

تعیین فراوانی عفونت ویروسی پارآنفلوانزا به روش ایمونوفلوئورسانس در عفونت‌های حاد تنفسی

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های دستگاه تنفسی سالانه باعث مرگ حدود ۴/۵ میلیون کودک در سراسر جهان می‌شوند که بیشتر این مرگ و میرها در کشورهای در حال توسعه روی می‌دهد. پاتوژن‌های باکتریایی و ویروس‌ها هر دو عامل ایجاد این مرگ و میرها هستند. ویروس پارآنفلوانزا یکی از عوامل شایع ایجادکننده عفونت‌های دستگاه تنفسی می‌باشد. پارآنفلوانزا باعث ایجاد ۳۰٪ از عفونت‌های دستگاه تنفسی در کودکان قبل از سن مدرسه می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی شیوع عفونت ویروس پارآنفلوانزا انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی که از بهمن ماه سال ۱۳۸۲ تا بهمن ماه ۱۳۸۳ بر روی ۹۶ کودک بدو تولد تا پنج سال، مراجعه‌کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان انجام شده، سعی بر این بوده است که با بررسی ترشحات نازوفارنکس بیماران با روش ایمونوفلوئورسانس آنتی‌بادی فراوانی عفونت تنفسی پارآنفلوانزا تعیین شده و بیماران از نظر توزیع فصلی، سن شایع درگیری و علائم و نشانه‌های کلینیکی مختلف مورد بررسی قرار گیرند. **یافته‌ها:** در این بررسی فراوانی نسبی عفونت ناشی از ویروس پارآنفلوانزا ۲۶٪ می‌باشد. شایع‌ترین سن ابتلا در بررسی ما سن ۲۵ تا ۳۶ ماهگی می‌باشد. فصل پاییز شایع‌ترین فصل بروز عفونت‌های دستگاه تنفسی ناشی از پارآنفلوانزا می‌باشد. رینوره (۹۶٪) و سرفه (۸۴٪) شایع‌ترین علامت بالینی و تب (۶۸٪) شایع‌ترین نشانه بالینی به دست آمده بود. شایع‌ترین بیماری کلینیکی، فارنگوتونسیلیت با شیوع ۴۰٪ بود. **نتیجه‌گیری:** فراوانی عفونت پارآنفلوانزا و سن شایع ابتلا مشابه مطالعات قبلی انجام شده در سایر کشورها می‌باشد همچنین در مطالعات انجام شده در اکثر کشورها فصل پاییز و زمستان بوده است و در مطالعه ما هم در فصل پاییز شایع‌تر بوده است.

کلمات کلیدی: عفونت حاد تنفسی، پارآنفلوانزا، ایمونوفلوئورسانس آنتی‌بادی

ستاره ممیشی^۱

نجم الدین کلانتری^{۳*}

فرهاد بنکدار هاشمی^۲

قمر تاج خطایی^۱

سید احمد سیادت^۱

۱- گروه عفونی اطفال، مرکز طبی کودکان

۲- گروه میکروبی شناسی

۳- گروه کودکان، مرکز طبی اطفال

دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: تهران خیابان دکتر قریب - بیمارستان مرکز طبی کودکان، تلفن: ۶۶۴۰۰۰۸۱
email: DrN_kalantari@yahoo.com

مقدمه

دارویی انجام می‌شود مانند استفاده کردن از دگزامتازون به صورت تزریقی و یا خوراکی در درمان کroup. در بعضی از مطالعات انجام شده اختلاف معنی‌داری بین استفاده از روش خوراکی و تزریقی دیده نشده است.^۴ تا سن پنج سالگی تقریباً تمام بچه‌ها عفونت با ویروس پارآنفلوانزا را تجربه می‌کنند.^۵ ویروس سنسیشیال تنفسی هم در بعضی از مطالعات حدود ۳۰٪ عفونت‌های دستگاه تنفسی را ایجاد کرده است.^۶ عفونت‌های پارآنفلوانزای نوع I و II معمولاً در فصل پاییز شایع‌تر است.^۷ پارآنفلوانزای نوع III در تمام فصول دیده می‌شود. اپیدمیولوژی پارآنفلوانزای نوع IV به خوبی شناخته نشده است. داشتن آمار شیوع یک عامل بیماریزا جهت تصمیم‌گیری در مورد انجام واکسیناسیون لازم است ولی کافی نمی‌باشد. با توجه به

بیماری‌های عفونی دستگاه تنفسی سالانه باعث ایجاد ۴/۵ میلیون مرگ در کودکان جهان می‌شوند^۱ که اکثریت این موارد در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران رخ می‌دهد. با کاهش عفونت‌های باکتریایی، عمدتاً^۲ ویروس‌های تنفسی مسئول بروز عفونت می‌باشند.^۲ از جمله ویروس‌های مهم عامل عفونت تنفسی می‌توان به ویروس پارآنفلوانزا، ویروس سنسیشیال تنفسی، آنفلوانزا و سایر ویروس‌ها اشاره کرد.^۳ ویروس پارآنفلوانزا که از خانواده پارامیکسو ویریده می‌باشد عامل یک سوم عفونت‌های تنفسی در کودکان زیر پنج سال می‌باشد. این ویروس باعث بیماری‌های مختلفی می‌شود که در اکثر موارد بدون درمان بهبودی پیدا می‌کنند. در بعضی از موارد درمان

مایع فوقانی و موکوس اضافی موجود در لوله آزمایش خارج و از رسوب (pellet) باقی مانده بعد از یکنواخت کردن، نمونه مناسب تهیه شد. سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه بر روی اسلاید مخصوص قرار گرفت. اسلاید بعد از خشک شدن در هوای اتاق با استون سرد ثابت (فیکس) شد. در ادامه اسلاید آماده شده به وسیله ۲۵ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی بر علیه ویروس پارائنفلوآنزا که با فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) باند شده است، پوشیده شد. در این مرحله اسلاید به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور مرطوب در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و بعد آنتی بادی اضافه روی آن بوسیله محلول PBS شسته شد، بعد از خشک شدن اسلاید در هوای اتاق منطقه رنگ آمیزی شده بوسیله مایع پوشاننده (Fluid Mounting) پوشانیده شد. در این مرحله اسلاید در زیر میکروسکوپ فلورسانس قرار گرفت و قابل بررسی بود. وجود سلول های اپیتلیالی با زمینه قرمز رنگ بدون فلورسانس سبز نشانه منفی بودن اسلاید (IFA منفی) و وجود فلورسانس سبز درون هسته و یا سیتوپلاسم سلول نشانه مثبت بودن اسلاید (IFA مثبت) گزارش شد. با استفاده از نرم افزار spss ویراست ۱۱/۵ اطلاعات، کدبندی شده طبقه بندی شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و با تست χ^2 ، independent test آنالیز صورت گرفت. مقادیر $p < 0/005$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

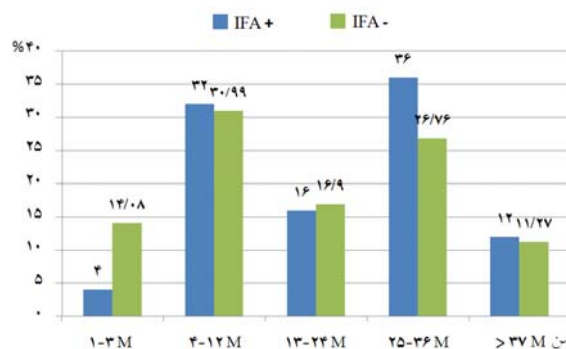
در این بررسی ۹۶ بیمار مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد ۴۵ نفر (۴۷٪) مونث و ۵۱ نفر (۵۳٪) مذکر بودند. تعداد نمونه های گرفته شده در فصول پاییز، زمستان، بهار و تابستان به ترتیب ۳۸ (۳۹/۶٪)، ۳۲ (۳۳/۳٪)، ۱۰ (۱۰/۴٪) و ۱۶ (۱۶/۷٪) بود. ۲۵ نفر از بیماران IFA مثبت از نظر ویروس پارائنفلوآنزا داشتند و در واقع فراوانی نسبی بیماران با IFA مثبت ۲۶٪ بود. ۱۸ نفر (۷۲٪) از این بیماران، مونث و هفت نفر (۲۸٪) مذکر بودند. پراکندگی سنی بیماران مورد مطالعه در دو گروه دارای IFA منفی و IFA مثبت در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانگونه که مشخص است ۳۶٪ مبتلایان در محدوده سنی ۲۵-۳۶ ماه قرار دارند (نمودار ۱). آبریزش بینی شایع ترین علامت بیماری بود که در ۹۶٪ بیماران دیده شد و تب شایع ترین یافته بالینی بود که در ۶۸٪ بیماران دیده شد. ۴۴٪ بیماران دارای تب های پایین بودند ۳۸-۳۷/۵ درجه و ۲۲٪ بیماران تب بالای

شیوع بالای عفونت های تنفسی ناشی از ویروس پارائنفلوآنزا و با توجه به این که برای جلوگیری از هر عفونتی و برنامه ریزی جهت اقدامات پیشگیری کننده مانند واکسیناسیون، دانستن شیوع عامل ایجادکننده ضروری می باشد، از آنجایی که آماری از میزان شیوع ویروس پارائنفلوآنزا در ایران در دست نبود، این مطالعه انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، نمونه ترشحات نازوفارنکس ۹۶ بیمار تا پنج سال که، از بهمن ماه سال ۸۲ تا بهمن ماه سال ۸۳ با علائم عفونت حاد دستگاه تنفسی به درمانگاه و یا اورژانس بیمارستان مرکز طبی کودکان مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این نکته که هدف تعیین فراوانی ویروس پارائنفلوآنزا در بیماران مراجعه کننده با عفونت های دستگاه تنفسی بوده است از گروه شاهد استفاده نشده است. معیارهای ورود به مطالعه وجود علائم و نشانه های عفونت حاد دستگاه تنفسی فوقانی و یا تحتانی و سن حداکثر پنج سال تمام و معیارهای خروج از مطالعه وجود علائم و نشانه های مزمن دستگاه تنفسی مانند ابتلا به بیماری فیروز کیستیک، بیماری های مادرزادی قلب، بیماران دچار نقص ایمنی مادرزادی یا اکتسابی و نیز بیماری هایی مانند عقب ماندگی ذهنی و بیماری های عصبی عضلانی و اسکلتی که مستعد آسپیراسیون های مکرر هستند، بود. ابتدا هدف از انجام نمونه گیری به والدین یا همراه بیمار توضیح داده شد و در صورت پذیرش از طرف ایشان فرم پرسشنامه پر شده و از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه تنفسی مراجعه کننده به اورژانس و یا درمانگاه شرح حال گرفته شد و مورد معاینه دقیق قرار گرفتند. در صورت عدم وجود معیار خروج از مطالعه، پرسشنامه از پیش تهیه شده تکمیل گردید و توسط چهار نفر از رزیدنت های بیمارستان نمونه گیری انجام شد. در این مطالعه از کیت تشخیصی پارائنفلوآنزا (Imagen™ Parainfluenza) با کد ۶۱۰۳ ساخت شرکت DAKO از کشور دانمارک استفاده شد. این کیت در تشخیص پارائنفلوآنزا حساسیت ۹۷/۹٪ و ویژگی ۹۷/۵٪ دارد. در مرحله نمونه گیری ترشحات نازوفارنکس بیماران بوسیله لوله معده شماره ۸ (feeding tube) و سرنگ ۲۰ میلی لیتری آسپیره شد. نمونه به دست آمده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده با محلول سالین بافر شده فسفات (PBS) درون لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۸۰ g سانتریفوژ شد.

۵/۶٪ گزارش شد. در مطالعه ما مانند سایر مطالعات شایع‌ترین سن بروز پارائفلوانزا سن کمتر از سه سالگی بوده است.^{۱۱، ۱۰، ۵} ولی از نظر آماری ارتباط بین سن و عفونت ناشی از پارائفلوانزا بی‌معنی بوده است ($p=0/60$). ما برای این شیوع سنی توجیهی نداریم، در منابع و مطالعات دیگر هم دلیل خاصی برای شیوع پارائفلوانزا در این محدوده سنی ذکر نشده است. در مطالعه ما میزان بروز عفونت در افراد مونث بیشتر بوده است به طوری که حدود ۷۲٪ در افراد مونث و ۲۸٪ در افراد مذکر روی داده است. از نظر آماری هم بین جنس و عفونت ناشی از ویروس پارائفلوانزا ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0/003$). در مطالعه‌ای که در کره جنوبی انجام شده بود عفونت پارائفلوانزایی در افراد مذکر بیشتر بود^۹ و در مطالعه‌ای که در شیکاگو انجام شده بود شیوع پارائفلوانزا با جنس ارتباطی نداشته است.^۸ شاید دلیل این اختلاف‌ها در تعداد مختلف نمونه‌های مذکر و مونث در مطالعات گوناگون باشد. در مطالعه ما فراوانی نسبی بیماری‌هایی که از نظر پارائفلوانزا IFA مثبت داشتند (۴۴٪) در فصل پاییز بیشتر بود. در مطالعاتی هم که توسط Stralitto در برزیل^۷ و Knott و همکارانش^{۱۲} انجام شد، فصل پاییز به عنوان شایع‌ترین فصل بروز عفونت پارائفلوانزا ذکر شده است. در مورد سندرم‌های کلینیکی مختلف بررسی‌ها نشان‌دهنده وجود کروپ در ۹٪ برونشیت در ۵٪ بوده است.^{۹، ۵} همچنین در مطالعه‌ای که در کشور کره جنوبی انجام شده است فارنگوتانسیلیت در ۱۶٪ پنومونی در ۱۵٪ برونشیت در ۵٪ بیماران دیده شده است.^۹ در مطالعه ما شایع‌ترین علامت بالینی، آبریزش بینی یا رینوره بود که در ۹۶ درصد بیماران دیده شد و مشابه مطالعه‌ای است که در کشور کره انجام شده بود. شایع‌ترین نشانه با لینی تب بود که در ۶۸٪ بیماران دیده شده است. در مطالعه ما، بین عفونت با ویروس پارائفلوانزا و کروپ ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0/047$) و در مطالعه‌ای دیگر هم که در عربستان انجام شده بود ۶۰٪ موارد کروپ را پارائفلوانزا تشکیل داده بود.^{۱۰} در اغلب منابع دیگر هم ویروس پارائفلوانزا به عنوان شایع‌ترین علت کروپ ذکر شده است.^۴ در مطالعه ما مانند سایر مطالعات شایع‌ترین سن بروز پارائفلوانزا سن کمتر از سه سالگی بوده است.^{۱۱، ۱۰، ۵} ولی از نظر آماری ارتباط بین سن و عفونت ناشی از پارائفلوانزا بی‌معنی بوده است ($p=0/60$). در مطالعه ما میزان بروز عفونت در افراد مونث بیشتر بوده است به طوری که حدود ۷۲٪ در افراد مونث و



نمودار- ۱: درصد توزیع فراوانی نسبی سن در بیماران IFA منفی و مثبت

جدول- ۱: فراوانی نسبی علائم و نشانه‌ها در کل بیماران و بیماران IFA مثبت

ردیف	علائم و نشانه‌ها	فراوانی نسبی (درصد در کل بیماران)	فراوانی نسبی (درصد در بیماران IFA مثبت)
۱	فارنگوتانسیلیت	۳۴/۴	۴۰
۲	کونژکتیویت	۲۶	۲۰
۳	پنومونی	۴۲/۷	۳۶
۴	کروپ	۱۰/۴	۲۰
۵	برونشیت	۲۴	۱۲
۶	سرفه	۹۰/۶	۸۴
۷	رینوره	۸۹/۶	۹۶
۸	تاکی پنه	۵۵/۲	۴۴
۹	دیسترس تنفسی	۳۵/۴	۲۸
۱۰	تب	۶۲/۵	۶۸
۱۱	ویزینگ	۲۸/۱	۱۶
۱۲	کراکل	۲۷/۱	۲۴
۱۳	سیانوز	۶/۳	۴

۳۸ درجه سانتیگراد داشتند. سیانوز نادرترین یافته بود. جدول ۱ فراوانی نشانه‌های کلینیکی مختلف بیماری نشان داده شده است.

بحث

در مطالعه از مجموع ۹۶ نمونه بررسی شده، ۲۵ نمونه (۲۶٪) از نظر ویروس پارائفلوانزا IFA مثبت داشتند و در مطالعات مختلف، فراوانی عفونت‌های دستگاه تنفسی از پنج تا ۲۳ درصد گزارش شده است.^{۹-۷} از دلایلی که در توجیه این اختلاف‌ها می‌توان مطرح کرد، متفاوت بودن زمان و مکان مطالعه و روش‌های مختلف استفاده شده ذکر کرد. در مطالعه‌ای که در شیکاگو توسط George reed^۸ انجام شد از کشت ویروسی استفاده شد و شیوع عفونت با ویروس پارائفلوانزا

بی مورد دوری شود. اگرچه عفونت‌های ناشی از ویروس پارائنفلوآنزا خود محدود هستند و نیاز به درمان اختصاصی خاصی ندارند ولی با توجه به عوارض خطرناک آن که حتی گاهی به‌خصوص در افراد با نقص ایمنی باعث مرگ هم می‌شوند، بهتر است در این افراد پیشگیری با واکسن انجام شود. توصیه می‌شود مطالعات مشابه در سطح گسترده‌تر و طولانی‌تر انجام شود و همزمان از روش‌هایی مانند کشت و PCR هم استفاده شود.

سپاسگزاری: از زحمات آقای پوراکبری در مرکز تحقیقات بخش عفونی و پرسنل محترم بخش‌های اورژانس و عفونی بیمارستان مرکز طبی اطفال تشکر می‌شود.

۲۸٪ در افراد مذکر روی داده است. از نظر آماری هم بین جنس و عفونت ناشی از ویروس پارائنفلوآنزا ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0/003$). در مطالعه ما، بین عفونت با ویروس پارائنفلوآنزا و کروپ ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0/047$). با توجه به مطالعه‌ای که انجام شد و فراوانی حدود ۲۵ درصدی پارائنفلوآنزا در مرکز طبی، بهتر است مطالعات وسیع‌تر انجام شود تا بتوان نتایج را به کل کشور تعمیم داد. با توجه به سریع و آسان بودن روش IFA در تشخیص پارائنفلوآنزا، توصیه می‌شود این روش در اختیار پزشکان و کادر تشخیصی بیمارستان‌ها قرار گیرد تا با تشخیص سریع و به موقع، اقدامات درمانی لازم انجام شود و از اقدامات تشخیصی و درمانی

References

1. Piedra PA. Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical virology*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1997; 787-810.
2. Wright PF. Parainfluenza Viruses. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005; p. 1998-2001.
3. Hall CB. Parainfluenza Viruses. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editors. *Textbook of pediatric infectious disease*. 4th Ed. Philadelphia: WB Saunders; p. 2270-9.
4. Rittichier KK, Ledwith CA. Outpatient treatment of moderate croup with dexamethasone: intramuscular versus oral dosing. *Pediatrics* 2000; 106: 1344-8.
5. Wright PF. Parainfluenza Viruses. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson NB. *Nelson textbook of pediatric*. Philadelphia: WB Saunders; 2004; 1075-6.
6. Sonoda S, Gotoh Y, Bann F, Nakayama T. Acute lower respiratory infections in hospitalized children over a 6 year period in Tokyo. *Pediatr Int* 1999; 41: 519-24.
7. Stralioetto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 283-91.
8. Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old. *J Infect Dis* 1997; 175: 807-13.
9. Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK. Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 1054-9.
10. Bakir TM, Halawani M, Ramia S. Viral aetiology and epidemiology of acute respiratory infections in hospitalized Saudi children. *J Trop Pediatr* 1998; 44: 100-3.
11. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344: 1917-28.
12. Knott AM, Long CE, Hall CB. Parainfluenza viral infections in pediatric outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 269-73.

Immunofluorescence method in parainfluenza acute respiratory infection

Abstract

Mamishi S.¹
Kalantari N.^{*3}
Hashemi F. B.²
Khotaei G.¹
Siadati S.A.¹

1- Department of Pediatrics,
Division of Infectious Disease,
2- Department of Microbiology
3- Department of Pediatrics,

Markaz Tebbi Hospital
Tehran University of Medicine
Sciences.

Background: Acute respiratory tract infections, both bacterial and viral, cause 4.5 million childhood deaths worldwide, most of which occur in developing countries. Parainfluenza viruses, of the paramyxoviridae family, are among the common causes of acute respiratory infections, giving rise to 30% of respiratory infections in children before school age. The four parainfluenza viruses that cause a spectrum of respiratory illness in humans are designated as human para influenza virus-1 through 4. Spreading from the respiratory tract by aerosolized secretions or direct hand contact with secretions, parainfluenza viruses replicate in the respiratory epithelium without evidence of systemic spread. The destruction of cells in the upper airways can lead to secondary bacterial invasion and resultant bacterial tracheitis. Eustachian tube obstruction can lead to secondary bacterial invasion of the middle ear space and acute otitis media. In otherwise healthy children, the majority of illnesses remain in the upper respiratory tract. As with many viruses, three approaches to the diagnosis of parainfluenza virus are currently used: viral culture, detection of viral antigen or nucleic acid, and serologic analysis. The gold standard remains the isolation of virus in tissue culture.

Methods: This descriptive case-series study was conducted from January 2003 to January 2004, and included 96 children five years of age and younger. To determine the relative frequency of parainfluenza respiratory tract infection, the nasopharyngeal secretions were studied by immunofluorescent antibody (IFA) assay. Seasonal incidence, age distribution and clinical signs and symptoms of this infection were also recorded.

Results: Among our study group, the relative frequency of parainfluenza respiratory infection was 26%, most commonly in children aged 25-36 months and in autumn. Cough (84%) and rhinorrhea (96%) were the most common symptoms, with fever (68%) as the most common sign in our patients. Pharyngotonsillitis was the most common (40%) clinical manifestation in our patients.

Conclusions: According to above data, patient age and the frequency of parainfluenza infection were similar to other studies.

Keywords: Acute viral respiratory infection, parainfluenza, immunofluorescence antibody

* Corresponding author: Markaz Tebbi Hospital, Gharib St, Tehran.
Tel: +98-21-6640081
email: drN_kalantari@yahoo.com