تعداد موارد فلج شل حاد نه تنها کم نشده بلکه افزایش نیز یافته است، بهتر است مطالعاتی جهت بررسی فراوانی و تعیین سروتایپ NPEVs در سال های پس از ریشه کنی ویروس وحشی پولیو (۲۰۰۰ به بعد) نیز در کشور ما انجام شود و ارتباط سروتایپ های شناسایی شده و فلج باقیمانده تعیین گردد.

واژگان کلیدی: انتروویروس غیر پولیوی، فلج شل حاد، ایران

مقدمه

با وجودیکه ویروس پولیوی وحشی در بسیاری از کشورها (از جمله ایران) ریشه کن شده است، ولی سالیانه در دنیا موارد قابل ملاحظه‌ای از فلج شل حاد *Acute Flaccid Paralysis (AFP)* گزارش می‌شود که مربوط به پولیوی ویروس وحشی نبوده و در تعداد قابل ملاحظه‌ای از آنها فلج باقیمانده وجود دارد یعنی ۶۰ روز پس از ظهور بیماری هنوز حالت فلج در بعضی از اندام‌ها باقیمانده است. در قاره امریکا به رغم اینکه فلج اطفال ایجاد شده توسط پولیوی ویروس وحشی ریشه کن شده اما هنوز موارد زیاد *AFP* یافت می‌شوند که علت آن شناسایی نشده است. در افغانستان که جزو کشورهای اندمیک می‌باشد در سال ۲۰۱۰ از ۱۵۷۲ مورد فلج شل حاد، ۲۵ مورد یعنی فقط ۱/۶٪ مربوط به پولیوی ویروس وحشی بوده است و بقیه علل غیرپولیوی و ناشناخته داشته اند. در کشور ما ایران از سال ۲۰۰۱ هیچ موردی از پولیوی ویروس وحشی جدا نشده اما هنوز هر ساله صدها مورد فلج رخ می‌دهد. تعداد این موارد نسبت به سالهای قبل از ریشه کنی نه تنها کم نشده بلکه حتی افزایش پیشرونده داشته است به طوری که تعداد موارد *AFP* در ایران از ۳۱۰ مورد در سال ۲۰۰۰ به ۶۲۲ مورد در سال ۲۰۱۰ رسیده است. ناشناخته بودن علت فلج در اکثر موارد *AFP* محققان را بر آن داشته است که در پی یافتن سایر عوامل ایجاد کننده فلج شل حاد باشند (Kessler et al. 1997; Patti et al. 2001; Singh et al. 2002; Bahri et al. 2004; Tsao et al. 2006; Saeed et al. 2007; Dhole et al. 2009).
AFP توسط علل مختلفی ایجاد می‌شود و عوامل ویروسی در این میان نقش مهمی دارند. در گزارشهایی که حاکی از حضور عوامل ویروسی در موارد فلج شل حاد است، ویروسهایی مانند ویروس نیل غربی، ویروس اپشتین

بار و از همه مهمتر انتروویروس‌های غیرپولیوی *NPEVs* بیشتر ذکر شده‌اند (Solomon and Willison 2003).
 انتروویروس‌ها جنسی از خانواده پیکورنا ویریده می‌باشند و سروتایپ‌های مختلف این ویروس‌ها در بیماری‌های مختلفی از جمله مننژیت آسپتیک، بیماری پا و دهان، عفونت‌های چشمی و تنفسی و نیز فلج شل حاد یافت شده‌اند. امروزه تمایل به شناسایی، تعیین سروتایپ و بررسی سویه‌های اپیدمیک جدید انتروویروس‌های غیر پولیوی افزایش یافته و نشان داده شده که علاوه بر ویروس وحشی پولیوی، ممکن است سروتایپ‌های مختلف انتروویروس‌های غیرپولیوی نیز در ابتلا به فلج شل حاد موثر باشند (Silva et al. 1996; Chaves et al. 2001; Deshpande et al. 2003; Dhole et al. 2009).

باتوجه به اهمیت فزاینده انتروویروس‌های غیرپولیوی و نقش احتمالی آنها در ایجاد فلج شل حاد، در این مطالعه فراوانی سروتایپ‌های مختلف *NPEVs* که از نمونه‌های بیماران مبتلا به فلج شل حاد در سال‌های پیش از ریشه کنی ویروس پولیوی وحشی (۱۹۹۵-۲۰۰۰) در ایران جدا شده‌اند مورد بررسی قرار گرفت تا در مورد سروتایپ‌هایی که در سال‌های پیش از ریشه کنی به همراه ویروس پولیوی در کشور ما گردش داشته‌اند اطلاعاتی بدست آید. نتایج این تحقیق و مطالعات مشابه می‌تواند در درک علل غیر پولیوی فلج شل حاد موثر بوده و دیدگاهی کلی درباره سروتایپ‌های مختلف *NPEVs* در گردش کشور ما ایجاد نماید. همچنین اطلاعات حاصل از این تحقیق و مطالعات مشابه در نهایت می‌تواند نقشی تعیین کننده در سیاست گذاریهای آتی واکسیناسیون در کشور ما ایفا نماید.

روش کار

از سال ۱۹۹۵ که آزمایشگاه فلج اطفال واقع در بخش ویروس‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت به

نمونه‌های مدفوع پس از تلقیح به رده‌های سلولی مورد بررسی روزانه با میکروسکوپ معکوس قرار می‌گیرند. در صورتی که علائمی از مرگ سلولی Cytopathic Effect (CPE) مشاهده گردد تستهای تاییدی برای حضور ویروس پولیو انجام می‌شود.

در طول سال‌های کار آزمایشگاه فلج اطفال، نمونه‌هایی که کشت سلولی RD و یا Hep2 آنها مثبت ولی تست‌های تاییدی پولیوی آنها منفی بوده است بعنوان انتروویروس غیرپولیوی در فریزر آرشیو آزمایشگاه نگهداری شده‌اند.

در این مطالعه برای تعیین سروتایپ انتروویروس‌های غیرپولیوی سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۰ ابتدا کشت قدیمی ویروس‌هایی که در فریزر آرشیو آزمایشگاه نگهداری می‌شدند به سلول جدید تلقیح گردیدند تا حضور ویروس تایید شود و تیتراژ آن افزایش یابد. سپس به روش میکرونوترالیزاسیون با استفاده از آنتی بادیهای pooled که توسط WHO در اختیار آزمایشگاه‌های پولیو قرار می‌گیرد سروتایپ ویروس‌ها تعیین گردید (Polio Lab Manual). برای نمونه‌هایی که با این روش تعیین سروتایپ نشدند RT-PCR با استفاده از پرایمرهای منطقه VP1 ژنوم انجام گرفت (Oberste et al. 2006). سپس توالی نوکلئوتیدی محصول PCR تعیین گردید و با استفاده از سایت BLAST سروتایپ ویروس تعیین شد. طبق توافق مرکز تاکسونومی و طبقه بندی ویروس‌ها توالیهای که مساوی یا بیش از ۷۵ درصد شباهت با یکی از سروتایپ‌های انتروویروس نشان دادند، آن سروتایپ در نظر گرفته شدند. در مرحله آخر آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 انجام گرفت.

نتایج

از سال ۱۹۹۵ تا پایان سال ۲۰۰۰ میلادی جمعاً از ۲۱۸۰ بیمار دارای فلج شل حاد نمونه مدفوع به آزمایشگاه کشوری فلج اطفال ارسال شده است. از این تعداد ۱۸۴ نمونه

شبکه آزمایشگاه‌های پولیوی سازمان بهداشت جهانی (WHO) پیوست و با استانداردهای آن شروع به کار کرد، نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به فلج شل حاد از سراسر ایران به این آزمایشگاه ارسال شده است تا نمونه‌های بیماران از نظر حضور ویروس پولیو مورد بررسی قرار گیرند. تمامی شرایط نمونه‌گیری، ارسال و دریافت نمونه‌ها، و تست‌های آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی است. بطور خلاصه دو نمونه مدفوع از هر بیمار مبتلا به فلج شل حاد در فاصله حداکثر ۱۴ روز پس از بروز فلج از بیمار گرفته شده و تحت شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه پولیو ارسال می‌شود. در آزمایشگاه از نمونه‌های مدفوع شیرابه تهیه شده و به کشت سلولی تلقیح می‌شود. کشت سلولی روش استاندارد طلایی برای شناسایی ویروس پولیو است. در آزمایشگاه پولیو در حال حاضر از دو رده سلولی RD (Rhabdomyosarcoma) و L20B (سلول اپی تلیال موش که با استفاده از مهندسی ژنتیک رسپتور ویروس پولیو بر روی آن سوار شده است) برای شناسایی ویروس پولیو استفاده می‌شود. سلول RD بسیاری از سروتایپ‌های انتروویروس‌ها را شناسایی می‌کند ولی سلول L20B اختصاصی پولیوویروس است، اگرچه اخیراً گزارش‌هایی از رشد ویروس Coxsackie A در سلول‌های L20B در مقالات منتشر شده است (Nadkarni and Deshpande 2003). در فاصله سالهای ۱۹۹۵ تا اواخر ۱۹۹۸ به جای رده سلولی L20B از سلول‌های Hep2 (سلول اپی تلیال سرطان حنجره انسان) استفاده می‌شد ولی به دلیل این که حساسیت این سلول‌ها برای ویروس پولیو از حساسیت L20B کمتر است استفاده از Hep2 از سال ۱۹۹۹ کنار گذاشته شد. تنها مزیت Hep2 بر L20B توانایی جداسازی دسته دیگری از انتروویروس‌های غیرپولیوی یعنی کوکساکسی ویروس‌های B بوسیله سلول Hep2 است.

سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۵ را نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌شود کوکساکسی ویروس B و اکو ویروس‌های ۶، ۱۱، ۷ و ۱۳ بیشترین فراوانی را در بیماران فلج شل حاد داشته و به ترتیب ۲۳/۷ درصد، ۱۴/۴ درصد، ۱۲/۷ درصد، ۱۱ درصد و ۱۰/۲ درصد، اترروویروس‌های جدا شده از این بیماران را تشکیل داده‌اند.

جدول ۳ فراوانی تایپ‌های مختلف اترروویروس‌های غیرپولیوی در نمونه‌های بیماران فلج شل حاد سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۵ را بر حسب سال نشان می‌دهد. اطلاعات نشان می‌دهد که کوکساکسی ویروس B که یکی از فراوانترین سرو تایپ‌ها بوده در سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۸ از بیماران جدا شده و پس از آن جداسازی آن متوقف شده است.

همچنین در سال ۱۹۹۶ اکو ویروس ۶ بیشترین فراوانی را در بین سایر سرو تایپ‌ها داشته است به طوری که از ۱۷ مورد شناسایی شده آن ۱۰ مورد در سال ۱۹۹۶ بوده‌اند ولی گردش آن در سال‌های بعد تقریباً متوقف شده است.

۶۵/۳ درصد از اترروویروس‌های شناسایی شده از بیماران گروه سنی ۵-۱ سال جدا شدند و کوکساکسی B و اترروویروس‌های ۶ و ۱۱ به ترتیب ۲۸/۶ درصد، ۱۵/۶ درصد و ۱۴/۳ درصد از اترروویروس‌های غیرپولیوی یافت شده در این گروه سنی را تشکیل می‌دادند.

نکته جالب توجه این بود که چهار مورد اکو ویروس ۲۰ در بیماران شناسایی شد که در دو مورد آن بیمار فوت کرده و یک مورد دچار فلج دائمی شده بود. در سوابق این بیماران علت دیگری برای مرگ به دست نیامد.

بحث

فلج شل حاد عبارت است از ضعف ناگهانی اندام‌های انتهایی که در کمتر از یک هفته به اوج خود می‌رسد و ممکن است با تب همراه باشد. این بیماری توسط عوامل مختلفی ایجاد می‌شود که مهم‌ترین آن ویروس پولیوی وحشی است. بیشتر موارد فلج پولیوی فرد را به معلولیت

از نظر کشت سلولی مثبت بودند که در فریزر آرشیو آزمایشگاه نگهداری می‌شدند. پس از تلقیح مجدد این نمونه‌ها به کشت سلولی جدید ۱۱۸ نمونه مجدداً مثبت شدند و سرو تایپ ویروس در مورد آنان تعیین گردید.

در نمودار ۱ فراوانی مطلق و نسبی نتایج کشت سلولی کل نمونه‌های آزمون شده از سال ۱۹۹۵ الی ۲۰۰۰ آمده است. از ۸۷ درصد از کل نمونه‌های AFP در کشت سلولی اترروویروسی جدا نشده است و در ۸/۴ درصد از نمونه‌ها اترروویروس غیر پولیوی مثبت بوده است. فراوانی نسبی ویروس پولیوی وحشی (NSL) Non Sabin Like ۱/۶ درصد و ویروس پولیوی واکسن (SL) Sabin Like ۲/۹ درصد بوده است و یک مورد نیز ویروس پولیوی مشتق از واکسن (Vaccine Derived Polio Virus (VDPV) یعنی ویروس واکسن موتاسیون یافته که قابلیت حمله به سیستم عصبی را دوباره بدست آورده است از یک بیمار مبتلا به فلج شل حاد جدا شده است.

نمودار ۲ گروه بندی سنی بیماران مبتلا به فلج شل حاد را نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌شود گروه سنی ۵-۱ سال بیشترین تعداد را به خود اختصاص داده‌اند.

نمودار ۳ فراوانی مطلق و نسبی نمونه‌های بیماران فلج شل حاد سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۵ ایران را بر حسب استان نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌شود استان‌های تهران، خراسان و اصفهان بیشترین فراوانی را از نظر نمونه‌های بیماران فلج شل حاد به خود اختصاص داده‌اند.

جدول ۱ فراوانی مطلق و نسبی نمونه‌های بیماران فلج شل حاد سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۵ ایران را بر حسب سال نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌شود بیشترین موارد AFP گزارش شده در سال ۱۹۹۶ بوده در حالی که بیشترین موارد جداسازی NPEVs در سال ۱۹۹۵ بوده است.

جدول ۲ فراوانی تایپ‌های مختلف اترروویروس‌های غیرپولیوی در نمونه‌های بیماران فلج شل حاد ایران در

داشته است که در پی یافتن سایر عوامل ایجاد کننده فلج شل حاد باشند. در طی سال‌های اخیر نقش انترو ویروس‌های غیرپولیوی در ایجاد AFP بارزتر گردیده و در مناطق مختلف جهان تحقیقات گسترده‌ای بر روی انترو ویروس‌های غیرپولیوی بعنوان عامل ایجاد کننده فلج شل حاد در حال انجام است.

در سال‌های اخیر در کشور ما هر ساله حدود ۶۰۰ مورد فلج شل حاد رخ می‌دهد که نسبت به سال‌های قبل از ریشه‌کنی پولیوی وحشی نه تنها تفاوتی نکرده بلکه مانند سایر نقاط دنیا افزایشی پیشرونده نیز داشته است. هر ساله از تعداد کل موارد AFP حدود ۳۰ درصد دارای فلج باقیمانده می‌باشند یعنی فلج بیمار پس از دو ماه بهبود نمی‌یابد و فرد معلولیت مادام‌العمر پیدا می‌کند. با توجه به عدم جداسازی ویروس پولیوی وحشی از این بیماران جستجوی علت فلج بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به روند افزایشی موارد AFP غیرپولیوی در کشورمان، در این مطالعه بر آن شدیم تا تایپ انترو ویروس‌های غیرپولیوی شناسایی شده در نمونه مدفوع بیماران مبتلا به فلج شل حاد را معین نماییم. بررسی حاضر بر روی ویروس‌هایی که در نمونه‌های بیماران مبتلا به فلج شل حاد سال‌های پیش از ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی (۱۹۹۵-۲۰۰۰) یافت شده بودند انجام گرفت تا روند گردش همزمان انترو ویروس‌های غیرپولیوی با ویروس وحشی، که فراوانی آن در آن سال‌ها رو به کاهش بود، معین گردد. هدف این مطالعه این بود که نمایی کلی درباره انترو ویروس‌های غیرپولیوی در گردش در کشورمان در فاصله زمانی سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۰ (۵ سال آخر ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی در کشور ما) بدست آید که برای تحقیقات آینده و طراحی واکسن‌های انترو ویروسی مناسب برای کشورمان مفید خواهد بود.

در تحقیق حاضر در شروع کار تمامی نمونه‌های NPEV مثبتی که مربوط به سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۰ بودند و در فریزر نگهداری می‌شدند (۱۸۴ نمونه) برای اطمینان از

دایمی مبتلا می‌کند. از این رو در سال ۱۹۸۸ سازمان بهداشت جهانی ریشه‌کنی پولیو ویروس وحشی تا سال ۲۰۰۰ را در دستور کار خود قرار داد. برنامه‌های واکسیناسیون همگانی در تمامی کشورهای جهان و پایش موارد فلج شل حاد چنان موفقیت آمیز بودند که تعداد موارد پولیومیلیت از ۳۵۰۰۰۰ مورد در سال ۱۹۸۸ به ۱۳۴۹ مورد در سال ۲۰۱۰ رسید. اکنون در نیمه سال ۲۰۱۱، تعداد کشورهایی که ویروس پولیوی وحشی اندمیک در آنها گردش دارد به ۴ کشور افغانستان، پاکستان، نیجریه و هندوستان محدود شده است. سه منطقه آمریکا، پاسیفیک غربی و اروپا به ترتیب در سال‌های ۱۹۹۶، ۲۰۰۰ و ۲۰۰۲ ریشه‌کنی پولیوی وحشی را در منطقه خود اعلام کردند و ویروس پولیوی ۲ وحشی در سال ۱۹۹۹ در کل جهان ریشه کن شده است.

در ایران نیز فعالیت برای ریشه‌کنی فلج اطفال از سال ۱۹۹۴ شروع شده و نتایج درخشانی داشته است به طوری که از سال ۲۰۰۱ میلادی تا به امروز با وجودیکه کشورهای همسایه شرقی ما همچنان آلوده می‌باشند و ویروس پولیوی وحشی در آنها گردش دارد، ویروس پولیوی وحشی در ایران ریشه‌کن شده است.

نکته قابل توجه این است که با وجود کاهش قابل ملاحظه فلج ناشی از پولیو ویروس وحشی، تعداد موارد AFP نه تنها کاهش نیافته بلکه افزایش پیدا کرده است. به عبارت دیگر در تمامی مناطق جهان، ریشه‌کن شدن پولیو ویروس وحشی موجب کاهش کلی موارد AFP نشده است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی تعداد موارد AFP در سال ۱۹۹۸ حدود ۲۵ هزار مورد بوده که این تعداد در سال ۲۰۱۰ به حدود ۱۰۰ هزار مورد رسیده است. افزایش تعداد موارد AFP را از طرفی می‌توان به بهبود وضعیت پایش موارد فلج شل حاد و از طرف دیگر به علتی (فعلاً ناشناخته) به جز پولیو ویروس وحشی نسبت داد. ناشناخته بودن علت فلج این موارد AFP محققان را بر آن

ها موثرند. یکی از مهمترین عوامل در ابتلا به عفونتهای انتروویروسی سن است. حساسیت گروه های مختلف سنی به عفونت انتروویروسی و نیز علائم بالینی، شدت بیماری و پیش آگهی عفونت متفاوت می باشد. طبق مطالعات اپیدمیولوژیک، بیشتر عفونت های انتروویروسی در دوران کودکی رخ می دهد. این امر ممکن است به علت شرایط نامناسب بهداشتی، عدم بلوغ کامل سیستم ایمنی و همچنین ضعف جسمی بعلاوه شرایط بد اقتصادی باشد که باعث می شود تکثیر ویروس در بدن براحتی انجام گرفته و انتشار ویروس انجام گیرد. در سنین بالاتر بعلاوه در معرض قرار گرفتن مداوم افراد با این ویروس ها مصونیت کسب شده و ابتلا به بیماری بسیار کم اتفاق می افتد به همین دلیل کودکان کم سن و سال (معمولاً ۵-۱ سال) را بعنوان انتقال دهندگان اصلی عفونت در خانواده ها در نظر می گیرند (Pallansch and and Roos 2007).

روش آزمایشگاهی معمول برای جداسازی انتروویروس ها کشت سلولی است و معمولاً از سلول هایی مانند RD و Hep2 برای جداسازی این ویروس ها استفاده می شود. هر کدام از این رده های سلولی سروتایپ های خاصی از NPEVs را شناسایی می کنند از این رو استفاده همزمان این دو رده سلولی در آزمایشگاه امکان جداسازی تایپهای بیشتری از انتروویروس های غیرپولیوی را میسر می سازد. در تحقیق حاضر مشاهده شد در سالهای قبل از ۱۹۹۸ که آزمایشگاه فلج اطفال از سلول Hep2 و RD بطور همزمان استفاده می کرده است تعداد قابل توجهی کوکساکسی B از بیماران جدا شده است ولی با توقف استفاده از این رده سلولی تعداد انتروویروس های جدا شده افت قابل ملاحظه ای داشته است (جدول ۳). از آنجا که این سروتایپ یکی از فراوانترین سروتایپ ها در بین تایپ های یافت شده NPEV در سال های قبل از ۱۹۹۸ بوده است به نظر می رسد در صورتی که آزمایشگاهی بخواهد به اطلاعات حقیقی تری از فراوانی انتروویروس های غیرپولیوی دست یابد، باید حتماً

حضور ویروس و بالا بردن تیر آن دوباره به سلول مناسب تلقیح شدند (پاساژ تقویتی). همانگونه که ذکر گردید در آزمایشگاه فلج اطفال تا سال ۱۹۹۸ از رده های سلولی RD و Hep2 و پس از آن از رده های سلولی RD و L20B برای جداسازی انتروویروسها (از جمله ویروس پولیو) استفاده شده بود. نمونه هایی که در سلول RD مثبت بودند به رده RD جدید و نمونه هایی که در سلول Hep2 مثبت بودند به سلول Hep2 جدید تلقیح شدند. از ۱۸۴ نمونه قدیمی تنها ۱۱۸ نمونه مجدداً مثبت شدند و ویروس موجود در ۶۶ نمونه در کشت سلولی رشد نکرد. دلیل این امر را می توان به قدیمی بودن نمونه ها و نگهداری آنها در فریزر ۲۰- درجه نسبت داد چون تیر ویروس فعال در نمونه های قدیمی به مرور زمان کاهش می یابد. برای نگهداری طولانی مدت این ویروسها باید از ازت مایع و یا حداقل فریزر ۸۶- درجه استفاده کرد.

مطالعات نشان داده اند که در زمان واکسیناسیون همگانی فلج اطفال به دلیل استقرار و تکثیر ویروس پولیوی واکسن در روده، انتروویروسها در روده کاهش می یابند و در نتیجه جداسازی آنها از مدفوع کم می شود (Singh et al. 2002)، همچنین تضعیف یا تقویت پایش موارد فلج شل حاد در فراوانی جداسازی انتروویروس های غیرپولیوی نقش اساسی دارد. جدول ۱ نشان می دهد فراوانی انتروویروس های غیرپولیوی با گذشت زمان به تدریج کاهش یافته است. بنابراین یکی از دلایل کاهش جداسازی انتروویروس های غیرپولیوی در سالهای ۱۹۹۸ به بعد را می توان به گسترش واکسیناسیون همگانی ویروس پولیو نسبت داد.

نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که گردش انتروویروس ها در گروه سنی ۱ تا ۵ سال بطور معنی داری بیشتر از سنین دیگر بوده است. انتروویروس ها انتشار وسیعی در جهان دارند، علائم بالینی آنها متنوع است و عوامل مختلفی در انتشار عفونت های ناشی از این ویروس

ریشه‌کنی پولیومیلیت مطرح بوده و سبب اپیدمی‌های فلج از جمله فلج بصل‌النخاعی شده است. انتروویروس ۷۱ از جمله سروتایپ‌هایی است که بر روی کشت سلولی به سختی رشد می‌کنند و بیشتر برای تشخیص آن از روشهای مولکولی استفاده می‌شود. در بررسی انجام شده توسط داسیلوا و همکارانش که در برزیل انجام شد مشخص گردید که انتروویروس ۷۱ مهمترین انتروویروس در طول دوره ریشه‌کنی پولیومیروس بوده است و توانسته فلج شل حاد با عارضه فلج باقیمانده ایجاد نماید (da Silva et al. 1996). در مطالعه دیگری که توسط دشپاند و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در هند انجام شد از یک پسر ۵ ساله مبتلا به فلج شل حاد که بعد از پیگیری ۶۰ روزه دارای فلج باقیمانده بود انتروویروس ۷۱ جدا سازی شد. محققین توانستند در این تحقیق با استفاده از کشت سلولی RD انتروویروس ۷۱ را جداسازی کنند ولی سروتایپ ویروس با استفاده از سکانس کردن ناحیه VP1 تعیین گردید (Deshpande et al. 2003). بهتر است برای شناسایی این سروتایپ مهم انتروویروسی در بیماران مبتلا به فلج شل حاد از استخراج مستقیم RNA از نمونه مدفوع استفاده شود تا احتمال شناسایی این تایپ افزایش یابد. در ایران تا بحال فقط یک مورد از شناسایی انتروویروس ۷۱ در یک بیمار فلج شل حاد که دارای فلج باقیمانده بوده است گزارش شده است که این مورد نیز با استفاده از کشت سلولی نبوده است (Shahmahmoodi et al. 2008). این ویروس بیشتر در اپیدمیهای بیماری دست، پا و دهان دیده شده و در کشور ما تاکنون از اپیدمی این بیماری هیچ گزارشی نشده است و اطلاعات درباره اپیدمیولوژی این ویروس در جامعه ایران بسیار ناقص است. برای ارزیابی سابقه گردش این ویروس در مردم جامعه ایرانی در گروه‌های مختلف سنی و در شهرهای مختلف با این ویروس بهتر است ابتدا یک مطالعه سرواپیدمیولوژی (با حجم نمونه قابل قبول از نظر آماری) برای شناسایی IgG ضد انتروویروس ۷۱ در گروه‌های

همراه با رده سلولی RD از رده سلولی دیگری که به کوکساکسی B حساس باشد استفاده نماید. همچنین از آنجا که در بسیاری از تحقیقات از کوکساکسی ویروس‌های B به عنوان علل احتمالی بیماری‌های قلبی و نیز دیابت وابسته به انسولین نام برده شده است (Akatsuka et al. 2009; Karavidas et al. 2007; Benettoni and Berton 2011). شناسایی این تایپ از ویروسها در نمونه‌های بیماران فلج شل حاد و نیز افراد سالم روند گردش این سروتایپ مهم را در کشور ما مشخص خواهد کرد.

به طور کلی می‌توان گفت استفاده از دو یا چند رده سلولی باعث افزایش حساسیت جداسازی انتروویروس‌ها می‌شود، اگرچه این کار به علت گران بودن روش کشت سلولی مقرون به صرفه نیست و کاربرد زیادی ندارد. لازم به ذکر است که حتی در صورت استفاده از ترکیب چند رده سلولی، روش کشت سلولی قادر نیست تمام تایپهای انتروویروسها را شناسایی کند و امروزه استفاده از روشهای مولکولی برای شناسایی انتروویروس‌ها مقبولیت فزاینده‌ای یافته است (Oberste et al. 1999; Oberste et al. 2009; Rahimi et al. 2009).

در این مطالعه انتظار می‌رفت که مواردی از انتروویروس ۷۱ در نمونه‌های بیماران فلج شل حاد شناسایی شود ولی هیچ موردی از این ویروس در نمونه‌ها شناسایی نشد. انتروویروس ۷۱ از سروتایپ‌هایی است که در مطالعات مشابه از بیماران مبتلا به فلج شل حاد که عارضه فلج باقیمانده داشته‌اند بدست آمده است. این سروتایپ برای اولین بار در سال ۱۹۶۹ شناسایی شد و بیشتر به اپیدمیهای از جمله اگزانتهم بچگی و بیماری دست، پا و دهان مربوط بوده است. همچنین برخی از بیماریهای حاد عصبی از جمله فلج شبیه پولیومیلیت، انسفالیت و مننژیت آسپتیک به این ویروس نسبت داده شده است (Cardosa et al., 2003). این ویروس به عنوان مهمترین انتروویروس نوروتروپیک ویرولانت در طول دوره

که دچار فلج باقیمانده هستند می‌توان سروتایپ‌های موثر انتروویروس‌های غیرپولیوی را در ایجاد فلج شل حاد تعیین نمود و برای پیشگیری از فلج شل حاد ناشی از این ویروس‌ها چاره‌ای اندیشید.

نتیجه‌گیری

پس از ویروس پولیو، انتروویروس‌های غیرپولیوی از مهمترین عوامل ایجادکننده فلج شل حاد در نظر گرفته می‌شوند و بررسی فراوانی و تعیین سروتایپ‌های در گردش این ویروس‌ها اهمیت بسیار یافته است. با توجه به اینکه حدود ۱۰ سال است که ویروس وحشی پولیو در کشور ما ریشه کن شده ولی تعداد موارد فلج شل حاد نه تنها کم نشده بلکه افزایش نیز یافته است، بهتر است مطالعاتی جهت بررسی فراوانی و تعیین سروتایپ NPEVs در سالهای پس از ریشه‌کنی ویروس وحشی پولیو (۲۰۰۰ به بعد) در کشور ما انجام شود و ارتباط سروتایپ‌های شناسایی شده و فلج باقیمانده تعیین گردد. اطلاعات بدست آمده در سیاست‌گذاری‌های آتی واکسیناسیون اهمیت فوق‌العاده خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی جهت پشتیبانی مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مقاله حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی با کد ۱۱۲۰۱-۲۷-۰۳-۸۹ می‌باشد که در آزمایشگاه کشوری تشخیص فلج اطفال ایران، بخش ویروس‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است.

مختلف سنی در شهرهای مختلف ایران طراحی شود تا اصولاً سابقه گردش این ویروس در جامعه ما ارزیابی گردد. در صورتی که گردش این سروتایپ در جامعه ما به اثبات برسد و نسبت قابل توجهی از مردم آنتی بادی ضد انتروویروس ۷۱ داشته باشند مرحله بعد طراحی مطالعه‌ای است که استخراج مستقیم RNA از نمونه مدفوع تمامی بیماران فلج شل حاد انجام گیرد و حضور یا عدم حضور این ویروس با روشهای مولکولی در مدفوع این بیماران تایید یا رد گردد. به این صورت می‌توان پس از ویروس پولیو برای مقابله با یکی دیگر از انتروویروس‌های ایجادکننده فلج اقدام نمود.

ریشه‌کنی جهانی پولیومیلیت نزدیک است و پس از آن واکسیناسیون با واکسن خوراکی پولیو متوقف خواهد شد. با ریشه‌کنی پولیوویروس وحشی اهمیت عوامل دیگر بعنوان ایجادکنندگان فلج شل حاد رو به فزونی خواهد گذاشت و از همه مهمتر انتروویروس‌های دیگری شناسایی خواهند شد که بعنوان علت فلج شل حاد مطرح خواهند گردید. به همین دلیل است که علاقه و تمایل به گردش، شناسایی، تعیین سروتایپ و تکامل انتروویروس‌های غیرپولیوی و ورود سویه‌های جدید اپیدمیک در حال افزایش می‌باشد.

این تحقیق می‌تواند نقطه شروعی برای مطالعات آینده بر روی انتروویروس‌های غیرپولیوی در کشور ما بشمار آید. با افزایش رده‌های سلولی مورد استفاده در آزمایشگاه و همچنین با استفاده از روش‌های مولکولی و استخراج مستقیم RNA از مدفوع می‌توان حساسیت شناسایی انتروویروس‌های غیرپولیوی در بیماران مبتلا به فلج شل حاد را بهبود بخشید. همچنین با انجام مطالعات گسترده‌تر، حجم نمونه بیشتر و با نمونه‌گیری از افرادی

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبی انتروویروسهای غیر پولیویمی در بیماران AFP بر حسب سال

سال	موارد AFP گزارش شده	فراوانی مطلق NPEV جدا شده	درصد NPEV جدا شده در همان سال
۱۹۹۵	۳۴۸	۵۴	۱۵/۵
۱۹۹۶	۴۷۲	۴۸	۱۰/۱
۱۹۹۷	۴۰۹	۲۷	۶/۶
۱۹۹۸	۳۴۸	۱۰	۲/۸
۱۹۹۹	۲۹۳	۲۲	۷/۵
۲۰۰۰	۳۱۰	۲۳	۷/۴
جمع	۲۱۸۰	۱۸۴	۸/۴ *

* متوسط درصد NPEV جدا شده از سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۰

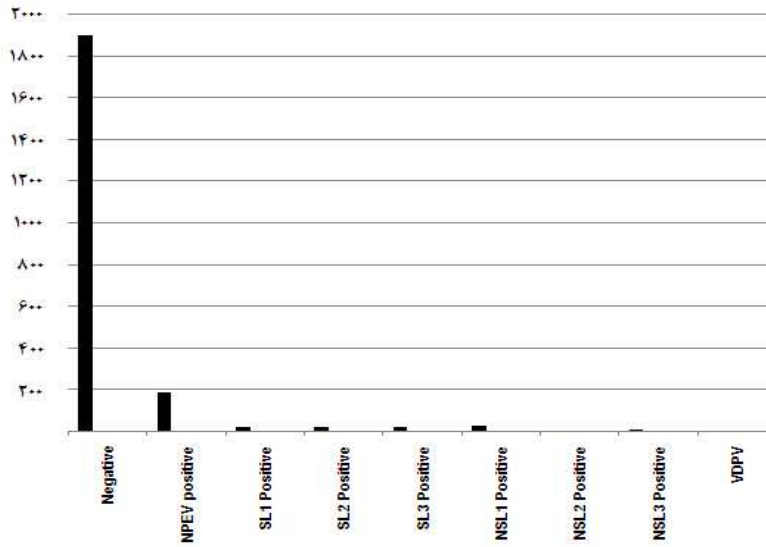
جدول ۲- فراوانی سروتایپ های مختلف انتروویروسهای غیرپولیویمی در نمونه های بیماران فلج شل حاد ایران در سالهای

۱۳۸۹-۱۳۸۴

سروتایپ انتروویروس	فراوانی (درصد)
Echo1	۱ (۰/۸۵)
Echo3	۲ (۱/۷)
Echo4	۱ (۰/۸۵)
Echo6	۱۷ (۱۴/۴)
Echo7	۱۳ (۱۱)
Echo11	۱۵ (۱۲/۷)
Echo12	۹ (۷/۶)
Echo13	۱۲ (۱۰/۲)
Echo14	۱ (۰/۸۵)
Echo19	۲ (۱/۷)
Echo20	۴ (۳/۴)
Echo21	۱ (۰/۸۵)
Echo24	۱ (۰/۸۵)
Echo27	۱ (۰/۸۵)
Echo29	۴ (۳/۴)
Echo30	۳ (۲/۵)
Echo33	۲ (۱/۷)
CoxA9	۱ (۰/۸۵)
CoxB	۲۸ (۲۳/۷)
Total	۱۱۸ (۱۰۰)

جدول ۳ - فراوانی سروتاپ های مختلف انتروویروسهای غیرپولیویی در نمونه های بیماران فلج شل حاد سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۹ بر حسب سال

سروتایپ انتروویروس	سال						کل سروتاپ شناسایی شده
	۱۹۹۵	۱۹۹۶	۱۹۹۸	۱۹۹۸	۱۹۹۹	۲۰۰۰	
Echo1	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱
Echo3	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۲
Echo4	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱
Echo6	۴	۱۰	۰	۰	۳	۰	۱۷
Echo7	۱	۷	۵	۰	۰	۰	۱۳
Echo11	۲	۵	۲	۰	۲	۴	۱۵
Echo12	۲	۵	۰	۰	۲	۰	۹
Echo13	۴	۴	۲	۱	۱	۰	۱۲
Echo14	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱
Echo19	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۲
Echo20	۲	۰	۰	۱	۰	۱	۴
Echo21	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱
Echo24	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱
Echo27	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱
Echo29	۳	۰	۱	۰	۰	۰	۴
Echo30	۰	۰	۰	۰	۰	۳	۳
Echo33	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۲
CoxA9	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱
CoxB	۱۳	۶	۷	۲	۰	۰	۲۸
Total	۳۴	۴۰	۱۷	۴	۱۰	۱۳	۱۱۸



نمودار ۱ - فراوانی مطلق نمونه های بیماران فلج شل حاد (AFP) ایران در سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۹ بر حسب نتایج

NPEV: Non Polio Enterovirus

SL1: Polio virus serotype 1, Sabin- Like (vaccine)

SL2: Polio virus serotype 2, Sabin- Like (vaccine)

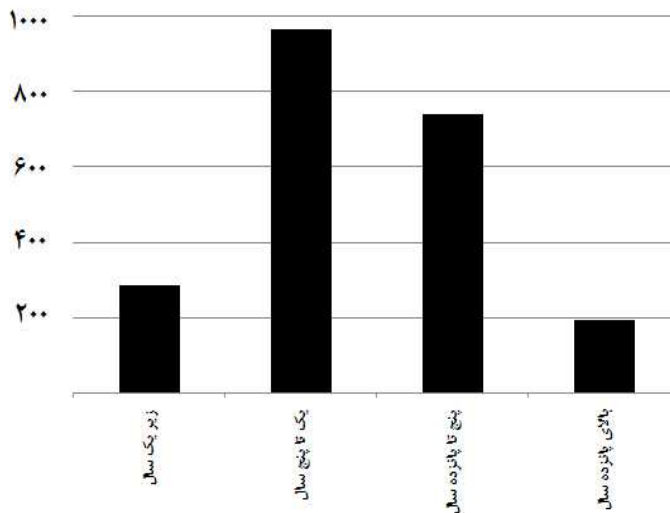
SL3: Polio virus serotype 3, Sabin- Like (vaccine)

NSL1: Polio virus serotype 1, Non Sabin- Like (wild)

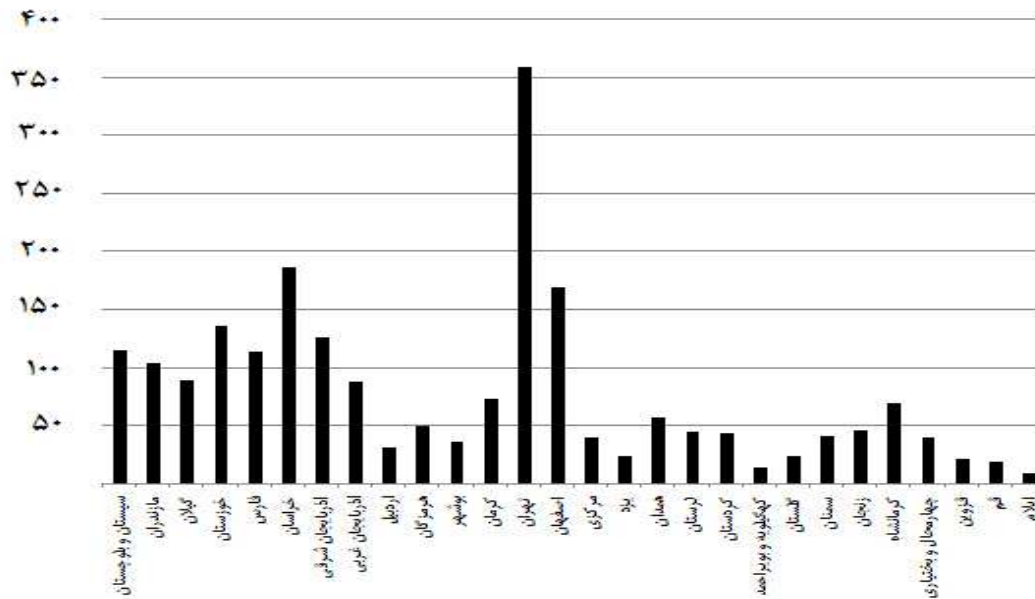
NSL2: Polio virus serotype 2, Non Sabin- Like (wild)

NSL3: Polio virus serotype 3, Non Sabin- Like (wild)

VDPV: Vaccine Derived Polio Virus



نمودار ۲ - فراوانی مطلق نمونه های بیماران فلج شل حاد (AFP) سالهای ۱۳۸۴-۱۳۸۹ ایران بر حسب گروه های سنی



نمودار ۳ - فراوانی مطلق نمونه های بیماران فلج شل حاد (AFP) سالهای ۱۳۸۹-۱۳۸۴ ایران بر حسب استان

References

- Akatsuka, H., Yano, Y., Gabazza, E.C., Morser, J., Sasaki, R., Suzuki, T., Fujiwara, R., Katsuki, A., Takei, Y. and Sumida, Y., 2009. A case of fulminant type 1 diabetes with coxsackie B4 virus infection diagnosed by elevated serum levels of neutralizing antibody. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **84**(3), e 50-2.
- Bahri, O., Rezig, D., Nejma-Oueslati, B.B., Yahia, B., Sassi, B., Hogga, N, Sadraoui, A. and Triki, H., 2004. Enteroviruses in Tunisia: Virological surveillance over 12 years (1992-2003). *Journal of Medical Microbiology*, **54**, pp. 63-69.
- Benettoni, A. and Berton, E., 2011. Echocardiographic Detection of Early Myocardial Calcification in Acute Neonatal Myocarditis Due to Coxsackie Virus Type B. *Pediatrics Cardiology*, **30**(6), pp. 862-863.
- Cardosa, M.J., Perera, D., Brown, B.A., Cheon, D., Chan, H.M., Chan, K.P., Cho, H. and McMinn, P., 2003. Molecular Epidemiology of Human Enterovirus 71 Strains and Recent Outbreaks in the Asia-Pacific Region: Comparative Analysis of the VP1 and VP4 Genes. *Emerging Infectious Diseases*, **9**(4), pp. 461-468.
- Chaves, S.S., Black, J., Kennet, M. and Lobo, S., 2001. Coxsackie virus A24 infection presenting as acute flaccid paralysis. *The LANCET*, **357**(9256), p. 605.
- Da Silva, E.E., Winkler, M.T. and Pallansch, M.A., 1996. Role of Enterovirus 71 in acute flaccid paralysis after the eradication of poliovirus in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, **2**(3), pp. 231-232.
- Deshpande, J.M., Nadkarni, S.S. and Francis, P.P., 2003. Enterovirus 71 isolated from a case of acute flaccid paralysis in India

- represents a new genotype. *Current Science*, **84**(10), pp. 1350-1353.
- Dhole, T., Ayyagari, A., Chowdhary, R., Shakya, A., Shrivastav, N., Datta, T. and Prakash, V., 2009. Non-polio enteroviruses in acute flaccid paralysis children of India: Vital assessment before polio eradication. *Journal of Pediatrics and Child Health*, **45**, pp. 409-413.
- Karavidas, A., Lazaros, G., Noutsias, M., Matzaraki, V., Danias, P.G., Pyrgakis, V., Voudris, V. and Adamopoulos, S., 2011. Recurrent coxsackie B viral myocarditis leading to progressive impairment of left ventricular function over 8years. *International Journal of Cardiology*, **151**(2), e 65-7.
- Kessler, H.H., Santner, B., Rabenau, H., Berger, A., Vince, A., Lewinski, C., Weber, B., Pierer, K., Stuenzner, D., Marth, E. and Doerr, H.W., 1997. Rapid Diagnosis of Enterovirus Infection by a New One-Step Reverse Transcription –PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 976-977.
- Nadkarni, S.S. and Deshpande, J.M., 2003. Recombinant murine L20B cell line supports multiplication of group a coxsackieviruses. *Journal of Medical Virology*, **70**(1), pp. 81-5.
- Oberste, M.S., Maher, K., Flemister, M.R., Marchetti, G., Kilpatrick, D.R. and Pallansch, M.A., 2000. Comparison of classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(3), pp. 1170-1174.
- Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister, M.R., Brown, B.A. and Pallansch, M.A., 1999. Typing of human enteroviruses by partial Sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(5), pp. 1288-1293.
- Oberste, M.S., Maher, K., Williams, A.J., Sissoko, N.D., Brown, B.A., Gookin, M.S., Penaranda, S., Mishrik, N., Uddin, M. and Pallansch, M.A., 2006. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: A tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *Journal of General Virology*, **87**, pp. 119-128.
- Pallansch, M.A. and Roos, R.P., 2007. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses, Chapter 25, *Fields Virology*, 5th edition, Lippincott Williams and Wilkins, ISBN 0-7817-6060-7.
- Patti, A.M., Santi, A., Fiore, L., Vellucci, L., De Stefano, D., Bellelli, E., Barbuti, S. and Fara, G.M., 2001. Enterovirus surveillance of Italian healthy children. *European Journal of Epidemiology*, **16**(11), pp. 1035-1038.
- Rahimi, P., Tabatabaie, H., Gouya, M.M., Mahmudi, M., Musavi, T., Samimirad, K., Mokhtariazad, T. and Nategh, R., 2009. Direct Identification of Non-polio Enteroviruses in residual Paralysis Cases by Analysis of VP1 Sequences. *Journal of Clinical Virology*, **45**, pp. 139-41
- Saeed, M., Zaidi, S., Naeem, A., Masroor, M., Sharif S., Shaukat, S., Angez, M. and Khan, A., 2007. Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. *BMC Infectious Diseases*, **(15)**, p.7:6.
- Singh, S., Chow, V.T.K., Phoon, M.C., Chan, K.P. and Pih, C.L., 2002. Direct Detection of Enterovirus 71 (EV71) in Clinical Specimens from a Hand, Foot, and Mouth Disease Outbreak in Singapore by Reverse Transcription – PCR with Universal Enterovirus and EV-71- Specific Primers. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(8), pp. 2823-2827.
- Shahmahmoodi, S., Mehrabi, Z., Eshraghian, M.R., Mokhtari Azad, T., Tabatabaie, H., Yousefi, M., Farrokhi, K., Gouya, M.M., Esteghamati, A., Moosavi, T., Zahraie, M., Samimi Rad, K., Shokati, Z. and Nategh, R., 2008. First detection of enterovirus 71 from an acute flaccid paralysis case with residual paralysis in Iran. *Journal of Clinical Virology*, **42**(4), pp. 409-411.

- Solomon, T. and Willison, H., 2003. Infectious causes of acute flaccid paralysis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **16**, pp.375-381.
- Tsao, L.Y., Lin, C.Y., Yu, Y.Y. and Wang, B.T. 2006. Microchip, reverse transcription-polymerase chain reaction and culture methods to detect enterovirus infection in pediatric patients. *Pediatrics International*, **48**, pp. 5-10.