مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۷۹-۷۴

شیوع گاستروانتریت حاد ناشی از انتریک آدنوویروس تیپ‌های Ad40 Ad41, در کودکان زیر ۵ سال، بستری در بیمارستان بهرامی تهران در سال‌های ۸۸-۱۳۸۷با روش PCR

مریم رضائی [۱] ، رزیتا عدالت[۲]، امیر سهرابی [۲]، سید داور سیادت [۳]، مهدیه معتمدی‌راد [۲]، جلیل وندیوسفی[۱]، شهاب مدرس گیلانی[۲]*

۱) گروه میکرب شناسی دانشکده علوم پایه ، دانشگاه آزاداسلامی، واحد کرج
۲) گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران ،تهران
۳)گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران
نویسنده رابط: شهاب مدرس گیلانی: گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران
تلفن:۰۲۱٤٤۲۱٦٤۲٥ **Mary_1486@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله:۸۸/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/٦/۱۷

چکیده:

زمینه واهداف: انتریک آدنوویروس‌های تیپ Ad40و Ad41 به‌عنوان دومین عامل گاستروانتریت حاد کودکان معرفی شده‌اند.این مطالعه به منظور تعیین اپیدمیولوژی مولکولی گاستروانتریت حاد ناشی ازانتریک آدنوویروس-های Ad40و Ad41 درکودکان زیر ۵ سال بستری در بیمارستان بهرامی تهران در سال ۸۸-۱۳۸۷انجام شد.

روش بررسی: از تابستان ۱۳۸۷ تا پایان بهار ۱۳۸۸ جمعا ۱۰۰ نمونه مدفوع از کودکان زیر ۵ سال، که با علایم بالینی گاستروانتریت حاد در بیمارستان بهرامی تهران بستری بودند، جمع آوری شد. بااستفاده از کیت استخراج DNA، ژنوم ویروسی نمونه‌ها استخراج شد. سپس به کمک پرایمر های اختصاصی و با روش PCR جنس و تیپ انتریک آدنوویروس های Ad40و Ad41 شناسایی شدند.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه مدفوع، ۸ نمونه (۸٪) ازنظر انتریک آدنوویروسAd40 و Ad41 مثبت شدند. بیشترین موارد مثبت در کودکان گروه سنی کمتراز۲٤ ماهگی ،٦ مورد (۷۵٪) بود. تعداد موارد مثبت در دختران ٥ مورد (٦۲.٥٪)و در پسران ۳ مورد (۳۷.٥٪)مشخص شد. بیشترین موارد مثبت در فصل زمستان ۳ مورد(۳۷.٥٪)، بیشترین موارد مثبت در کودکان تغذیه شده با شیرخشک ٥ مورد (٦۲.٥٪) و کمترین موارد در کودکان تغذیه شده با شیر مادر ۱ مورد (۱۲.٥٪) بود.

نتیجه گیری: با انجام روش‌های تشخیص مولکولی، با حساسیت و ویژگی بالا، می‌توان گام موثری درتشخیص این عوامل برداشت تا بتوان راهکارهای مناسبی را اتخاذ کرد

کلید واژه‌ها: اپیدمیولوژی مولکولی، آدنوویروس ، گاستروانتریت حاد ، PCR

مقدمه:

آدنوویروس‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل اتیولوژیک شایع گاستروانتریت‌های حاد در کودکان زیر ۵ سال در سراسر جهان، به‌ویژه کشورهای در حال توسعه، شناخته شده‌اند. انتریک آدنوویروس‌های تیپ Ad40وAd41، بعد از روتاویروس ها، به‌عنوان دومین عامل گاستروانتریت حاد کودکان معرفی شده‌اند. به‌طوریکه بیش از ۱۵٪ گاستروانتریت‌های ویروسی کودکان را تشکیل می دهند (۱، ۲). به‌طور کلی بعد از روتاویروس‌های گروه A ، در حد پایین تری انتریک آدنوویروس‌های تیپ ٤٠ و ٤١ و دیگر عوامل ویروسی به‌عنوان عوامل مهم گاستروانتریت حاد کودکان در سراسر جهان مطرح هستند (٥-٣). با استناد به نتایج مطالعات انجام گرفته، شیوع عفونت‌های آدنوویروسی متغیر است. در کشورهای صنعتی، شیوع ویروس ۱٪ تا ۸٪ است در حالیکه در کشورهای در حال توسعه از ۲٪ تا ۳۱٪ تغییر می کند (۳). آدنوویروس‌های انسانی (Human Adenoviruses : HAdvs) ابتدا به عنوان مشکل مهم درافراد مبتلا به اختلال ایمنی (mmunocompromised) که عفونت‌های نهفته داشتند و باعث بیماری‌های منتشره مهلک می شدند ، شناسایی شدند. HAdVs طیف وسیعی از سندرم‌های بالینی را باعث می شوند. آدنوویروس‌ها می‌توانند بر سیستم‌های گوارشی، تنفسی، ادراری و چشم اثر بگذارند و غالباً از گلو و مدفوع کودکان فاقد علائم بیماری نیز جدا شده‌اند . انتقال HAdVs از راه‌های مختلف صورت می گیرد. تماس شخص به شخص و مدفوعی-دهانی از مهم-ترین راه‌های انتقال می باشد. HAdVs بسیار مسری هستند و شیوع محلی متداول دارند (٦). آدنوویروس‌ها در ۷ گونه A-G ، که شامل ٥٤ سروتایپ هستند ، طبقه بندی می شوند (٥). در بیماران مبتلا به AIDS ، گاستروانتریت مربوط به سروتایپ D بوده است. در حالی که در بیماران مبتلا به اختلال ایمنی گاستروانتریت به تایپ های $A_{٣١}$ ، $C_{٢}$ ،$F_{٤}$ و $F_{٤١}$ مربوط می شود(٦). انتریک آدنوویروس‌ها از عوامل مهم اتیولوژیک مربوط به عفونت-های اسپورادیک و بروز گاستروانتریت حاد در کودکان زیر۵ سال درسراسر دنیا می باشند که عفونت غالب بین گروه سنتی ٢٤-٦ ماهگی گزارش شده است (۷). در ایران به‌خصوص در تهران مطالعه اپیدمیولوژیک مولکولی جامع صورت نپذیرفته است. در این زمینه دو مطالعه سرو اپیدمیولوژیک توسط مدرس و صادری انجام گرفته که نشان دهنده شیوع تقریبا ۷٪ تا ۸٪ انتریک آدنوویروس ها در تهران می باشد (۸). این مطالعات ، شیوع زیاد آدنوویروس‌های روده‌ای را در جامعه ایران نشان داد. به همین دلیل تحقیقات بیشتر چه در زمینه اپیدمیولوژی و چه طراحی روش‌های سریع و مؤثر ضروری به نظر می رسد. هدف از انجام این مطالعه تعیین اپیدمیولوژی مولکولی گاستروانتریت حاد ناشی ازانتریک آدنوویروس‌های تیپ Ad40وAd41 درکودکان زیر ۵ سال بستری در بیمارستان بهرامی تهران به روش PCR بود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی- مقطعی Cross-Sectional به روش تصادفی ساده ، ۱۰۰ نمونه مدفوع از کودکان زیر۵ سال بستری در بیمارستان کودکان بهرامی تهران جمع‌آوری شد. تمام کودکان به تشخیص پزشک متخصص علائم بالینی گاستروانتریت حاد داشتند. مشخصات بیماران از جمله جنس، سن و علائم بالینی شامل تعداد دفع در روز، وجود تهوع و یا استفراغ ، تب ، درد شکم ، علائم تنفسی و نوع تغذیه در پرسشنامه تهیه شده ثبت و رضایت نامه از والدین بیماران اخذ گردید. در پرسشنامه‌ها بیماری‌های زمینه‌ای و پس زمینه‌ای خاصی (نقص سیستم ایمنی , ...) ذکر نشده بود. انتقال نمونه‌ها از طریق ظروف پلاستیکی مخصوص نمونه‌گیری و در دمای سرد (با استفاده از یخ خشک) و در اسرع وقت به آزمایشگاه ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در شرایط استاندارد (یخچال 20'c-) نگهداری شدند. برای وجودارتباط معنی دار بین متغیرهای فردی(سنی و جنسی ، تغذیه ، فصلی و شدت دهیدراتاسیون) با وجود آدنوویروس روده‌ای تیپ , Ad40, Ad41ازآزمون استقلال (test of independence) و مربع کای استفاده شد. آزمون‌ها درسطح معنی داری ۰/۰۵ انجام شدند.

- استخراج DNA ویروسی :

استخراج DNA ، توسط کیت استخراج QlAamp DNA stool (شرکت کیاژن) طبق دستورالعمل کیت انجام شد .

-Polymerase Chain Reaction (PCR) :

DNA نمونه‌های استخراج شده یکبار با پرایمر ساخته شده(۹) اختصاصی گروه آدنوویروس‌ها (محصول شرکت

آرمین طب)، تحت آزمایش PCR قرار گرفت. نمونه‌های مثبت مرحله اول بار دیگر با پرایمر طراحی شده اختصاصی گروه F آدنوویروس‌ها ، جهت تعیین تایپ‌های ٤٠ و ٤١، PCR شدند (جدول ١). واکنش PCR در حجم نهایی ٢٥µl انجام گرفت. هر لوله در هر ٢ مرحله PCR، به طور کامل حاوی λ Master 2x١٢/٥ λ ، ١ از هر پرایمر (10µM) و λ ٠/٢ آنزیم Taq Polymerase (5u/ul) (Fermentase) و λ ٥/٣ d.H2O و λ ٥ DNA نمونه استخراج شده بود.

جدول ١ : پرایمرهای طراحی شده اختصاصی گروه F آدنوویروس‌ها، جهت تعیین تایپ‌های ٤٠ و ٤١

Species	Primer	Gene	Position	Sequence (5´ → 3´)	Amplicon
A to F	Ad1	Hexon	1834–1853	TTCCCCATGGCICAYAACAC	482
A to F	Ad2	Hexon	2315–2296	CCCTGGTAKCCRATRTTGTA	482
F	AdF1	Fiber	1734–1754	ACTTAATGCTGACACGGGCAC	541–586
F	AdF2	Fiber	2274–2253	TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC	541–586

برنامه PCR برای تعیین گروه آدنوویروس‌ها به‌صورت ذیل بود: دناتوراسیون اولیه به مدت ٥ دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتی گراد و سپس برای هر چرخه ٣ بخش به شرح ذیل در نظر گرفته شد: بخش اول، دناتوراسیون در ٩٤ درجه سانتی گراد به مدت ٥٠ ثانیه، بخش دوم آنیلینگ پرایمرها در دمای ٥٨ درجه سانتی گراد به مدت ٥٠ ثانیه و بخش سوم طویل سازی در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد و به مدت ٥٠ ثانیه. این مراحل ٣٠ بار تکرار شد. مرحله طویل سازی نهایی در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد و به مدت ٥ دقیقه انجام گرفت. برای تعیین تیپ گروه F آدنوویروس‌ها برنامه نظیر برنامه آدنوویروس بود با این تفاوت که آنلینگ پرایمرها دردمای ٥٦ درجه سانتی گراد به مدت ٥٠ ثانیه انجام شد و مرحله طویل سازی در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد به مدت ١ دقیقه بود. برای آشکارسازی نتایج واکنش PCR از ژل آگارز ٪١/٥ با ولتاژ ١٠٠ v استفاده شد. نتایج با ترانس لومینیاتور مشاهده گردید. همچنین از بین نمونه‌های مثبت اعلام شده ٥ نمونه که باندهای بهتر داده بودند، انتخاب و بعد از آماده سازی برای تعیین توالی به شرکت فزا پژوه فرستاده شدند. بعد از ویرایش نمونه‌های سکانس شده با نرم افزار Bio Edit و BlAST نتایج بررسی شدند. نمونه‌های تعیین توالی شده در بانک جهانی ژن نیز ثبت شدند.

یافته‌ها:

از ١٠٠ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد، ٨ نمونه (٨٪) از نظر انتریک آدنوویروس Ad40وAd41 مثبت شدند(شکل ١). بیشترین موارد مثبت در کودکان گروه سنی کمتراز٢٤ ماهگی ، ٦ مورد (٧٥٪) بود(جدول ٢). تعداد موارد مثبت در دختران ٥ مورد (٦٢.٥٪) و در پسران ٣ (٣٧.٥٪) مورد بود . بیشترین موارد مثبت در فصل زمستان ٣ مورد (٣٧.٥٪) بود. با توجه به نوع تغذیه کودکان (شیر مادر و شیر خشک)، بیشترین موارد مثبت در کودکان تغذیه شده با شیر خشک ٥ مورد (٦٢.٥٪)و کمترین موارد در کودکان تغذیه شده با شیر مادر (١ مورد ١٢.٥٪) بود. در ٥٠ ٪ نمونه‌های مثبت (٤ مورد)، دهیدراتاسون خفیف گزارش شد.

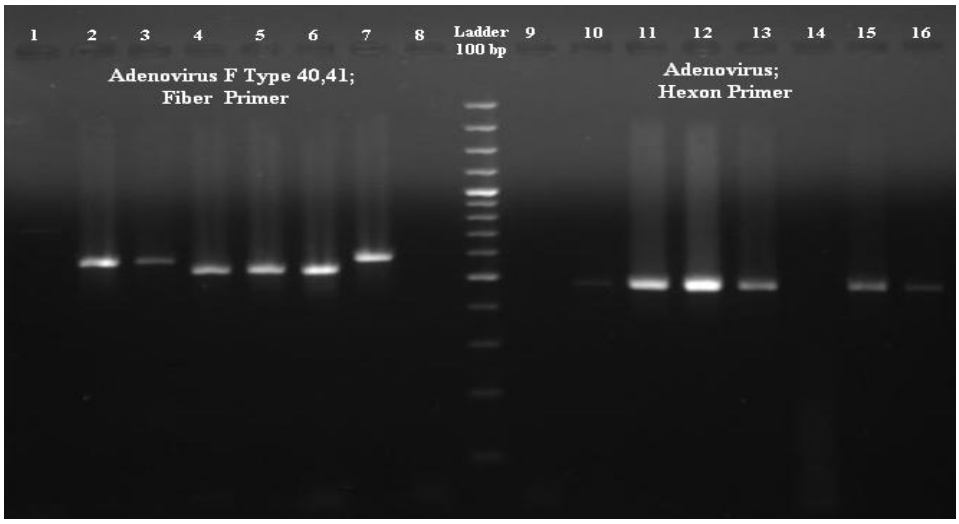
٥ نمونه ارسال شده برای تعیین سکانس ، BLAST شدند، ١ نمونه Ad40 و بقیهAd41 گزارش شد . شماره های ثبت شده در بانک جهانی ژن(NCBI / Pub MED) به شرح ذیل می‌باشد :

GU245891,1- GU245892,1- GU245893,1
GU245890,1 - GU245889,1-_

بین متغیرهای سن و تغذیه با وجود عفونت آدنوویروسی ارتباط معنی دار مشاهده گردید ($p<0.05$) بین دیگر متغیرهای فردی و وجود عفونت ادنوویروسی ارتباط آماری معنی دار مشاهده نشد.

جدول ۲ : عفونت آدنوویروسی در کودکان مبتلا به گاستروانتریت حاد به تفکیک گروه‌های سنی

سن (ماه)	مثبت	منفی	جمع
٦-٠ ماهگی	٠	٤	٤
١٢-٦ ماهگی	٣	٢٧	٣٠
٢٤-١٢ ماهگی	٢	٢١	٢٣
٣٦-٢٤ ماهگی	١	١٣	١٤
٤٨-٣٦ ماهگی	١	١٦	١٧
٦٠-٤٨ ماهگی	١	١١	١٢
جمع	٨	٩٢	١٠٠



شکل ۱: نتایج حاصل از PCR

سمت راست : نمونه‌های PCR شده با پرایمرهای Ad1 و Ad2 برای تشخیص آدنوویروس.

سمت چپ : نمونه‌های PCR شده با پرایمرهای AdF1 و AdF2 برای تشخیص گروه F آدنوویرو س‌ها

بحث:

در مطاالعه حاضر ۸٪ گاستروانتریت‌های حاد کودکان ناشی از انتریک آدنوویروس بود. غالب بودن تیپ ٤١ بر ٤٠ مشهود است. نتیجه حاضر با نتایج مطالعات مشابه نظیر مطالعه بالی و همکاران در تونس (٢٠٠٩)، ورما و همکاران در استرالیا(٢٠٠٢) و لی در آسیا(٢٠٠٤)، که به علت تغییرات آنتی ژنیک حادث گردید، با غالب بودن تیپ ٤١ بر ٤٠ مطابقت دارد (١٠و١١).

به طور کلی گاستروانتریت حاد ، بعد از عفونت‌های تنفسی حاد ، از جمله بیماری‌های متداول عفونی گزارش شده-است. علت بسیاری از بیماری‌های گاستروانتریت هنوز به خوبی تشخیص داده نمی شوند. چون برای تشخیص آنها به‌طور دقیق روش متداولی در دسترس نیست. در سال‌های اخیر انتریک آدنوویروس‌ها، روتاویروس‌ها، کالسی ویروس‌ها و آستروویروس‌ها به صراحت در ارتباط با گاستروانتریت‌ها در کودکان مطرح می‌باشند (١٠).

گاستروانتریت حاد یک مشکل بهداشت جهانی است و یک عامل مهم بیماری و مرگ و میر در دوران کودکی در سراسر جهان گزارش شده‌است . تقریبا ۱/۷٦ میلیون مرگ در اثر گاستروانتریت در کودکان زیر ۵ سال در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته اتفاق افتاده است. . براساس این مطالعه ، بیشترین موارد مثبت عفونت در گروه سنی کودکان پایین تر از ۲٤ ماهگی با شیوع ۷۵ درصد در جمعیت مثبت تعیین گردید. مطالعات انجام شده در کشورهای در حال توسعه هم تقریبا توزیع سنی مشابهی را گزارش کرده‌اند (۱٦-۱۲).

با توجه به اهمیت موضوع روش‌های تشخیصی از اهمیت ویژه برخوردارند. روش‌های تشخیص گاستروانتریت آدنوویروسی از قبیل کشت سلول، الیزا و ...چندان دقیق وخالی از اشکال نیستند (۱۷، ۱۸). چون حساسیت و برتری روشPCR نسبت به دیگر روش‌ها، برای شناسایی انتریک آدنوویروس‌ها مشخص شده‌است ،از این روش استفاده شد (۹، ۱۹). همان طور که می‌دانیم PCR در شناسایی DNAی ویروسی شامل سرعت بالا ، حساسیت ، توانایی شناسایی ویروس‌های مرده و حذف اثرات سمی نمونه‌ها و نیز حذف اثر آلودگی‌های باکتریایی است (۱۹). به‌علاوه، ثابت شده است که PCR در شناسایی آدنویروس‌های گوارشی، نسبت به کیت‌های تجاری و در دسترس ایمنی سنجی آنزیم و جداسازی آدنوویروس‌ها، حساس‌تر است (۲۰، ۲۱). کیت‌های تجاری در دسترس از قبیل ELISA و ایمونوکروماتوگرافی قابلیت تمایز تیپ Ad40 و Ad41 را ندارند (۱۹).

پرایمرهای مورد استفاده به نحوی طراحی شده بودند که تنها همین دو آدنوویروس تیپ ٤۰ و آدنوویروس تیپ ٤۱ را شناسایی کنند و دیگر آدنوویروس‌ها را شناسایی نکنند. اگر چه روش‌های زیادی برای شناسایی آدنوویروس‌ها وجود دارد، اما این روش‌ها تمام سویه‌های آدنوویروسی را با هم شناسایی می کنند. لذا، برای شناسایی هر سویه به تنهایی به بررسی با آنزیم‌های محدود کننده نیاز است. از آنجایی که تنها آدنوویروس‌های روده‌ای هستند که ارتباط معنی‌دار با گاستروانتریت کودکان نشان می دهند، به لحاظ بالینی حائز اهمیت است که آنها را با دقت بالا و در حداقل زمان شناسایی کنیم. از آنجا که هر دو، آدنوویروس تیپ ٤۰ و آدنوویروس تیپ ٤۱ ، به لحاظ بالینی یکسان تلقی می‌شوند نیازی به تشخیص مجزای آنها نیست.

در این مطالعه ٦۲.۵ درصد موارد مثبت عفونت در دختران و ۳۷.۵ درصد در پسران بود. مطالعه مشابه دوگان و همکاران در سال۲۰۰۰ برتری جنسیتی دختر به پسر با نسبت ۵ به ۱ را نشان داده است. اما در دیگر مطالعات و همچنین در مطالعه انجام شده این طرح، برتری جنسی یا نژاد خاص به طور مطلق ذکر نشده است. در تجزیه و تحلیل آماری مطالعه حاضر مانند سایر مطالعات (۲۲)نیز ارتباط معنی داری بین متغیر جنس و وجود عفونت انتریک آدنوویروس‌ها مشاهده نشد . بیشترین موارد مثبت گاستروانتریت کودکان در ماه‌های سرد و معتدل سال بود (زمستان ۳۷.۵ درصد). اما در مطالعات انجام شده در دیگر مناطق بر اساس شرایط اقلیمی متفاوت میزان شیوع در فصول مختلف متغیر بوده است. (۲۲). اما آنچه مشخص شده است در همه مطالعات انجام گرفته ارتباط آماری معنی داری بین فصل و میزان شیوع عفونت انتریک آدنوویروس گزارش نشده‌است (۵). به عبارتی عفونت آدنوویروسی زیرگروه F در همه فصول می‌تواند روی دهد. سرانجام، در مطالعه حاضر بیشترین موارد گاستروانتریت در کودکان تغذیه شده با شیر خشک(٦۲.۵ درصد) و کمترین موارد درکودکانی که با شیر مادر تغذیه نموده بودند (۱۲.۵درصد) مشاهده گردید. احتمالاً آنتی بادی منتقله از مادر نقش حفاظتی مهمی در برابر ابتلاء به اسهال آدنوویروسی دارد. در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین نوع تغذیه کودک و بروز عفونت آدنوویروسی مشاهده شد ($P<0.05$).

نتیجه گیری :

البته مطالعه حاضر با محدودیت هایی از جمله محدودیت مالی (جهت تعیین توالی بیشتر نمونه‌ها) مواجه بود. این مطالعه بر اهمیت عفونت‌های گاستروانتریت حاد کودکان، ناشی از انتریک آدنوویروس‌ها، تاکید می‌کند. مطالعات اپیدمیولوژیک و اطلاعات منطقه‌ای انتریک آدنوویروس‌ها می تواند در ساخت واکسن مناسب راهگشا باشد. استفاده از روش‌های سریع مولکولی آزمایشگاهی، برای تشخیص صحیح و سریع سروتیپ‌ها و جلوگیری از مصرف غیرضروری آنتی بیوتیک‌ها، باید مد نظر قرار گیرد. به-علاوه، فراموش نشود که رعایت اصول بهداشتی به طور قابل ملاحظه‌ای در کاهش این دسته از عفونت‌ها موثر است.

فهرست مراجع:

1. Walls T,Shankar AG,Shingadia D. Adenovirus:an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 2003**;3:**79-86.
2. Gu Z,Belzer SW,Gibson CS,Bankowski MJ,Hayden RT.multiplexed,real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. J *Clin Microbiol* 2003; **41**: 4636-4641
3. Carraturo A, Catalani V, Tega L. Microbiological and epidemiological aspects of Rotavirous and enteric adenovirous infections in hospitalized children in Italy. *New Microbialogica* 2008 ;**31**:329-336
4. Logan C, O'Leary j, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:3189-3195
5. Fukuda S, Kuwayama M, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K. Molecular epidemiology of subgenus F adenoviruses associated with pediatric gastroenteritis during eight years in Hiroshima Prefecture as a limited area. *Arch Virol* 2006;**151**: 2511–2517
6. Magwalivha M, Wolfaardt M, M. Kulia N, B.Van Zyl W, M.Mwenda J, B. Taylor M . High Prevalence of species D Human Adenoviruse in Fecal specimens from urban Kenyan children with diarrhea. *J Med Virol* 2010; **82**:77-84
7. Verma H, D.Chitambar Sh, Varanasi G . Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis . *J Med Virol* 2009;**81**:60-64
8. Saderi H, Roustai MH, Sabahi F, Sadeghizadeh M, Owlia P, De Jong JC. Incidence of enteric adenovirus gastroenteritis in Iranian children: *J clini virol* 2002 ; **24**: 1-5.
9. Wanhong Xu , C.Mcdonough M , D.Erdman D . Species specific identification of human Adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(1): 4114-4120
10. Grimwood K, Carzino R, Barnes GL, Bishop RF. Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 131–136
11. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, *et al* . Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 2005;**49**: 121–128
12. Boga JA, Mel´on S, Nicieza I, de Diego I,Villar M, Parra F, *et al*. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2668–2674
13. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, Pothier P, *et al* .Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 3055–3058
14. De Jong JC, Bijlsma K,Wermenbol AG,Verweij-Uijterwaal MW, Van DerAvoort HGAM, Wood DJ, *et al.* Detection, typing, and subtyping of enteric adenoviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidences of infections with these types and subtypes. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1562–1569
15. Jarecki-Khan K, Tzipori SR, Unicomb LE . Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 484–489
16. Kim KH, Yang JM, Joo SI, Cho YG, Glass RI, Cho YJ. Importance of rotavirus and adenovirus types 40 and 41 in acute gastroenteritis in Korean children. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 2279–2284
17. Cooper RJ , Yeo AC, Bailey AS , Tullo AB. Adenovirus Polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of conjunctivitis . *IOVS* 1999;**40**(1) : 90-95
18. Scott-taylor T ,Ahluwalia G,Klisko B,W.Hammond G. Prevalent enteric adenovirus variant not detected by commericial monoclonal antibody enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990; **28** (12) : 2797-2801
19. Li L, Shimizu H, Doan LTP, Phan TG, Okitsu S, Nisho O , *et al* . Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea . *J Clin Microbiol* 2004;**2**: 4032– 4039
20. Sdiri-Loulizi Kh, Gharbi-Khelifi H , Rougemont A, Hassine M, Chouchane S, Sakly N, *et al* . Molecular epidemiology of Human Astrovirus and Adenovirous serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. *J Med.Virol* 2009;**81**:1895-1902
21. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of Adenovirusesin stool samples. *J Clin Microbiol* 1990; **28**(12): 2659–2667