ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of Influenza A Viruses in Patients with Flu Symptoms Attending Mazandaran Provinces Health Centers, 2009-2013

Sharhbano Nandost Kenari[1],
Mohammadreza Haghshenas[2],
Mohsen Mirzaei[3],
Mohammad Sadeq Rezaee[4],
Ahmad Tabrizi[5]

[1] Department of microbiology Brojerd Band Azan University, Brojerd, Iran
[2] Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Pyrapezshki, Islamic Azad University, Brojerd Branch, Brojerd, Iran
[4] Associate Professor, Department of Pediatrics, Nosocomial Infections Research Centre, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] MSc in Microbiology, Influenza Laboratory, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 7, 2014 ; Accepted October 19, 2014)

Abstract

Background and purpose: Influenza A is an infectious disease caused by RNA viruses of the influenza viruses. Influenza viruses spread around the world in seasonal epidemics. It is estimated to affect %5-%15 of the global population and causing about 250000 to 500000 yearly deaths, rising to millions in some pandemic years. The aim of this study was an epidemiological survey of influenza A virus in patients from Mazandaran province, in North of Iran during 2009-2013 using Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Materials and methods: In this cross-sectional study, 2781 throat swabs from common cold samples were collected from patients attending Mazandaran province health centers. Influenza-RNA was extracted from samples using Pure LinkTM Viral RNA/DNA Kit. Identification of Influenza A viruses was done through RT-PCR using Super Script III Platinum, and Quantitative Real Time PCR System from Invitrogen with specific primers and probs. All samples were examined in the Influenza Laboratory affiliated with Mazandaran University of Medical Sciences.

Results: A total of 2781 patients including 1543 (%55.48) female and 1238 (%44.52) male were studied. We found 516 (%18.55) patients with influenza A virus of whom 281 (%55.46) were female and 235 (%45.54) were male. Most of these patients aged 21-30 years of old (%24.16). Influenza A virus was observed more (%31.61) in 2012.

Conclusion: Influenza is one of the most prominent respiratory infections of human which causes severe morbidity and mortality. New influenza A viruses are constantly evolving by mutation or by re-assortment, since the influenza virus evolves rapidly, and new strains quickly replace the older ones. Due to the high mutation rate of the virus, a particular influenza vaccine usually confers protection for no more than few years. Identification of different types of viruses could be of great benefit in developing efficient vaccine.

Keywords: Influenza A virus, severe disease, RT-PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(119): 1-10 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۹ آذر سال ۱۳۹۳ (۱۰-۱)

بررسی شیوع ویروس آنفلوآنزای تیپ A در نمونه های بیماران با علائم آنفلوانزا مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی استان مازندران طی سال های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۲

شهربانو ناندوست کناری[۱]
محمد رضا حق شناس[۲]
محسن میرزایی[۳]
محمدصادق رضائی[۴]
احمد تبریزی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری آنفلوآنزا یک عفونت حاد تنفسی است که غالبا توسط ویروس‌های آنفلوانزای نوع A ایجاد می‌شود. این ویروس در سرتاسر دنیا پراکنده بوده و هر ساله همه‌گیری‌های با شدت متفاوت ایجاد می‌کند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ویروس آنفلوآنزای تایپ A در نمونه‌های بیماران مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی و درمانی استان مازندران طی سال‌های ۱۳۹۲- ۱۳۸۸ انجام شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک مطالعه توصیفی- مقطعی بوده و جامعه مورد مطالعه شامل بیماران با علائم آنفلوآنزا مراجعه‌کننده به مراکز درمانی استان مازندران طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۸۸ بوده است. در این مطالعه از ۲۷۸۱ بیمار با علائم آنفلوآنزا جهت تشخیص ویروس آنفلوآنزای تایپ A نمونه‌گیری انجام شد. در این بررسی با استفاده از Viral RNA/DNA Kits PureLink TM استخراج RNA انجام شد و با استفاده از کیت‌های SuperScript III Platinum, Quantitive Real Time PCR System و با استفاده از پروتکل خاص و پرایمرها و پروب اختصاصی و انجام تست Real Time PCR تشخیص ویروس آنفلوآنزای نوع A انجام شد.

یافته‌ها: از مجموع ۲۷۸۱ نمونه، ۵۵/۴۸ درصد زن و۴۴/۵۲ درصد مرد بودند. ۵۱۶ نفر (۱۸/۵۵ درصد) از این افراد از نظر آنفلوآنزای تایپ A مثبت بودند (۲۸۱ نفر زن (۵۴/۴۶ درصد) و ۲۳۵ نفر مرد (۴۵/۵۴ درصد)). در این بررسی بیش‌ترین نمونه‌ها مربوط به گروه سنی ۳۰-۲۱ سال با ۲۴/۵۶ درصد بوده است. بیش‌ترین موارد مثبت آنفلوانزای نوع A مربوط به گروه سنی ۳۰-۲۱ سال با ۲۴/۱۶ درصد بود. در این بررسی بیش‌ترین موارد مثبت آنفلوانزای نوع A مربوط به سال ۱۳۹۰ با ۳۱/۶۱ درصد بوده است.

استنتاج: ویروس‌های آنفلوآنزای تایپ A ویروس‌های ناپایدار بوده که امکان تغییرات ژنتیکی در ساختمان آن‌ها وجود دارد و هر ساله تایپ‌های جدیدی از آن پدید می‌آید که خصوصیات متفاوتی را از لحاظ شدت بیماری دارا می‌باشند. تشخیص به موقع و شناسائی احتمالی تایپ‌های جدید می‌تواند درطراحی و ساخت واکسن مناسب کمک نماید. لذا برای ایجاد ایمنی علیه ویروس‌های آنفلوآنزای تایپ A می‌توان از واکسن و برای درمان آن از داروهای مناسب استفاده نمود.

واژه های کلیدی: ویروس آنفلوآنزای تایپ A، عفونت حاد تنفسی، RT-PCR

مقدمه

بیماری آنفلوانزا یک بیماری عفونی حاد تنفسی است که عامل آن ویروس‌های آنفلو آنزا می‌باشند(۱). ویروس آنفلوانزا در سرتاسر دنیا پراکنده بوده و هر ساله همه‌گیری‌هایی با شدت متفاوت ایجاد می‌نماید و سالیانه

مولف مسئول: محمد رضا حق شناس- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: Haghshenas2001@yahoo.com
۱. دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد گرایش میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد، بروجرد، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۴. دانشیار، گروه اطفال، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۵/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۶/۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۷/۲۷

۱۵ - ۵ درصد از جمعیت را آلوده می‌کند. این ویروس در اپیدمی‌های فصلی در سرتاسر دنیا منتشر می‌شود که سالانه منجر به مرگ هزاران نفر و گاهی در موارد پاندمی باعث مرگ میلیون‌ها نفر می‌شود(۲).

ویروس‌های آنفلوآنزا متعلق به خانواده ارتومیکسو ویریده بوده و دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای چند قطعه‌ای و پوشش‌دار می‌باشند(۲،۱). ویروس های این خانواده از لحاظ خصوصیات پروتئین‌های ساختمانی و نوکلئوپروتئین به سه تایپ A،B و C طبقه‌بندی می‌شوند(۳). همه آن‌ها از نظر ساختمانی شبیه به هم بوده و دارای پوشش لیپیدی حاوی دو گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین (H) و نورامینیداز (N) می‌باشند که این دو از آنتی‌ژن‌های مهم ویروس آنفلوآنزا می‌باشند و تنوع آنتی‌ژنیک ویروس و نقش ایمنی میزبان را تعیین می‌کنند. این آنتی‌ژن‌ها هم‌چنین امروزه هدف داروهای آنتی‌ویروسی می‌باشند. براساس ترکیبات سطحی هماگلوتنینین و نوروآمنیداز، ویروس‌های آنفلوانزای تایپ B و C تنها دارای یک نوع سروتایپ هستند(۵،۴). در حالی که ویروس آنفلوانزای تایپ A دارای ساب تایپ‌های زیادی می‌باشد و بیش‌ترین موارد بیماری آنفلوانزا در انسان از نوع آنفلوآنزای تایپ A می‌باشد(۶). این ویروس علاوه بر انسان می‌تواند برخی از حیوانات مثل پرندگان، پستانداران دریایی، خوک و اسب را نیز مبتلا کند(۷،۳).

ویروس آنفلوانزای نوع A ویروس ناپایداری است که دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای با پولاریته منفی و ۸ قطعه‌ای بوده که در ساختمان ژنتیکی آن امکان تغییر وجود دارد. تغییرات ژنتیکی ممکن است جزیی و یا گسترده باشد که در نتیجه این تغییرات، ممکن است ویروس جدیدی به وجود آید که بیماری‌زایی شدیدتری را ایجاد کرده و باعث همه‌گیری جهانی شود(۸).

ارزیابی بالینی در تشخیص ویروس آنفلوآنزای A بسیار مهم است و بسیاری از افراد مبتلا دارای علائم بالینی تب بالا، لرز، سرفه، گلودرد، دردهای عضلانی، بی‌حالی و بی‌اشتهائی می‌باشند. ولی برای تشخیص قطعی این ویروس جدا کردن ژنوم آن از نمونه‌های حلق و بینی و با استفاده از تست RT-PCR الزامی می‌باشد(۱۰،۹). با استفاده از تست سریع می‌توان به تشخیص ویروس آنفلوآنزای A کمک کرد ولی این تست از حساسیت بالائی برخوردار نبوده و نمی‌تواند بین ساب تایپ های ویروس‌های آنفلوآنزای A تمایز دهد(۱۲،۱۱).

ویروس آنفلوانزا تایپ A در قرن بیستم باعث چندین پاندمی شده که هر کدام از این پاندمی‌ها به دلیل پدید آمدن یک ساب تایپ جدید از ویروس آنفلوآنزای نوع A بوده است که منجر به مرگ ده‌ها میلیون نفر گشته است(۱۳). ویروس آنفلوآنزای A/H1N1 اولین بار در آوریل ۲۰۰۹ (فروردین ۱۳۸۸) در اثر آلودگی همزمان خوک به ساب تایپ‌های شایع آنفلوآنزای نوع A و تکثیر هم زمان و جابجائی ژنوم آن‌ها پدید آمد که با قدرت و شکل بیماریزائی متفاوت از تایپ‌های فصلی، در مکزیک و چند ایالت آمریکا گزارش شد و سپس به سرعت در اغلب کشورها شیوع پیدا کرد و دو ماه بعد از اولین گزارش بیماری، سازمان بهداشت جهانی اعلام کرد که به صورت همه گیری جهانی درآمده است(۱۶-۱۴).

در بررسی‌های به عمل آمده، میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای A در مناطق مختلف و در زمان‌های مختلف متفاوت گزارش شده است. در مطالعه انجام شده در ایران در سال ۱۳۸۱ از مجموع ۱۵۸ نمونه بیمار با علائم آنفلوآنزا، میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای A در کودکان ۹/۳۰ درصد(۱۷)، و در مطالعه دیگر از مجموع ۱۳۸۹ نمونه بیمار در سال ۱۳۶۶، میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای A حدود ۱۹/۷۰ درصد(۱۸) گزارش شده است. در مطالعات انجام شده در دیگر کشورها میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای A در مناطق مختلف متفاوت گزارش شده است. به طوری که از مجموع ۲۵۸ نمونه در سال ۲۰۱۱-۲۰۱۰، میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای A حدود ۱۸/۶۰ درصد(۱۹) گزارش شده است و در مطالعه دیگر در شرق هند که در سال ۲۰۱۱-۲۰۱۰ بر

روی ۲۹۱۷ نمونه بیمار انجام شد، میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای A در حدود ۱۲/۸۶ درصد گزارش شده است(۲۰). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی بعد از حدود یک سال از شیوع ویروس آنفلوآنزای A/H1N1، بیش از ۱۷۷۰۰ نفر بیمار در اثر ابتلا به این بیماری در دنیا جان خودشان را از دست داده‌اند(۲۱) و هم‌چنین بر اساس بررسی به عمل آمده در ایران از مجموع ۲۰۵ نفر دارای ویروس آنفلوآنزای A/H1N1 مثبت، تعداد ۵ نفر (۲/۴۴ درصد) از آن‌ها جان خودشان را از دست داده‌اند(۲۲).

این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ویروس های آنفلوآنزای تایپ A در نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه آنفلوآنزای استان مازندران در بیماران مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی- درمانی در شهرهای مختلف استان مازندران طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۸۸ و با استفاده از تست Real Time PCR انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری:

این مطالعه یک مطالعه توصیفی- مقطعی بوده و جامعه مورد مطالعه شامل بیماران با علائم آنفلوآنزا مراجعه‌کننده به مراکز درمانی استان مازندران طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۸۸ بوده است. در این مطالعه با آگاهی و اطلاع قبلی از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی و درمانی و هم‌چنین از بیماران بستری در مراکز درمانی، نمونه‌گیری جهت تشخیص ویروس آنفلوآنزا انجام شده است.

از بیماران مشکوک به آنفلوآنزا به وسیله سوآپ داکرون از ناحیه نازوفارنگس و یا با استفاده از مایع اختصاصی و قرقره از گلو و با رعایت اصول ایمنی نمونه گیری انجام شده و با رعایت اصول زنجیره سرما به آزمایشگاه آنفلوآنزا جهت تشخیص ویروس آنفلوآنزا نوع A منتقل شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای $80^{\circ}c$ – نگهداری می شد. اطلاعات لازم شامل سن و جنس و محل زندگی از طریق پرسشنامه از بیمار جمع‌آوری شد.

استخراج RNA:

جهت استخراج RNA از نمونه‌های بیماران از کیت Viral RNA/DNA Kits PureLinkTM از شرکت Invitrogen استفاده شد. در این مرحله 25 ml پروتیناز را به تیوپ‌های سانتریفیوژ استریل اضافه کرده و سپس 200 ml از نمونه بیمار و هم حجم آن محلول Lysis Buffer به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ ثانیه با ورتکس مخلوط شد. محلول فوق در دمای 56o C به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کرده و سپس به مدت ۳-۲ ثانیه سانتریفیوژ گردید تا تمام نمونه در انتهای تیوپ قرار گیرد. به محلول فوق 250 ml الکل ۹۶-۱۰۰ درصد اضافه کرده و سپس به مدت ۱۵ ثانیه با ورتکس آن را مخلوط کرده و محلول فوق را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶C o انکوبه شد. 675 ml از محلول حاصله را به تیوپ‌های Viral Spin C که حاوی فیلتر مخصوص است اضافه کرده و سپس در دور g6800 به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. ستون حاوی فیلتر مخصوص را به میکروتیوپ دیگر منتقل کرده و با استفاده از محلول Wash Buffer به میزان 500 ml دو بار عمل شستشو را انجام داده و در دور g6800 به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول داخل تیوپ را دور ریخته و با استفاده از سانتریفیوژ و با دور بالا خشک شد. فیلتر مخصوص Viral Spin C را به تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری موجود در کیت قرار داده و سپس به میزان 50 ml از آب مقطر استریل یا RNase free water را به مرکز ستون حاوی فیلتر مخصوص اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و سپس به مدت ۱ دقیقه با دور بالا آن را سانتریفیوژ نمودیم. میزان ژنوم در محلول حاصله با استفاده از اسپکتوفتومتر مشخص شده و در دمای 80 o C- جهت استفاده از تست Real Time PCR نگهداری گردید.

انجام تست Real Time PCR:

جهت تشخیص ویروس آنفلوآنزای تایپ A، هر یک از نمونه‌های بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی استان مازندران را به وسیله کیت‌های مخصوص SuperScript III Platinum, Quantitive Real Time PCR System از شرکت Invitrogen و دستگاه Rotorgenes System 6000 از کشور استرالیا و با استفاده از پروتکل خاص و پرایمرها و پروب های اختصاصی تست Real Time PCR انجام شده است. پرایمرها و پروب استفاده شده همگی از شرکت Metabion آلمان و با سفارش مرکز آنفلوآنزای ایران بوده است (جدول شماره ۱). در این روش، مقدار ۱۰ µl از محلول ۲ x Reaction Mix، ۴/۰ µl از محلول Forward primer (40 UM)، ۴/۰ µl از محلول Reverse primer (40 UM)، ۰/۴ µl از محلول Probe (10UM)، ۰/۴ µl از محلول Super Script III RT/ Platinum-Taq mix و ۵/۴ µl از محلول RNase-DNase Free water را با هم مخلوط کرده و سپس مقدار ۱۶ µl از محلول میکس شده را به همراه ۴ µl ژنوم استخراج شده هر نمونه مخلوط می‌کنیم و سپس حجم نهایی ۲۰ µl را با استفاده از دستگاه Rotorgenes System 6000 و پرتکل خاص تست Real Time PCR: ۱)- ۵۰ °c به مدت ۳۰ دقیقه ۲)- ۹۵ °c به مدت ۲ دقیقه ۳)- ۴۵ سیکل شامل: ۹۵ °c به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ °c به مدت ۳۰ ثانیه در آزمایشگاه تشخیصی آنفلوآنزا در دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد.

پس از اتمام تست توسط دستگاه، نتایج حاصله با استفاده از برنامه خاص کامپیوتری مثبت و منفی بودن نمونه‌های بیماران به همراه نمونه‌های کنترل مورد ارزیابی قرارگرفت که CT زیر ۴۰ مثبت و بالای آن منفی گزارش می‌گردد.

یافته ها

در بررسی حاضر که طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۸۸ انجام شده است، از مجموع ۲۷۸۱ نمونه‌های بیمار با علائم آنفلوآنزا که از نقاط مختلف استان مازندران به آزمایشگاه آنفلوآنزا ارسال شده است، ۱۲۳۸ مورد مرد (۴۴/۵۲ درصد) و ۱۵۴۳ مورد زن (۵۵/۴۸ درصد) بوده‌اند. در این بررسی در آزمایشگاه آنفلوآنزا و با استفاده از کیت مناسب و پرتکل خاص و با انجام تست Real Time PCR ویروس آنفلوآنزای تایپ A جدا شده است. در این بررسی تعداد ۵۱۶ نفر (۱۸/۵۵ درصد) از نظر آنفلوآنزای تایپ A مثبت تشخیص داده شد که از این تعداد ۲۸۱ نفر زن (۵۴/۴۶ درصد) و ۲۳۵ نفر مرد (۴۵/۵۴ درصد) بوده‌اند.

در این بررسی بیش‌ترین نمونه‌ها مربوط به گروه سنی ۳۰-۲۱ سال با ۲۴/۵۶ درصد بوده است و کم‌ترین نمونه‌ها مربوط به گروه های سنی ۶۰-۵۱ سال، ۲۰-۱۱ سال و بالای ۷۰ سال به ترتیب با ۹/۱۷ درصد، ۹/۶۰ درصد و ۹/۹۳ درصد بوده است. بیش‌ترین موارد مثبت آنفلوآنزای تایپ A از مجموع کل نمونه‌ها مربوط به گروه سنی ۳۰-۲۱ سال با ۲۴/۱۶ درصد بوده و کم‌ترین موارد مثبت آنفلوآنزای تایپ Aاز مجموع کل نمونه‌ها مربوط به گروه سنی بالای ۷۰ سال با ۰/۸۶ درصد بوده است (جدول شماره ۲).

در این بررسی بیش ترین نمونه ها مربوط به سال های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ به ترتیب با ۳۳/۴۸ درصد و ۲۴/۳۴ درصد و کم ترین نمونه ها مربوط به سال های ۱۳۸۸ و ۱۳۹۲ به ترتیب با ۱۰/۶۱ درصد و ۱۳/۰۲ درصد بوده است. بیش ترین موارد مثبت آنفلوآنزای تایپ Aمربوط به سال ۱۳۹۰ با ۳۱/۶۱ درصد و کم ترین موارد مثبت آنفلوآنزای تایپ Aمربوط به سال ۱۳۹۲ با ۱۱/۶۰ درصد بوده است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۱: پرایمرها و پروب های تایپ های ویروس آنفلوآنزای نوع A جهت انجام تست RT PCR (۲۲)

نام پروب و پرایمر	سکانس	رفرنس استخراج شده
Flu A Prob	3'-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-5'	Metabion آلمان
Flu A Forward	3'- GAC CAA TCC TGT CAC CTC TGA C-5'	Metabion آلمان
Flu A Reverse	3'-AGG GCA TTC TGG ACA AAT CGT CTA -5'	Metabion آلمان

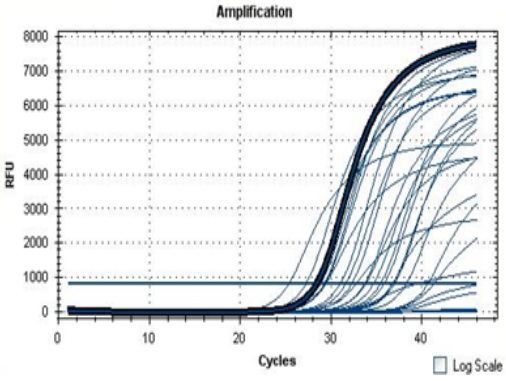
جدول شماره ۲: فراوانی بیماران با علائم آنفلوآنزا و میزان شیوع آنفلوآنزای تایپ A برحسب سن در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی استان مازندران طی سال های ۱۳۹۲-۱۳۸۸

نمونه ها / سن	بیماران با علائم آنفلوآنزا تعداد (درصد)	موارد مثبت آنفلوآنزای A نسبت به کل نمونه ها تعداد (درصد)	موارد مثبت آنفلوآنزای A نسبت به همان گروه سنی تعداد (درصد)
تا ۱۰ سال	(۱۱/۶۱) ۳۲۳	(۲/۰۹) ۵۸	(۱۷/۹۶) ۵۸
۱۱ -۲۰	(۹/۶۰) ۲۶۷	(۶/۵۴) ۴۷	(۱۷/۶۰) ۴۷
۲۱ -۳۰	(۲۴/۵۶) ۶۸۳	(۲۱/۸۳) ۱۸۲	(۲۶/۶۵) ۱۸۲
۳۱ -۴۰	(۱۲/۳۳) ۳۴۳	(۲/۵۵) ۷۱	(۲۰/۷۰) ۷۱
۴۱ -۵۰	(۱۰/۶۱) ۲۹۵	(۱/۸۰) ۵۰	(۱۶/۹۵) ۵۰
۵۱ -۶۰	(۹/۱۷) ۲۵۵	(۱/۵۱) ۴۲	(۱۶/۴۷) ۴۲
۶۱ -۷۰	(۱۲/۱۹) ۳۳۹	(۱/۵۱) ۴۲	(۱۲/۳۹) ۴۲
بالای ۷۰	(۹/۹۳) ۲۷۶	(۰/۸۶) ۲۴	(۸/۷۰) ۲۴
جمع	(۱۰۰) ۲۷۸۱	(۱۸/۵۵) ۵۱۶	(۱۸/۵۵) ۵۱۶

جدول شماره ۳: فراوانی بیماران با علائم آنفلوآنزا و میزان شیوع آنفلوآنزا A به تفکیک سال و جنس در بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی استان مازندران طی سال های ۱۳۹۲-۱۳۸۸

جنس	مرد		زن		جمع	
سال	کل نمونه های بیماران تعداد (درصد)	نمونه مثبت آنفلوآنزای A نسبت به نمونه های همان سال تعداد (درصد)	کل نمونه های بیماران زن تعداد (درصد)	نمونه مثبت آنفلوآنزای A نسبت به نمونه های همان سال تعداد (درصد)	کل نمونه های بیماران مرد تعداد (درصد)	نمونه مثبت آنفلوآنزای A نسبت به نمونه های همان سال تعداد (درصد)
۱۳۸۸	(۹/۶۹) ۱۲۰	(۱۶/۶۷) ۲۰	(۱۱/۳۴) ۱۷۵	(۱۲/۵۷) ۲۲	(۱۰/۶۱) ۲۹۵	(۱۴/۲۴) ۴۲
۱۳۸۹	(۳۱/۴۲) ۳۸۹	(۱۶/۹۷) ۶۶	(۳۵/۱۳) ۵۴۲	(۱۵/۵۰) ۸۴	(۳۳/۴۸) ۹۳۱	(۶۱/۱۱) ۱۵۰
۱۳۹۰	(۲۶/۵۸) ۳۲۹	(۳۰/۴۰) ۱۰۰	(۲۲/۵۵) ۳۴۸	(۳۲/۷۶) ۱۱۴	(۲۴/۳۴) ۶۷۷	(۳۱/۶۱) ۲۱۴
۱۳۹۱	(۱۸/۷۴) ۲۳۲	(۱۲/۵۰) ۲۹	(۱۸/۴۱) ۲۸۴	(۱۳/۷۳) ۳۹	(۱۸/۵۵) ۵۱۶	(۱۳/۱۸) ۶۸
۱۳۹۲	(۱۳/۵۷) ۱۶۸	(۱۱/۹۰) ۲۰	(۱۲/۵۷) ۱۹۴	(۱۱/۳۴) ۲۲	(۱۳/۰۲) ۳۶۲	(۱۱/۶۰) ۴۲
جمع	(۱۰۰) ۱۲۳۸	(۱۸/۹۸) ۲۳۵	(۱۰۰) ۱۵۴۳	(۱۸/۲۱) ۲۸۱	(۱۰۰) ۲۷۸۱	(۱۸/۵۵) ۵۱۶

در این بررسی از تست Real Time PCR و پروب‌های مناسب که از اولیگونوکلئوتیدهای رنگی فلورسینه و FAM بوده‌اند، استفاده شد. پس از شروع همانندسازی و قرار گرفتن پروب بر روی زنجیره که در دو طرف آن Quencher و Reporter قرار گرفته بود و با استفاده از آنزیم و بر اساس پرتکل مناسب، قسمت Reporter شکسته شده که قبل از آن، از ساتع‌شدن نور فلورسانس جلوگیری می‌شد ولی پس از شکسته شدن توسط آنزیم و رهاشدن آن نور فلورسانس ساتع می‌شود که به صورت نمودار بر روی مانیتور مشخص شده است. در این نمودار نمودارهای که قبل از سیکل ۴۰ ایجاد شده باشند، مثبت و بعداز آن منفی گزارش شده است (نمودار شماره ۱).



Threshold or Crossing Line

نمودار شماره ۱: نمودار تست RT-PCR در بیماران آنفلوآنزا مثبت با استفاده از پروب های نشاندار

در این بررسی در آزمایشگاه آنفلوآنزا و با استفاده از کیت مناسب و پرتکل خاص و با انجام تست Real Time PCR ویروس آنفلوآنزای تایپ A جدا شده است. در تست Real Time PCR علاوه بر پرایمرها از پروب مناسب که از اولیگونوکلئوتیدهای رنگی فلورسینه و FAM بوده‌اند، استفاده شد. زنجیره پروب که در دو طرف آن (TAMRA) Quencher و (FAM) Reporter قرار گرفته و در صورت متصل بودن آن دو و نزدیکی آن‌ها لذا هیچ نور فلورسینه ساتع نمی‌شود ولی پس از شروع همانندسازی و قرار گرفتن پروب بر روی زنجیره و شکسته شدن (FAM) Reporter لذا نور سبز فلورسانس ساتع می‌شود که به‌صورت نمودار بر روی مانیتور مشخص شده است. در این شکل، نمودارهایی که در بالای خط Threshold و قبل از سیکل ۴۰ ایجاد شده باشند، مثبت و بعد از آن و هم چنین پائین خط Threshold ایجاد شده باشند، منفی گزارش شده است.

بحث

ویروس آنفلوآنزای نوع A عامل شیوع بیماری آنفلوآنزا می‌باشد که ژنوم آن مدام در حال تغییر می‌باشد. ویروس آنفلوآنزای تایپ A به دلیل تغییر در ساختمان پروتئین‌های سطحی هر ساله تایپ‌های جدیدی از این نوع پدید می‌آید که خصوصیات متفاوتی را دارا می‌باشند و برای ایجاد ایمنی علیه تایپ‌های جدید بایستی از واکسن‌های جدید و برای درمان آن از داروهای مناسب استفاده نمود(۹). پدید آمدن تایپ های جدید ویروس آنفلوآنزا اغلب در اثر جهش‌هایی که در ساختمان ژنتیکی ویروس ایجاد می‌شود و یا در اثر آلودگی هم زمان حداقل دو ساب تایپ متفاوت از ویروس آنفلوآنزای نوع A رخ خواهد داد. در اثر آلودگی هم زمان به سویه‌های انسانی و پرندگان، ویروس آنفلوآنزا نوع A می‌تواند طی پدیده نوترکیبی باعث پدید آمدن سویه‌های جدید گردد که برخی از آن‌ها می‌تواند بیماری شدیدتری ایجاد کند و موجب مرگ و میر بالایی در جامعه شود. به‌طوری‌که برخی از تایپ‌های جدید می‌تواند باعث مرگ‌ومیر بیش‌تری نسبت به آنفلوآنزای فصلی شود. در بررسی انجام شده در آمریکا پس از شیوع تایپ جدید ویروس آنفلوآنزای A در سال ۲۰۰۹، میزان مرگ و میر در هر ۴۰۰ فرد مبتلا یک نفر بوده است. در حالی که در سال ۲۰۰۰ میزان مرگ و میر در افرادی که مبتلا به آنفلوآنزای فصلی بوده اندف از هر ۲۰۰۰ نفر یک مورد گزارش شده است(۲۳).

در بررسی حاضر از مجموع ۲۷۸۱ نمونه‌های بیمار با علائم آنفلوآنزا، تعداد ۱۲۳۸ مرد (۴۴/۵۲ درصد)و ۱۵۴۳ زن (۵۵/۴۸ درصد) بودند که از این تعداد ۵۱۶ نفر (۱۸/۵۵ درصد) از نظر آنفلوآنزای تایپ A مثبت (۲۸۱ نفر زن (۵۴/۴۶ درصد) و ۲۳۵ نفر مرد (۴۵/۵۴ درصد)) بودند. در این تحقیق تعداد هفت نفر از بیماران (۱/۳۶ درصد) با علائم که از نظر ویروس آنفلوآنزای A مثبت بوده‌اند، فوت شده‌اند. در بررسی که در پرتغال بر روی ۳۵۱ نفر از افراد دارای علائم آنفلوآنزا انجام شده است، ۵۴/۴۰ درصد از افراد مبتلا از نظر ویروس آنفلوآنزای تایپ A مثبت بوده‌اند که این نتایج تقریباً نزدیک به سه برابر یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد(۲۴). در بررسی که در عربستان انجام شده است از مجموع ۱۶۵ بیمار با علائم آنفلوآنزا، ۴۷ نفر (۲۸/۴ درصد) از نظر ویروس آنفلوآنزای تایپ A مثبت بوده‌اند که نتایج این یافته‌ها نزدیک به یک و نیم برابر یافته های تحقیق ما می‌باشد(۲۵). هم‌چنین در این بررسی دو نفر از افراد دارای علائم بیماری آنفلوآنزا (۴/۲۶ درصد) جان خودشان را از دست داده‌اند که این تقریباً بیش از سه برابر یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد. در بررسی که در تایوان بر روی ۱۶۶ نفر دارای علائم آنفلونزا انجام شده است، ۱۴ نفر (۸/۴۳ درصد) از نظر ویروس آنفلوآنزای تایپ A مثبت بوده که هیچ یک از بیماران فوق در اثر ابتلا به این ویروس جان خودشان را از دست نداده‌اند که این گزارش متفاوت از یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد(۲۶).

در بررسی که در تایوان انجام شده است(۲۶)، بیش‌ترین بیماران (۴۲/۹ درصد) که دارای علائم آنفلوآنزا بوده‌اند، مربوط به گروه سنی ۳۰-۲۱ سال بوده است که مشابه تحقیق حاضر بیش‌ترین بیماران (۲۴/۵۶ درصد) در گروه سنی ۳۰-۲۱ سال بوده‌اند. هم‌چنین بیش‌ترین موارد مثبت ویروس آنفلوآنزای تایپ A مربوط به همین گروه سنی می باشد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ که در ۲۹۱۷ بیمار انجام شد، ۳۸۲ نفر (۱۲/۸۶ درصد) از نظر آنفلوآنزای A مثبت بوده‌اند(۲۷) که کمی کم‌تر از یافته‌های این بررسی می‌باشد. هم چنین در بررسی به عمل آمده در ۱۴۰۳ مورد بستری در ایتالیا، ۳۲۷ (۲۳/۳۱ درصد) موردآنفلوآنزای A مثبت تشخیص داده شد(۲۸) در بررسی انجام شده در غرب سیبری در سال ۲۰۱۱-۲۰۱۰، از ۲۵۸ مورد بیمار تحت مطالعه، ۵۲ مورد (۲۰/۱۶ درصد) آنفلوآنزای تایپ A گزارش کرده‌اند(۲۹) ولی در این تحقیق از کل ۲۷۸۱ نمونه دریافت شده،۵۱۶ نفر (۱۸/۵۵ درصد) از نظر آنفلوآنزای A مثبت بوده‌اند که کمی بیش‌تر از یافته‌های این بررسی می‌باشد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که نتایج به دست آمده در مناطق مختلف و در زمان‌های متفاوت یکسان نبوده است که علت این اختلاف ممکن است به آموزش‌های لازم و ارتقاء سطح آگاهی افراد و یا استفاده از واکسن مناسب و یا مراقبت از بیماران مربوط باشد. هم‌چنین روش تشخیص، زمان نمونه‌گیری، فرد نمونه‌گیر و فاصله انجام نمونه برداری تا محل انجام آزمایشگاه می‌تواند در نتایج این آزمایش تاثیر بگذارد. بالا بودن میزان شیوع ویروس آنفلوآنزای تایپ A ممکن است به عدم پوشش مناسب واکسیناسیون و یا عدم ایجاد ایمنی مناسب مربوط باشد که در این زمینه اطلاعات دقیقی موجود نمی‌باشد. به دلیل شیوع تایپ جدید ویروس آنفلوآنزای تایپ A در برخی از سال‌ها و عدم پوشش ایمنی توسط واکسن‌های موجود، ممکن است در برخی از سال‌ها و یا در برخی از مناطق، میزان شیوع این ویروس متفاوت گزارش گردد. بیماری آنفلوآنزا ممکن است باعث ایجاد مشکلات حاد تنفسی در افراد گردد و به خاطر عواقب وخیم آن، به ویژه نزد سالخوردگان و افراد مبتلا به ناراحتی‌های مزمن، باید آن را جدی تلقی کرد. ویروس آنفلوآنزای تایپ A باعث ایجاد اپیدمی در جامعه می‌گردد و درصد قابل توجهی از افراد را آلوده می‌سازد. با توجه به میزان شیوع این ویروس در جامعه و ثابت نبودن ساختمان ژنتیکی آن، تشخیص به موقع و مشخص نمودن ساب تایپ‌های آن می‌تواند در طراحی واکسن مناسب و ساخت آن کمک‌کننده باشد. هم چنین استفاده از واکسن‌تری والان ویروس و ایجاد ایمنی فعال در مقابل ویروس می‌توان افراد را در برابر این بیماری ایمن نمود.

سپاسگزاری

با تشکر از همه پرسنل زحمتکش مراکز بهداشتی درمانی و مسئولین محترم آزمایشگاه آنفلوآنزای دانشگاه علوم پزشکی مازندران که در انجام این پژوهش ما را یاری نموده‌اند. این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجوئی خانم شهربانو ناندوست کناری دانشجوی کارشناسی ارشد رشته گرایش میکروبیولوژی می‌باشد.

References

1. Brankston G, Gitterman L, Hirji Z, Lemieux C, Gardam M. Transmission of influenza A in human beings. Lancet Infect Dis 2007; 7(4): 257-265.
2. World Health Organization. Influenza (Seasonal). April 2009, Available at: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/. Retrieved February 13, 2010.
3. International Committee on Taxonomy of Viruses descriptions of: Orthomyxoviridae, Influenzavirus B and Influenzavirus C. Available at: http://en.wikipedia.org/wiki/Or

thomyxoviridae. Last modified November 15, 2014.

4. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. Science 2000; 288(5468): 1051-1053.
5. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. Annu Rev Pathol 2008; 3: 499-522.
6. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79(5): 2814-2822.
7. Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. Science 2005; 310(5747): 482-485.
8. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley P, (eds). Fields Virology 4th. Philadelphia: LWW; 2001; 1533-1579.
9. Roxas M, Jurenka J. Colds and Influenza: A Review of Diagnosis and Conventional, Botanical, and Nutritional Considerations. Altern Med Rev 2007; 12(1): 25-48.
10. Beigel JH. Influenza. Crit Care Med 2008; 36(9): 2660-2666.
11. Shorman M, Moorman JP. Clinical manifestations and diagnosis of influenza. South Med J 2003; 96(8): 737-739.
12. Crum-Cianflone NF, Blair PJ, Faix D, Arnold J, Echols S, Sherman SS, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of an outbreak of novel H1N1 (swine origin) influenza A virus among United States ilitary beneficiaries. Clin Infect Dis 2009; 49(12): 1801-1810.
13. Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, Reber U, Panning M, Muller M, et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. Emerg Infect Dis 2009; 15(10): 1662-1664.
14. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emerg Infect Dis 2006; 12(1): 9-14.
15. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature 2009; 459(7249): 931-939.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus -- United States, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58(30): 826-829.
17. World Health Organization. Influenza A (H1N1)-Update 95. Available at http://www.who.int/csr/don/2010_04_09/en/index.html. Accessed April 13, 2009.
18. Saffar M, Naghshvar F, Âlaee E. Role of respiratory syncytial and Influenza viruses in acute lower respiratory tract infections in mazandaranian children in 2002. J Mazandaran Univ Med Sci 2002; 12(37): 20-29.
19. Nateghian AR, Yousefi K, Shiri M. Infections with Respiratory Syncytial and Influenza Viruses in Hospitalized Children with Influenza-Like Syndrome. Journal of Isfahan Medical School 2012; 30(187): 570-580.
20. Sobolev I, Kurskaya O, Susloparov I, Ilyicheva T, Shestopalov A. Molecular genetic analysis of influenza A/H3N2 virus strains isolated in Western Siberia in the 2010–2011 epidemic season. Infect Genet Evol 2012; 12(8): 1694-1698.

21. Mukherjeel A, Roy T, Agrawal AS, Sarkar M, Lal R, Chakrabarti S, et al. Prevalence and epidemiology of pandemic H1N1 strains in hospitals of Eastern India. J Public Health Epidemiol 2010; 2(7): 171-174.
22. Haghshenas MR, Asgary A, Babamahmoodi F, Rezaei MS, Tabrizee A, Nandoost SH. Prevalence of Influenza A/H1N1 virus in the North of Iran (Mazandaran), 2009-2011. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 22(92): 50-57.
23. LaRussa P. Pandemic novel 2009 H1N1 influenza: what have we learned? Semin Respir Crit Care Med 2011; 32(4): 393-399.
24. Malveiro D, Flores P, Sousa E, Guimarães JC. The 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection: Experience of a paediatric service at a third-level hospital in Lisbon, Portugal. Rev Port Pneumol 2012; 18(4): 175-181
25. Al-Tawfiq JA, Abed M, Saadeh BM, Ghandour J, Shaltaf M, Babiker MM. Pandemic influenza A (2009 H1N1) in hospitalized patients in a Saudi Arabian hospital: epidemiology and clinical comparison with H1N1-negative patients. J Infect Public Health 2011; 4(5-6): 228-234.
26. Yang TH, Chu D, Hu BS, Hung YT, Chou P. Early experience of the pandemic influenza H1N1 2009 epidemic in Taiwan. J Chin Med Assoc 2011; 74(7): 298-304.
27. Echavarria M, Querci M, Marcone D, Videla C, Martinez A, Bonrehi P. Pandemic (H1N1) 2009 Cases, Buenos Aires, Argentina. Emerge Infect Dis 2010; 16(2): 311-313.
28. WHO: Review of the 2010-2011 winter influenza season, northern hemisphere. weekly Epidemiological Record 2011; 86: 222-225.
29. Sobolev I, Kurskaya O, Susloparov I, Llyicheva T, Shestopalov A. Molecular genetic of influenza A/H3N2 virus strain isolated in Western Siberia in the 2010-2011 epidemic season. Infect Genet Evol 2012; 12(8): 1698-1698.