تحديد الانواع الوراثية [P] و G لفيروس روتا الانسان في اطفال محافظة بابل باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي conventional – PCR

يونس عبد الرضا
كلية طب الاسنان–جامعة بابل
younis_1953@yahoo.com

حوراء جواد كاظم
كلية العلوم للبنات–جامعة بابل
mobalqaswar@yahoo.com

الخلاصة

استعملت في هذه الدراسة تقنية الشريط السريع و تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس التقليدي (conventional reverse transcriptase – PCR) بغية معرفة الأنواع الوراثية لفيروس الروتا في عينات براز أخذت من أطفال مخمجين من مناطق متفرقة في محافظة بابل , أظهروا بعض الأعراض المُميزة لالتهاب المعدة والأمعاء الحاد مثل الإسهال والحمى والتقيؤ للمدة من تشرين الأول و تشرين الثاني و كانون الأول من العام 2011 وكانون الثاني و شباط و آذار من العام 2012 , تراوحت أعمارهم من 0– 60 شهراً, إذ اختبر 470 انموذجا من عينات براز الاطفال باستعمال الشريط السريع , وبعدها اخذ 80 نموذجا اعطى نتيجة موجبة باستعمال الشريط السريع لمعرفة الانواع الوراثية السائدة وباستعمال بوادئ خاصة Specific primers للأنواع الوراثية [P] و G وبعد استخلاص الحامض النووي الريبي RNA لفيروس الروتا من النماذج وتحويله إلى الدنا المتمم complementary DNA وجد أن أكثر الأنواع الوراثية المشخصة من النوع G انتشاراً في المحافظة هي G1 و G4 و G2 و G8 , بينما لوحظ أن الأنواع P[8] و P[4] و P[6] هي الأكثر انتشاراً بالنسبة للنوع الوراثي [P] .

الكلمات المفتاحية :– الاسهال الفيروسي , فيروس الروتا , فحص الشريط السريع وفحص تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي .

Abstract

Rapid test device technique and conventional - PCR technique was used in this study for detection of rotavirus genotypes in stool samples which were collected from children who were living in different area of Babylon governorate with symptoms of acute gastroenteritis such as diarrhoea , fever and vomition for the period from October 2011 to March of 2012 , Their age range from 0 – 60 months , 470 diarrhoea stools sample from children was tested by using rapid stripe , then 80 sample which gave positive result by rapid test device were used to know G and [P] type by using specific G and [P] primer .After extraction of viral RNA and its convertion to cDNA . The results detected that the prevalent G – genotypes was G1 , G4 , G2 and G8 respectively , whereas P[8] , P[4] and P[6] was the most dispersal P – genotypes .

Keywords : Viral gastroenteritis , Rotavirus , Rapid test device , RT- PCR test .

المـقدمة

يُعد التهاب المعدة والامعاء الحاد المشكلة الثانية التي تتسبب بوفاة العديد من الاطفال سنويا بعد إصابات المنطقة التنفسية السفلى في كل من الدول النامية والمتطورة للأطفال دون سن 5 سنوات , وعلى الرغم من نجاح خدمات الصحة العامة والرقابة الصحية الحالية في تعقيم المياه والسيطرة على مياه الصرف الصحي الا انها غير قادرة على الحد من مرض الاسهال , إذ اوضحت العديد من الدراسات الحديثة ان امراض الاسهال مسؤولة عن 17 % من وفيات الاطفال دون سن 5 سنوات في جميع انحاء العالم (Mathers *et al.*, 2009;Black *et al.*, 2010).

توجد هنالك العديد من المسببات المرضية التي تصيب المعدة والامعاء منها مسببات بكتيرية , فيروسية وطفيلية , يمثل فيروس الروتا المسبب المرضي الاكثر شيوعا من بين المسببات الفيروسية في احداث التهاب المعدة والامعاء , ويتسبب هذا الفيروس بحوالي 39 % من حالات الاسهال المائي الحاد (Levy *et al.*, 2009).

ينتمي فيروس الروتا الى عائلة *Reoviridae* ويتميز بجزيئته غير المغلفة المنشورية التركيب, التي تتكون من ثلاث طبقات من البروتين المحيطة بـ 11 قطعة من الحامض النووي الريبي المزدوج الخيط dsRNA , إذ تتألف المحفظة الخارجية للفيروس من البروتين الحساس لإنزيم البروتيز Protease وهو البروتين الفيروسي الرابع VP4 والذي يحدد النوع الوراثي P – Genotype والبروتين السكري Glycoprotein وهو البروتين الفيروسي السابع VP7 والذي يشير الى النوع الوراثي G – Genotype (Pesavento *et al.*, 2006) .

يُشخص فيروس الروتا باستعمال العديد من التقنيات مثل فحص تلازن اللاتكسLAT و المجهر الالكتروني EM , إختبار الإمتزاز المناعي المُرتبط بالإنزيم ELISA , الانتشار في هلام الاكريلامايد ومتعدد الاكريلامايد Acrylamide and polyacrylamide gel diffusion , الزراعة النسيجية Tissue culture . اخيرا اعتمدت تقنيات اكثر حداثة تتمثل باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس – الوقت الحقيقي (تفاعلات الكوثرة) Real Time – polymerase chain reaction technique وكذلك تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المألوف (تفاعلات الكوثرة) Conventional polymerase chain reaction technique (الخفاجي وأبو المعالي ,2013) .

أظهرت العديد من الدراسات الوبائية التي اجريت في العراق أن فيروس الروتا هو احد المسببات الرئيسة لالتهاب المعدة والامعاء في الاطفال دون سن الخامسة و التي تراوحت النسب فيها من 18.5 % في تكريت , 24 % في البصرة , 30 % في بغداد و 37 % في اربيل (Mahmood and Feachem, 1987;Ahmed *et al.*, 2006;Alrifai *et al.*, 2009;Abdulrazzaq *et al.*, 2011) .

المواد وطرائق العمل

العينات

جُمعت 470 عينة براز من الأطفال الراقدين والمراجعين في مستشفى بابل للولادة والأطفال ، مستشفى الكفل العام ، مستشفى المحاويل ومستشفى الهاشمية المصابين سريرياً بالإسهال وللفترة من تشرين الأول 2011 الى شباط 2012 ، وُضعت العينات في أنابيب اختبار بلاستيكية معقمة سعة 5 مللتر وحفظت في المجمدة تحت درجة حرارة –60 م لحين إجراء الفحوصات المطلوبة .

اختبار الشريط السريع One Step Rotavirus Test Device

أُخضع 470 نموذجا من براز الاطفال المصابين بالاسهال للفحص باستعمال عدة الكشف عن فيروس الروتا المزودة من شركة (ACON) الألمانية وقد اجريت طريقة العمل حسب تعليمات الشركة المصنعة .

استخلاص الحمض النووي (الرنا)

استخلص الحامض النووي (الرنا) من عينات براز الاطفال المحفوظة في الثلاجة باستعمال عدة استخلاص الحامض النووي الرنا (IQeasy™ plus Viral DNA / RNA Extraction kit) المزودة من شركة (INtRON Biotechnology) الاميركية وقد اجريت طريقة العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة .

معرفة النوع الوراثي G و[P]

أُخذت 80 عينة من العينات التي اعطت نتيجة موجبة باستعمال فحص الشريط السريع لمعرفة الانواع الوراثية G و [P] السائدة في المحافظة

١ – تحديد النوع الوراثي [P] باستعمال بوادئ متخصصة

تتضمن هذه الخطوة مرحلتين هما :

المرحلة الاولى : تتضمن تحويل الرنا الفيروسي إلى الدنا المتمم cDNA باستعمال عدة تحويل (الرنا) الى (الدنا المتمم) وبوجود البادئ (ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC)الخاصة ب (con2 R) والبادئ (TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A) الخاص ب (con3 F) إذ اجريت طريقة العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة . بعدها حُضر هلام الاكاروز بتركيز 2 % ورحل الناتج في الهلام بوجود الواسم الدليل (المعلم) في إحدى الحفر (100 bp DNA ladder) في جهاز الترحيل الكهربائي وبدأت عملية الترحيل لمدة ساعة وبفولتية مقدارها 100 فولت و قُرئت النتيجة باستعمال جهاز انبعاث الأشعة فوق البنفسجية UV transiluminator للتقصي عن وجود قطعة المورث التي تشفر للـ VP4 والتي يبلغ طولها (876 bp).

المرحلة الثانية: تتضمن معرفة الأنواع الوراثية للـ VP4 والمتضمنة [P[4 و [P[6 و [P[8 , [P[9 و [P[10 إذ اجريت طريقة العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة .

2 – تحديد النوع الوراثي G باستعمال بوادئ متخصصة

تتضمن هذه الخطوة مرحلتين هما :

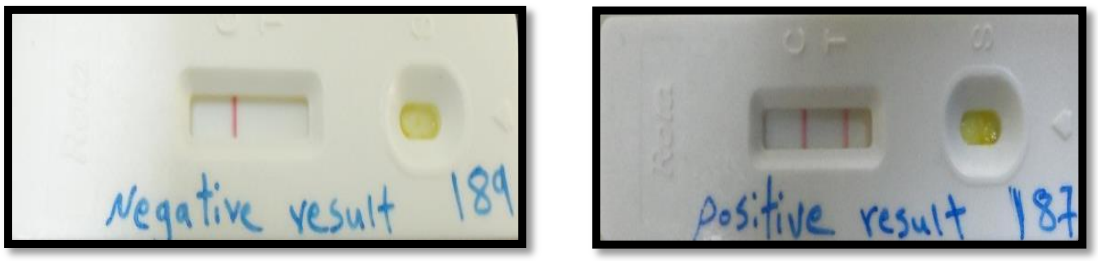
المرحلة الاولى : تتضمن تحويل الرنا الفيروسي إلى الدنا المتمم Cdna باستعمال عدة تحويل (الرنا) الى (الدنا المتمم) بوجود البادئ (GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G)الخاصة ب (Beg 9⁄ F) والبادئ (GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG) الخاص ب (End 9⁄ R) إذ اجريت طريقة العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة . بعدها حُضر هلام الاكاروز بتركيز 2 % ورحل الناتج في الهلام حسب طريقة العمل المذكورة في التعرف على النوع الوراثي [P] للتقصي عن وجود قطعة المورث التي تشفر للـ VP7 والتي يبلغ طولها (1062 bp) .

المرحلة الثانية: تتضمن معرفة الأنواع الوراثية للـ VP7 والمتضمنة G1 و G2 و G3 و G4 و G8 و G9 و G12 إذ اجريت طريقة العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة .

النتائج

- **نتائج اختبار الشريط السريع**

أظهرت نتائج فحص 470 انموذج براز مأخوذة مباشرة من الاطفال المصابين بالإسهال باستعمال فحص الشريط السريع ايجابية لـ 224 انموذج و بنسبة مقدارها 47.65 % وكما هو موضح في الشكل (١) .



(أ) (ب)

شكل (١): – أ – يظهر نتيجة موجبة لفحص الشريط السريع , – ب – يظهر نتيجة سالبة لفحص الشريط السريع .

- **التعرف على النوع الوراثي (G – genotype)**

بعد التحري تجريبيا عن درجة الحرارة المثلى للتبريد باستعمال نظام Gradiant PCR وكما هو موضح في طريقة العمل وباستعمال درجات حرارة من (55 – 70) , وجد أن الدرجة الحرارية المثلى التي تستطيع عندها البوادئ بإعادة الارتباط هي 60 م في المرحلة الأولى من التضخيم وباستعمال البوادئ (Beg9 و End9) التي ثبتتها منظمة الصحة العالمية والخاصة بالبروتين الفيروسي السابع والذي يشير إلى النوع الوراثي G .

أما درجة الحرارة المثلى في المرحلة الثانية من تفاعل البلمرة المتسلسل والمتضمنة معرفة الأنواع الوراثية للـ VP7 فقد كانت 57 م إذ كُشف عن ستة أنواع وراثية . إذ وجد أن النوع الوراثي G1 هو الأكثر تواجد وبنسبة 30 % يليه G4 والذي ظهر بنسبة 7.5 % بينما تواجد النوع الوراثي G2 بنسبة 12.5 % , وتمثلت الأنواع الوراثية G8 وG3 و G9 بنسب 6.25 % و 3.75 % و 1.25 % على التوالي ، و أظهرت نتائج الدراسة بعض النماذج المُرَحّلة التي لم تظهر انتماءها إلى أي نوع وراثي من الأنواع المذكورة أعلاه وسجلت على أنها نماذج غير مشخصة النوع الوراثي والتي بلغ عددها 23 انموذجا من أصل 80 انموذجا والتي مثلت نسبة 28.75 % , وعكست النتائج أيضا وجود خمسة نماذج مرضية تظهر خمجا مختلطا بالأنواع الوراثية G4 وG9 وكما مبين في الجدول (1) .

جدول (1) : الأنواع الوراثية الخاصة بالبروتين الفيروسي السابع والمعروفة بـ G باستعمال فحص تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي Conventional – PCR .

النوع G	اسم البادئ	العدد	النسبة المئوية
G1	aBT1	24	% 30
G2	aCT2	10	% 12.5
G3	G3-Aust	3	% 3.75
G4	aDT4	14	% 17. 5
G8	aAT8	5	% 6.25
G9	G9 or Mg9	1	% 1.25
غير مشخصة		23	% 28.75

- **التعرف على النوع الوراثي (P – genotype)**

وعند التحري عن الدرجة الحرارية المثلى للتبريد باستعمال نظام Gradiant PCR وكما موضح في طريقة العمل وباستعمال درجات حرارة من 45 الى 60, وجد أن الدرجة الحرارية المثلى التي تستطيع عندها البوادئ بإعادة الارتباط هي 50 م في المرحلة الأولى من التضخيم وباستعمال البوادئ con2 و con3 التي ثبتتها منظمة الصحة العالمية والخاصة بالبروتين الفيروسي الرابع VP4 والذي يشير إلى النوع الوراثي [P] .

أما درجة الحرارة المثلى في المرحلة الثانية والمتضمنة معرفة الأنواع الوراثية المشفرة للبروتين الفيروسي الرابع VP4 فقد كانت 55 م , وقد كُشف عن خمسة أنواع وراثية . ووجد النوع الوراثي P[8] بأكبر نسبة 36.25 % إذ شخص في 29 انموذجا من أصل 80 انموذجا , يليه النوع P[4] وقد وجد في 19 انموذجا من أصل 80 وشكل نسبة 23.75 % . أما النوع P[6] فكانت نسبته 12.50 % إذ وجد في 10 نماذج من أصل 80 انموذجا , بينما تمثل النوعان P[9] و P[10] بأقل النسب إذ بلغا 2.50 % و1.25 % على التوالي . في حين ظهر كلا من P[4] و P[8] بصورة مشتركة في نموذجين , وقد أظهر 19 انموذجا من أصل 80 انموذجا نتيجة سالبة في الترحيلة الثانية الخاصة بمعرفة الأنواع الوراثية [P] وشكلت نسبة 23.75 % . وكما مبين في الجدول (2) .

جدول (2) : الأنواع الوراثية الخاصة بالبروتين الفيروسي الرابع والمعروفة بـ [P] باستعمال فحص تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي (conventional – PCR) .

النوع P	اسم البادئ	العدد	النسبة المئوية
P[4]	2T-1	19	% 23.75
P[6]	3T-1	10	% 12.50
P[8]	1T-1	29	% 36.25
P[9]	4T-1	2	% 2.50
P[10]	5T-1	1	% 1.25
غير مشخصة		19	% 23.75

لوحظ حدوث خمج مختلط بأكثر من نوع وراثي فقد وجد كلا من G4/G1 P[8] بصورة مشتركة في 19 انموذج , بينما وجد النوعان G2/G1P[4] في 11 أنموذجا . و وجدنا أن الضرب الوراثي G1P[8] هو أكثر الأنواع انتشارا إذ شخص في 30 انموذجا ، تُبعه الضرب الوراثي G1[P4] إذ وجد في 11 انموذجا , أما الضرب G2P[4] فقد وجد في 7 نماذج , ووجد الضرب G4P[8] في 3 نماذج ، اما الضربان G9P[8] وG3P[10] فقد وجدا في انموذجين لكل ضرب ، واخيراً تواجد الضربان G8P[6] و G1P[9] في انموذج واحد لكل ضرب .

المناقشة

يُعد الاسهال من المشاكل الصحية الكبيرة التي تصيب الأطفال بعمر أقل من 5 سنوات , يسبب ما يقارب 1.8 مليون حالة وفاة سنوياً, وهناك العديد من المسببات المرضية المختلفة المُسببة للإسهال المائي الحاد، وتُعد الفيروسات هي المسؤولة عن أكثر من نصف الحالات (Alain and Denis , 2007 ; Boschi- pinto *et al*., 2007) . يُشكل فيروس الروتا نسبة أكثر من 50 % من حالات الخمج الفيروسية ويصيب كلاً من الانسان والحيوان ، وان المجموعة A من فيروس الروتا هي المسؤولة عن أكثر من 90 % من حالات التهاب المعدة والأمعاء في الانسان, ويتسبب فيروس الروتا بوفاة اكثر من 527000 طفل سنوياً في الدول النامية (Wang *et al*., 2010; WHO, 2011) .

أجريت العديد من الدراسات لتحديد الأنواع الوراثية المختلفة لفيروس الروتا ففي الدراسة الحالية استعملت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس التقليدي للكشف عن الفيروس ويعود سبب اختيار هذه التقنية بسبب تضارب نسب الإصابة بهذا الفيروس بين محافظة وأخرى وبين سنة وأخرى, إذ سيقودنا هذا الاختبار لمعرفة الأنواع الوراثية الاكثر شيوعاً في محافظة بابل لغرض معرفة مدى ملاءمة اللقاح المتداول في المراكز الصحية لتلقيح الاطفال ضمن برنامج أعدته وزارة الصحة .

ووفقاً للتقارير المسجلة في جميع انحاء العالم وجد أن الانواع الوراثية الرئيسة السائدة في جميع انحاء العالم تقريباً هي G1 وG2 وG3 وG4 وG9 والتي توجد بشكل مشترك مع الانواع الوراثية P[4] و P[6] و P[8] (Santosham *et al*., 2007) .

تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل اليها الباحث Ahmed وجماعته (2006) في كردستان العراق التي بينت ان الأنواع الوراثية G1 و G4 و G2 هي السائدة في كردستان العراق , اما P[8] و P[6] و P[4] فهي الأنواع الوراثية الأكثر انتشاراً في تلك المنطقة , وعلى الرغم من وجود النوع الوراثي G12 في كردستان العراق فانه لم يُثبت في الدراسة الحالية.

وقد تطابقت النتائج مع النتائج التي توصل اليها الباحثون في الدول المجاورة منها ايران , إذ وجد الباحثون ان الانواع الوراثية G1 و G4 و G8 هي الاكثر انتشاراً , بينما كان النوع الوراثي P[8] هو الاكثر تواجد ويليه النوع P[4] (Modaress *et al*., 2011) .

وقد كُشف عن وجود النوع الوراثي G9 في هذه الدراسة وكانت النتائج هذه مؤيدة لما كُشف عنه في كل من ايران و اليابان وتايلند (Thtamboonlers *et al*., 2008) .

بينما تضاربت النتائج التي توصلنا اليها مع نتائج الدراسة التي اجريت في تركيا والتي أوضحت ان الضرب المصلي G4P[8] هو الأكثر تواجداً في تلك المنطقة يليه الضرب المصلي G1P[8] وتمثل هذه السلالات أكثر من ثلثي عدد السلالات التي كُشف عنها في دراستهم (Cataloluk *et al.*, 2005) .

بين Al-Khafaji و Al-Jibury (2013) ان حساسية فحص الشريط السريع كانت مشابهة لحساسية فحص تلازن اللاتكس وفحص الانزيم المناعي المرتبط بالانزيم (الاليزا) اما خصوصية فحص الشريط السريع فقد كانت اقل من الفحصين الانفين الذكر.

لم يُشخص فيروس الروتا باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس التقليدي في بعض النماذج ويُعزى ذلك الى العديد من الاسباب منها حدوث فشل في عمل الـ (PCR) , أو كانت هذه النماذج ذات نتائج موجبة كاذبة False Positive باستخدام فحص الشريط , وجود سلالات جديدة أو عدم استعمال كافة البوادئ المثبتة لدى منظمة الصحة العالمية (WHO, 2009) .

المصادر العربية

الخفاجي , زهرة محمود وأبو المعالي , حسن محمود (2013) , تفاعلات الكوثرة وتصميم البوادئ PCRing & Primer Design , العراق .

المصادر الاجنبية

Abdulrazzaq, A.; Aljeboory, S. K.; Abdulkareem, S. and Klena, J. (2011).Two different diagnostic methods for detection of rotavirus in Iraqi young Children. *Al-Anbar J. Vet. Sci.* , 4 (1) : 50 - 55 .

Al-Khafaji Y.A and Al-Jibury H.J. (2013). Detection of rotavirus in diarrhea stool samples of children with acute gastroenteritis in Babylon governorate, Iraq. *Inter. Research j. Microb.*, 4(3): 84-88.

Ahmed, H.M.; Coulter, J.B.S.; Nakagomi, O.; Hart, C.A.; Zaki, J.M.;. Al-Rabaty, A.A.; Dove, W. and Cunliffe, N.A. (2006). Molecular Characterization of Rotavirus Gastroenteritis Strains, Iraqi Kurdistan. *Emerg. Infect. Dis.* , 12(5) : 824 -826.

Alain, S. and Denis, F. (2007) . Epidemiology of infectious acute diarrhoea in France and Europe. *Arch. Pediatr.* , 14 (3): 132-144.

Alrifai, S.B.;Alsaadi, A.;Mahmood, Y.A.;Ali, A.A. and Al-Kaisi, L.A. (2009).Prevalence and etiology of nosocomial diarrhea in children < 5 years in Tikrit teaching hospital. *East. Medite. Healt. J.* , 15(5) : 1111-1118.

Black, R.E.;Cousens, S.;Johnson, H.L.;Lawn, J.E.;Rudan, I.;Bassani, D.G.;Jha, P.;Campbell, H.;Walker, C.F.;Cibulskis, R.;Eisele, T.;Liu, L. and Mathers, C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* , 375(9730) :1969 - 1987.

Boschi-Pinto, C.;Velebit, L. and Shibuya, K. (2007) . Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries : A meta-analysis review. *Bull. World Healt. Organ.* , 51 : 505 – 516 .

Cataloluk,O.;Iturriza,M. andGray, J.(2005).Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiol. Infect.* , 133(4): 673 - 678.

Levy, K.;Hubbard, A.E. and Eisenberg, J.N. (2009) .Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* , 38 (6) : 1487 - 1496.

Mahmood, D.A. and Feachem, R.G. (1987).Clinical and epidemiological characteristics of rotavirus- and EPEC-associated hospitalized infantile diarrhoea in Basrah, Iraq. *J. Trop. Pediatr.* , 33 (6) : 319 - 325 .

Mathers, C.D.;Boerma, T. and Fat, D.M. (2009).Global and regional causes of death . *Br. Med. Bull.* , 92 (1) : 7 - 32.

Modaress, S;Rahbarimanesh, A.A.;Edalat,R.;Sohrabi, A.;Modarres, S.;Gomari, H.;Motamedirad, M. and Sayari, A.A. (2011). Human Rotavirus Genotypes Detection among Hospitalized Children, A study in Tehran, Iran . *Arch. of Iran. Med.* , 14(1) : 39 - 45 .

Pesavento, J.B.;Crawford, S.E.;Estes, M.K. and Prasad, B.V. (2006).Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top Microbiol. Immunol*. , 309: 189 - 219 .

Santosham, M.;Nelson, E.A. and Bresee, J.S. (2007) .Implementing rotavirus vaccination in Asia. *Vaccin.* , 25(44) : 7711 - 7716.

Thtamboonlers, A.;Bhattarakosol, P.;Chongsrisawat, V.; Sungkapalee, T.;Wutthirattanakowit, N. and Poovorawan, Y. (2008).Molecular characterization of group of A human rotaviruses in Bangkok and Buriram , Thailand during 2004 - 2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and rare G3P[19] strain. *Virus Genes.* , 36(2) : 289 - 298.

Wang, F.T.;Mast, T.C.;Glass, R.J.;Loughlin, J. and Seeger, J.D. (2010) .Effectiveness of the pentavalent Rotavirus vaccine in preventing gastroenteritis in the United States . *Pediat.* , 125(2) : 208 - 213 .

WHO,(World Health Organization) (2009).Department of Immunization ,Vaccines and Biological. Manual of rotavirus detection and characterization methods. CH-1211 Geneva 27, Switzerland. This publication is available on the Internet at: www.who.int/vaccinesdocuments .

WHO,(World Health Organization) (2011) .Estimated Rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2004, 527 000. Immunization Surveillance, Assessment and Monitoring, World Health Organization, Geneva, Switzerland.