



مطالعه وقوع نوتریبی و حضور ژنوتیپ‌های G گاوی در روتاویروس‌های گروه A انسانی در تهران

امید مددگار^۱، سید مسعود حسینی^۲، احمد نازک تبار^۳، عباس برین^۱، فائزه جهانگیری^۲، احمد واحدی^۱^۱گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران^۳دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

doi 10.22059/jvr.2020.201477.2439

تاریخ دریافت: ۲۰ مهر ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۲۷ آذر ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: روتاویروس‌های گروه A یکی از مهمترین عوامل مسبب گاستروانتریت و عامل ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد اسهال نوزاد انسان و سایر حیوانات می‌باشند. ژنوتیپ G این ویروس‌ها بر اساس توالی ژن رمز کننده پروتئین سطحی این ویروس‌ها (VP7) تعیین شده که یکی از مهمترین عوامل القاء کننده ایمنی علیه ویروس است و نسبت به هر ژنوتیپ اختصاصی عمل می‌کند.

هدف: در مطالعه حاضر احتمال وقوع ژنوتیپ‌های رایج روتاویروس A گاوی در جمعیت روتاویروس انسانی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: تعداد ۱۰۰ نمونه از مدفوع کودکان زیر ۲ سال مبتلا به اسهال از شهر تهران و ورامین جمع آوری و به منظور ردیابی حضور روتاویروس A با استفاده از روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های مثبت بر روی خط سلولی MA-104 با چند پاساژ جداسازی و کشت شدند. سپس کلیه نمونه‌های مثبت (۴۹ نمونه) با استفاده از روش semi-nested RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی تعیین کننده ژنوتیپ‌های رایج گاوی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: از ۱۰۰ نمونه، ۴۹ مورد در الیزا مثبت تشخیص داده شدند. ۸ نمونه در مرحله اول semi-nested RT-PCR باند مربوط به قطعه مورد نظر را نشان دادند و در دور دوم، در دو نمونه اخذ شده از شهر ورامین، نتایج مثبت بود و وجود قطعه VP7 گاوی در یکی G6 و در دیگری دو قطعه G6 و G8 تشخیص داده شد که نشان از عفونت همزمان حداقل با دو جدایه روتاویروس انسانی نوتریب دارد. هر ۶ نمونه منتخب الیزا مثبت که به روی خط سلولی MA104 برده شده بودند، پس از ۴-۵ بار پاساژ متوالی آثار تخریب سلولی (CPE) را نشان دادند و زنده بودن روتاویروس‌های نمونه‌های منتخب این مطالعه تایید گردید.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این مطالعه بیانگر وجود نوتریبی روتاویروس‌های انسانی با روتاویروس گاوی است و نشان می‌دهد که در صورت ظهور تیپ‌های جدید انسانی، به دلیل تفاوت سویه نوتریب جدید در پروتئین ایمونژن، امکان غالب شدن آن و در نهایت، همه گیری و تلفات چه بسا قابل ملاحظه‌ای امکان خواهد داشت که به مطالعات بیشتر و پایش مداوم نیاز دارد.

کلمات کلیدی: روتاویروس گروه A، گاستروانتریت، نوتریبی، VP7، G genotyping

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: امید مددگار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: madadgar@msu.edu

مقدمه

نوزاد انسان، این ویروس‌ها در نوزاد سایر حیوانات از جمله گاو نیز موجب گاستروانتریت و اسهال می‌گردند.

روتاویروس‌های گروه A در جنس روتاویروس و خانواده رتوویریده طبقه بندی می‌شوند. RNA ژنومی این ویروس‌ها دو رشته‌ای بوده از ۱۱ قطعه تشکیل شده است که درون یک پارتیکل

گاستروانتریت یکی از مهمترین بیماری‌های نوزادان و کودکان است که فارغ از عامل مسبب آن، یکی از ۶ عامل مسبب ۱۰/۶ میلیون موارد مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. در میان عوامل مسبب اسهال کودکان روتاویروس‌های گروه A از اهمیت ویژه ای برخوردارند چرا که این ویروس‌ها از ۳۰-۵۰ درصد موارد این بیماری در کودکان و نوزادان جدا می‌شوند. علاوه بر

جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از اخذ در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی منتقل و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آنتی ژن الایزا: کلیه نمونه‌ها به منظور حضور آنتی ژن روتاویروس A با استفاده از کیت تجاری الایزا ساخت شرکت POURQUIER (Pourquier ELISA Trikit, Institut Pourquier, France) فرانسه مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت: به منظور بررسی زنده بودن روتاویروس‌های انسانی این مطالعه، ۶ نمونه‌ای که در آزمون آنتی ژن الایزا مثبت تشخیص داده شده بودند و جذب نوری بالایی داشتند، به منظور جداسازی در کشت سلول انتخاب شدند. کشت روتاویروس فقط به منظور بررسی زنده بودن و تایید صحت آزمایشات انجام گرفت و کشت نمونه‌های الایزا منفی انجام نگردید. پس از عمل‌آوری سلول‌های دودمان MA104 (Monkey African Green Kidney cell line) در فلاسک‌های کشت سلول، با نمونه‌های آماده شده تلقیح انجام شد. آماده‌سازی نمونه‌های مدفوع جهت تلقیح به کشت سلول به صورت زیر انجام شد. پس از تهیه سوسپانسیون ۱۰ درصد مدفوع در محیط کشت DMEM و ورتکس شدید، سوسپانسیون‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با قدرت ۲۵۰۰۰-۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی پس از جمع‌آوری در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری با افزودن ۵ میکرولیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی) - استرپتومایسین (۱ گرم) ضد عفونی شدند.

جهت فعال‌سازی ویروس‌ها به سوسپانسیون تهیه شده به نسبت برابر محلول حاوی تریپسین ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیده و در مرحله بعد، پس از سه مرتبه شستشوی کشت سلول تک لایه MA104 با محیط DMEM فاقد سرم (جنین گوساله)، به فلاسک حاوی کشت سلول MA104 تلقیح شد. فلاسک‌های تلقیح شده به مدت یک ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس محتویات فلاسک تخلیه و یکبار شستشو شده و در نهایت به آن ۱۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی تریپسین با غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر و فاقد سرم (جنین گوساله) افزوده شد و به مدت یازده روز در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می‌گردیدند. نمونه‌ها روزانه به منظور مشاهده CPE بررسی می‌شدند و از آنجایی که معمولاً

سه لایه و فاقد پوشش چربی قرار گرفته‌اند. اعضای جنس روتاویروس بر اساس ویژگی‌های آنتی ژنی پروتئین VP6 در قالب ۷ گروه سرمی که از A تا G نامگذاری شده‌اند، تقسیم بندی می‌شوند که روتاویروس‌های گروه A از نظر بیماری‌زایی اهمیت بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها دارند. روتاویروس‌های گروه A براساس توالی ژنتیکی ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های سطحی خود که VP4 و VP7 نامیده می‌شوند، به ترتیب به ژنوتیپ‌های G و P تقسیم‌بندی می‌شوند. این دو پروتئین نقش به‌سزایی در القای تولید آنتی بادی‌های خنثی کننده دارند که در این میان پروتئین VP7 نقش مهمتری دارد (۴،۶،۹). تا کنون ۲۷ ژنوتیپ G و ۳۷ ژنوتیپ P شناسایی شده است (۲۳). ایمنی ناشی از ژنوتیپ‌ها اختصاصی است و قادر به ایجاد محافظت در برابر سایر ژنوتیپ‌ها نمی‌باشد، بنابراین برای ساخت واکسن علیه بیماری آگاهی از رایج‌ترین ژنوتیپ‌های یک منطقه بسیار مهم است. به همین دلیل مطالعات بسیاری در سراسر جهان برای تعیین شایع‌ترین ژنوتیپ موجود در هر منطقه همواره انجام می‌شود (۵،۶،۹،۲۶). مطالعات نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های G1، G2، G3، G4، G9 در کنار ژنوتیپ‌های G5 و G8 در جمعیت انسانی از بیشترین شیوع برخوردارند. در حالیکه G6، G10 و G8 رایج‌ترین ژنوتیپ‌های G گاوی شناخته می‌باشند (۳،۶). با توجه به قطعه‌قطعه بودن ژنوم روتاویروس‌ها، وقوع نوتریبی یکی از مهمترین عوامل مؤثر در تکامل این ویروس‌ها شناخته می‌شود و مشاهدات بسیاری از محققان در جهان وقوع نوتریبی در میان قطعات ژنی رمز کننده پروتئین VP7 در بین روتاویروس‌های A انسانی و گاوی و تعویض ژنوتیپ ناشی از آن را گزارش کرده‌اند. این مسئله می‌تواند منجر به ورود ژنوتیپ‌های جدید و بدون سابقه ایمنی در جمعیت انسانی بشود (۹،۱۰). مطالعات متعددی جهت تعیین ژنوتیپ‌های G روتاویروس‌های A گردش کننده در جمعیت انسانی و همچنین گوساله‌های نوزاد انجام شده است (۷،۱۶،۱۸،۲۱). ولی تا کنون مطالعه‌ای در مورد امکان حضور ژنوتیپ‌های G رایج گاوی در جمعیت انسانی در ایران انجام نشده است.

این مطالعه با هدف یافتن امکان نوتریبی و حضور ژنوتیپ G گاوی در نمونه‌های بالینی اخذ شده از بیمارستان‌های شهر تهران و مراکز درمانی شهرستان ورامین، صورت گرفت.

مواد و روش کار

تعداد ۱۰۰ نمونه از کودکان زیر دوسال مبتلا به اسهال در استان تهران در طول فصل بهار تا پاییز ۱۳۹۳ از بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهر تهران و شهرستان ورامین (از هر کدام ۵۰ نمونه)

در واکنش PCR با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناکلون ایران، به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند. جهت انجام این واکنش ۲ میکرولیتر از محصول RT-PCR دور اول با ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl₂، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۱۴/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز مخلوط شد و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر تحت برنامه دمایی ۹۴ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه) برای واسرشتی اولیه و سپس ۳۰ چرخه حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه)، ۴۲ درجه سانتیگراد (۲ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۱/۵ دقیقه) و در آخر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه قرار گرفته شد.

پس از انجام واکنش PCR محصول آن‌ها در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید از نظر حضور باندهای مورد انتظار بررسی شدند.

نتایج

الایزا: از مجموع ۱۰۰ نمونه مدفوع اسهالی که با آزمون آنتی‌ژن الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند، ۴۹ نمونه از نظر حضور آنتی‌ژن روتاویروس گروه A مثبت شناخته شدند. میزان شیوع کلی ۴۹ درصد بود که در تهران و ورامین به ترتیب، ۴۴ درصد و ۵۴ درصد محاسبه شد.

کشت: هر ۶ نمونه منتخب مثبت شده از نظر حضور آنتی‌ژن روتاویروس A در روش الایزا که به روی کشت سلولی MA104 برده شده بودند، پس از ۴-۵ بار پاساژ متوالی در محیط کشت سلولی MA104 و در حضور تریپسین عادت کرده تکثیر داده شدند و آثار تخریب سلولی ناشی از تکثیر ویروس زنده در سلول‌ها (CPE) را نشان دادند. بنابراین زنده بودن روتاویروس‌های نمونه‌های منتخب این مطالعه تایید گردید.

مشاهده این آثار در کشت روتاویروس‌های گروه A نیاز به عادت دادن ویروس به کشت سلول دارد تا زمان مشاهده CPE. در صورت لزوم سه بار عمل پاساژ کشت سلول به صورت کور تکرار می‌شد. در صورت مشاهده آثار CPE از محیط کشت عکس برداری می‌شد.

Semi-nested RT-PCR: به منظور بررسی احتمال وقوع نوتریبی، با استفاده از روش Semi-nested RT-PCR کلیه نمونه‌های مثبت با استفاده از پرایمرهای تعیین کننده ژنوتیپ‌های مهم گاوی G6، G10 و G8 که پیش از این توسط سایر محققان ارائه شده بود، با اندکی تغییرات به شرح زیر بررسی شدند (۱۲، ۱۴) (جدول ۱). به طور خلاصه dsRNA ژنوم ویروس با استفاده از کیت تجاری VETEK viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON, South Korea) مرحله اول آزمون RT-PCR با استفاده از کیت One-Step RT-PCR (Bioneer, South Korea) و با استفاده پرایمرهای VP7F و VP7R با شرایط زیر انجام شد. ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده به همراه ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و به ۱۳ میکرولیتر مستر میکس آماده لیوفلیزه RT-PCR در داخل میکروتیوب‌های مخصوص افزوده شد و در دستگاه ترمال سایکلر با برنامه دمایی و زمانی ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه جهت انجام واکنش رونویسی معکوس و سپس ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه جهت غیرفعال کردن آنزیم رونویسی معکوس و واسرشتی اولیه اعمال شد، در ادامه ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۹۵ درجه سانتیگراد (یک دقیقه)، ۵۲ درجه سانتیگراد (یک دقیقه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (یک دقیقه) اعمال شد و جهت طولیل سازی نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

محصول این واکنش جهت تعیین تیپ با پرایمرهای تعیین ژنوتیپ‌های G6(DT6)، G8(HT8) و G10(ET10) که در جدول ۱ آمده است به همراه پرایمر VP7F به عنوان پرایمر مشترک،

جدول ۱. ویژگی و توالی هر یک از پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه.

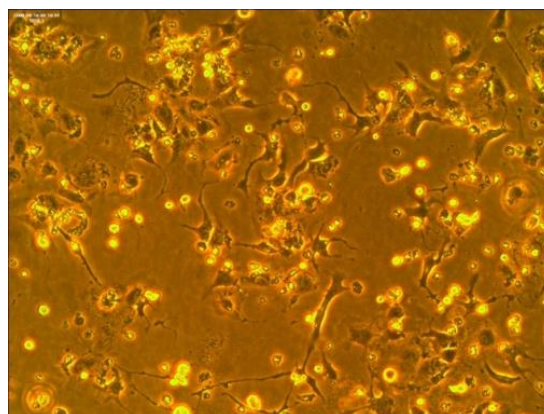
| منبع | جایگاه اتصال | مفهوم | Sequence 5' to 3' | نام پرایمر | آزمون |
|------|--------------|-------|--------------------------------|------------|----------|
| ۱۵ | 51-71 | + | ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC | VP7-F | G-typing |
| ۱۵ | 932-914 | - | AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC | VP7-R | |
| ۱۳ | 499-481 | - | CTA GTT CCT GTG TAG AAT C | DT6 (G6) | |
| ۱۳ | 273-256 | - | CGG TTC CGG ATT AGA CAC | HT8 (G8) | |
| ۱۳ | 714-697 | - | TTC AGC CGT TGC GAC TTC | ET10 (G10) | |

تعیین ژنوتیپ با روش Semi-nested RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی نوع گاوی مورد آزمایش قرار گرفتند، در ۱ نمونه باند واضح مربوط به قطعه با طول ۲۲۲ باز نوکلئوتیدی (ژنوتیپ G8) دیده شد و در یک نمونه دیگر باند واضح مربوط به قطعات ۴۴۸ باز نوکلئوتیدی (ژنوتیپ G6) و ۲۲۲ باز نوکلئوتیدی (ژنوتیپ G8) را نشان دادند. که هر دو باند مشاهده شده در نمونه دوم، نشان‌دهنده وجود عفونت همزمان نوزاد با هر دو ژنوتیپ است. سایر نمونه‌ها علی‌رغم اینکه در واکنش دور اول PCR باندهای واضح در طول ۸۸۱ باز نوکلئوتیدی ایجاد کرده بودند در واکنش دور دوم PCR (واکنش تعیین ژنوتیپ G گاوی) هیچ باندهایی که معرف وجود ژنوتیپ G گاوی با توجه به پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده باشد، ایجاد نکردند. نتایج کلی صورت گرفته در آزمایش دور دوم Semi-nested RT-PCR نشان می‌دهد که Reassortment یا بازآرایی (نوترتیبی) روتاویروس‌های گاوی و انسانی صورت گرفته است به طوری که در سه مورد وجود قطعات VP7 گاوی در روتاویروس‌های انسانی تایید شد.

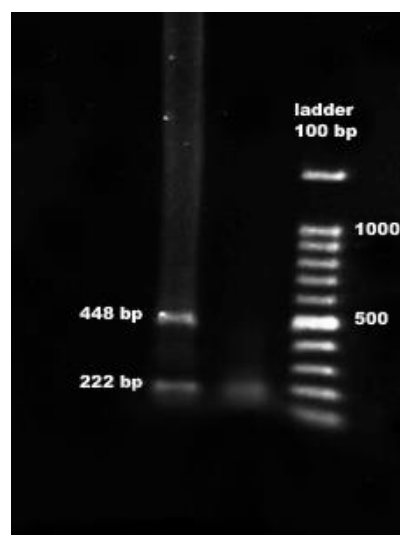
بحث

در مطالعه حاضر تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع از کودکان زیر دوسال مبتلا به اسهال از دو شهر واقع در استان تهران در طول فصل بهار تا پاییز ۱۳۹۳ جمع آوری شد. به این منظور از بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهرهای تهران و شهرستان ورامین از هر کدام ۵۰ نمونه جمع آوری گردید. شهرستان ورامین به این علت برای جمع آوری ۵۰ درصد نمونه‌ها انتخاب شد که علاوه بر بالا بودن تراکم و جمعیت شهری، در مناطق روستایی اطراف آن گاوداری‌های صنعتی بسیاری وجود دارد و احتمال برخورد دو جمعیت انسانی و دامی و تبادل ویروس میان این دو جمعیت بالاست و از طرفی به علت پایین بودن ارائه خدمات پزشکی در روستاها و همچنین فاصله ناچیز میان روستاها با مرکز شهرستان ورامین (شهر ورامین) میزان مراجعه روستائیان به مراکز درمانی این شهر بالاست و از این رو انتظار می‌رود احتمال آلودگی با روتاویروس‌های جمعیت گاوی در جمعیت انسانی در این شهرستان بالا باشد.

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه، ۴۹ مورد در الیزا مثبت تشخیص داده شدند. سپس به منظور تکثیر ژنوم رمزکننده پروتئین VP7 از پرایمرهای عمومی VP7-F و VP7-R استفاده شد که این پرایمرها



تصویر ۱. وجود آثار تخریب سلولی سایتوپاتیک یکی از نمونه‌های مثبت پس از ۴ پاساژ روی سلول‌های MA104.



تصویر ۲. آزمایش Semi-nested RT-PCR و باندهای G گاوی مربوط به دو نمونه مثبت که شماره ۱، یک باند به اندازه ۲۲۲bp (ژنوتیپ G8) و شماره ۲، دو باند به اندازه‌های ۲۲۲bp (ژنوتیپ G8) و ۴۴۸bp (ژنوتیپ G6) را نشان دادند.

Semi-nested RT-PCR

منظور تکثیر ژنوم رمزکننده پروتئین VP7 از پرایمرهای عمومی VP7-F و VP7-R استفاده شد که این پرایمرها قطعه‌ای با طول ۸۷۱ باز نوکلئوتیدی از کل ژنوم رمزکننده پروتئین VP7 را تکثیر می‌دهند و از نمونه‌های مثبت که PCR گذاشته شد، ۸ نمونه باند واضح مربوط به قطعه مورد نظر را نشان دادند و تعدادی هیچ باندهایی در دور اول ایجاد نکردند ولی در دور دوم باند مورد نظر ایجاد گردید. هدف از این مطالعه به دست آوردن شیوع با روش مولکولی نبود. از مجموع ۴۹ نمونه‌ای که برای

(۸). پدیده نوترتیبی ژنتیکی، یکی از راهکارهای مهم روتاویروس‌ها در تکامل و همچنین فرار از سیستم ایمنی میزبان است (۲۰). از آنجا که شیوع سروتیپ‌های غیرمعمول در یک نقطه خاص ممکن است در نتیجه وقوع نوترتیبی بین روتاویروس‌های انسانی و حیوانی ایجاد شود (که خود ناشی از انتقال بین گونه روتاویروس‌های حیوان و انسان است) و یا سروتیپ غالب در حیوانات به جمعیت انسانی مجاور زیستگاه حیوانات سرایت و در آن‌ها ایجاد بیماری کند. Gombold و همکاران در تحقیق جالبی در سال ۱۹۸۶ دو جدایه وحشی روتاویروس میمون (SA11) و رزوس (RRA) را به موش‌های نژاد CD-1 نوزاد مادران سرم منفی بطور همزمان خوراندند و در مقاطع زمانی مختلف از نمونه‌های مدفوع، ویروس جدا نموده و روی ژل پلی آکرلامید وجود نوترتیبی قطعات را بررسی نمودند. نتایج نشانگر میزان نوترتیبی ۳۸ درصد (۲۵۲ از ۶۶۲ جدایه) بوده که ۲۵ درصد در ۱۲ ساعت ابتدایی و در ادامه در طی ۷۲ و ۹۶ ساعت، بترتیب، ۸۰-۱۰۰ درصد جدایه‌ها نوترتیبی حداقل در یک قطعه را نشان دادند. نیز رفته رفته یک جدایه نوترتیپ غالب می‌شده که علت آن فشارهای انتخابی ذکر شده است (۱۱). نیز Graham و همکاران در سال ۱۹۸۷ هنگامی که جدایه‌های روتاویروس انسانی و گاوی را به خط سلولی کلیه میمون MA104 و نیز BSC-1 همزمان تلقیح نمودند، ۵۱۱ پلاک متفاوت جدا نموده که از نظر ژنتیک در ژل پلی آکرلامید دارای قطعات متفاوت بودند. نتایج نشان داد که نوترتیبی پدیده اتفاقی نیست، مربوط به قطعات خاصی است و نوع سلول، گونه میزبان و فشارهای انتخابی در فراوانی و قطعه نوترتیپ، تأثیر بسزایی دارد (۱۳). همینطور Maunula و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی ۱۷ جدایه شاخص اپیدمی‌های سال‌های ۱۹۹۷-۱۹۸۰ فنلاند و بررسی ژنوتیپ آن‌ها، فراوانی بالای تغییرات مشاهده شده را بدلیل نوترتیبی قطعات دانسته و عنوان کردند که این تغییرات فقط در VP7 و VP4 نبوده و دیگر قطعات را نیز شامل می‌شود (۱۹). Iturriza-Gomara و همکاران در سال ۲۰۰۱ پس از بررسی ۳۶۰۱ جدایه روتاویروسی انسانی کشور انگلستان بین سال‌های ۹۹-۱۹۹۵، میزان نوترتیبی جدایه‌ها را ۲ درصد گزارش نموده و اظهار داشتند که این پدیده نادر نبوده و جمعیت آن در کل جمعیت روتاویروس جهانی، معنی‌دار است (۱۵). نیز Unicomب و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی ۱۵۳۴ جدایه انسانی بنگلادش بین سال‌های ۷-۱۹۹۲ مطالعه نموده و تفاوت زیادی در ژنوتیپ G9 از نظر تیپ متفاوت P و همینطور در جدایه‌های G2 و G4 مشاهده نمودند و آن را ناشی از نوترتیبی جدایه‌های G آن‌ها با VP4 (P) متفاوت دانستند. این پژوهشگران نیز تواتر نوترتیبی را در جدایه‌های روتاویروس بنگلادش بسیار بالا برآورد نمودند (۲۸). Trojnar و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که

قطعه‌ای با طول ۸۸۱ باز نوکلئوتیدی از کل ژنوم رمزکننده پروتئین VP7 را تکثیر می‌دهند و از نمونه‌های مثبت که PCR گذاشته شد، ۸ نمونه باند واضح مربوط به قطعه مورد نظر را نشان دادند ولی در دور دوم، فقط در دو نمونه ورامین نتایج مثبت بود و وجود قطعه VP7 گاوی در روتاویروس انسانی تایید گردید. اختلاف نتیجه بین الایزا و PCR می‌تواند به حضور عوامل مهارکننده PCR در نمونه مدفوع، عدم استفاده از سایر پرایمرها، پاسخ مثبت کاذب الایزا، و نیز روش استخراج RNA مربوط باشد (۲۲،۲۴)، یکی دیگر از دلایل منفی بودن واکنش PCR، عدم اتصال مناسب پرایمرها با توالی نوکلئوتیدی الگو است. این موضوع به ویژه در RNA ویروس‌ها که میزان جهش در آن‌ها به مراتب بالاتر از سایر موجودات زنده است بیشتر به چشم می‌خورد (۸).

در این مطالعه تعداد ۶ نمونه منتخب که بر روی خط سلولی MA104 پاساژ داده شدند، در پاساژ چهارم یا پنجم آثار CPE را بر روی کشت سلولی تک لایه نشان دادند و ویروس‌های عادت داده شده به کشت سلولی MA104، در تلقیح به کشت سلولی پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO2 آثار مرگ سلولی را نشان می‌دادند. نتایج حاصل از روشی که در این مطالعه برای کشت و جداسازی روتاویروس در نظر گرفته شد با روش پیشنهاد شده توسط Kutsuzawa و همکارانش در سال ۱۹۸۲ همخوانی دارد؛ آنان در پاساژ سوم تا ششم آثار CPE را مشاهده نمودند (۱۷). نتایج نشان می‌دهد که روتاویروس‌های نوترتیپ این مطالعه فعال بوده و تکثیر پیدا می‌کنند.

در این مطالعه با توجه به مزایای یاد شده از روش Semi-nested RT-PCR جهت تعیین ژنوتیپ‌های G گاوی در موارد انسانی به وسیله پرایمرهای اختصاصی DT6 و HT8 و ET10 مرتبط با قطعات شایع روتاویروس گاوی G6، G8 و G10 استفاده شد (۲۲)، تا بررسی قطعات اختصاصی G تایپ گاوی در موارد اسهال انسانی و وجود نوترتیبی ژنتیکی مشخص شود. از میان نمونه‌هایی که در دور دوم با روش Semi-nested RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند دو نمونه از شهر ورامین علاوه بر ایجاد باند در دور اول، باند واضحی مربوط به دو سروتیپ‌های G6 و G8 ایجاد کردند که در یکی از این دو نمونه هر دو باند G6 و G8 ایجاد شد که نشان‌دهنده عفونت همزمان با هر دو ژنوتیپ است. این نتیجه با در نظر گرفتن این واقعیت که ژنوم روتاویروس‌ها قطعه‌قطعه است بسیار حائز اهمیت می‌باشد، چرا که همواره احتمال وقوع نوترتیبی ژنتیکی در آلودگی همزمان یک سلول با دو روتاویروس و در نتیجه پیدایش سویه نوترتیپ جدید وجود دارد

امکان وجود نوتریبی در ایزوله‌های جدا شده از بیماران بیمارستان‌ها مطالعه و اثبات گردید (۱).

به عبارت دیگر نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در صورت تبادل قطعه VP7 و ظهور تیپ‌های جدید انسانی، به دلیل تفاوت سویه نوتریبی جدید در پروتئین ایمونوژن، امکان غالب شدن آن در جمعیت انسانی به علت فقدان ایمنی مادری و کارآیی پایین واکسن‌های رایج روی سویه جدید و در نهایت، همه‌گیری و تلفات چه بسا قابل ملاحظه‌ای امکان خواهد داشت که به مطالعات بیشتر و پایش مداوم نیاز دارد. بنابراین پایش سویه‌های موجود روتاویروسی انسانی غالب در مناطق آلوده با روتاویروس گاوی و هشیاری و آمادگی در برابر احتمال وقوع چنین رخدادی منطقی و لازم بنظر می‌رسد.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی به جهت تأمین هزینه‌های این طرح و نیز از کارکنان آزمایشگاه ویروس شناسی و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای مساعدت و همکاری صمیمانه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

قطعه VP4(P) از یک جدایه روتاویروس طیور مشابه قطعه جدایه‌های سگ و خوک بوده و نوتریبی بین روتاویروس‌های طیوری و پستانداری را نشان دادند (۲۷). هم چنین Schumann و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی چهار ژن VP4, VP6, VP7, NSP5 در هشت جدایه روتاویروسی ماکیان و بوقلمون، امکان انتقال بین گونه‌ای و نوتریبی ژن‌های روتاویروس طیور را نشان دادند (۲۵). Bányai و همکاران در سال ۲۰۰۸ در نیکاراکونه وقوع نوتریبی و بیماری‌زایی یک روتاویروس A نوتریبی انسانی - گاوی در کودکان را نشان دادند (۲). در نهایت Gentsch و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مرور و بررسی ژنوتیپ‌های انسانی و تغییرات بالای آن‌ها اینطور نتیجه گرفتند که تنوع بالای تغییرات روتاویروس انسانی و امکان تبادل بالای آن با قطعات جدایه‌های دیگر انسانی و نیز دامی، لزوم پوشش همه سروتیپ‌ها را در واکسن‌های نوتریبی انسانی یادآور می‌کند (۹).

به عبارت دیگر در صورت عدم رعایت بهداشت، امکان نوتریبی طبیعی ویروس بین سویه‌های مختلف انسانی و حتی بین سویه‌های انسانی با حیوانی که در این مطالعه به آن پرداخته شد، امکان ایجاد ژنوتیپ نوظهور فراهم می‌گردد. از آنجایی که تبادل قطعات بین سویه‌های انسانی و گاوی به کرات از نقاط مختلف دنیا گزارش شده (۶،۱۰) و در مطالعه Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۲ داشتند، تولید سویه بازآرایی (نوتریبی) شده روتاویروس گاوی را در کشت سلولی با موفقیت انجام داده‌اند، در این مطالعه

References

- Ahmadi, E., Soleimanjahi, H., Sadeghizadeh, M., Teimoori, A. (2012). Rearrangement bovine rotavirus production by multiplication with a high proportion Infectivity of the virus in cell culture and proliferation of other nonstructural genes by RT-PCR method. *Modares J Med Sci Pathobiol*, 15(3), 1-9.
- Bányai, K., Esona, M.D., Mijatovic, S., Kerin, T.K., Pedreira, C., Mercado, J., Balmaseda, A., Perez, M.C., Patel, M.M., Gentsch, J.R. (2009). Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrhetic child, Nicaragua. *J Clin Virol*, 46, 391-393. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.08.005> PMID: 19775934
- Cashman, O., Lennon, G., Sleator, R.D., Power, E., Fanning, S., O'Shea, H. (2010). Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. *Vet Microbil*, 146, 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.012> PMID: 20541335
- Desselberger, U. (2000). *Rotaviruses: Methods and Protocols*, Vol 34. (1st ed.) Humana Press. Inc. Cambridge, UK. p. 187-218
- Desselberger, U., Wolleswinkel-van den Bosch, J., Mrukowicz, J., Rodrigo, C., Giaquinto, C., Vesikari, T. (2006). Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatric Infect Dis J*, 25, S30. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000197707.70835.f3> PMID: 16397427
- Estes, M.K., Kapikian, A.Z. (2007). Rotaviruses, In: *Fields Virology*. Knipe, D.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Straus, S.E., Howley, P.M., Martin, M.A., Roizman, B. (eds.). (5th ed.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. p.1917-1958.
- Farahtaj, F., Gallimore, C., Iturriza-Gomara, M., Taremi, M., Zali, M., Edalatkhah, H., Fayaz, A., Gray, J. (2007). Rotavirus VP7, VP4 and VP6 genotypes co-circulating in Tehran, Iran, between 2003 and 2004. *Epidemiol Infect*, 135, 834-838. <https://doi.org/10.1017/s0950268806007485> PMID: 17109772
- Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J., White, D.O. (1987). *Veterinary virology*. (1st ed.) Academic Press Inc. Ltd. London, UK. p. 590-595.
- Gentsch, J.R., Laird, A.R., Bielfelt, B., Griffin, D.D., Bányai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., Kirkwood, C.D. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Glob Infect Dis*, 192, S146. <https://doi.org/10.1086/431499>

- PMID: [1710977](#)
10. Ghosh, S., Varghese, V., Samajdar, S., Sinha, M., Naik, T.N., Kobayashi, N. (2007). Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P [14] and G10P [14] strains. *J Clin Microbiol*, 45, 2751-2753. <https://doi.org/10.1128/jcm.00230-07> PMID: [17537935](#)
 11. Gombold, J.L., Ramig, R.F. (1986). Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *J Virol*, 57(1), 110-116. PMID: [3001336](#)
 12. Gouvea, V., Santos, N., Timenetsky, Mdo.C. (1994). Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*, 32, 1338-1340. PMID: [8051263](#)
 13. Graham, A., Kudesia, G., Allen, A.M., Desselberger, U. (1987). Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. *J Gen Virol*, 68(1), 115-122. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-1-115> PMID: [3027239](#)
 14. Iturriza Gómara, M., Green, J., Brown, D.W.G., Desselberger, U., Gray, J.J. (1999). Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *J Virol Methods*, 78, 93-103. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00168-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00168-2) PMID: [10204700](#)
 15. Iturriza-Gómara, M., Isherwood, B., Desselberger, U., Gray, J.I.M. (2001). Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol*, 75(8), 3696-3705. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3696-3705.2001> PMID: [11264359](#)
 16. Khalili, B., Cuevas, L., Reisi, N., Dove, W., Cunliffe, N., Hart, C.A. (2004). Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Iranian children. *J Med Virol*, 73, 309-312. <https://doi.org/10.1002/jmv.20092> PMID: [15122809](#)
 17. Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Kapikian, A., Ebina, T., Ishida, N. (1982). Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. *J Clin Microbiol*, 16, 727-730. PMID: [6296195](#)
 18. Madadgar, O., Nazaktabar, A., Keivanfar, H., Salehi, T.Z., Zadeh, S.L. (2015). Genotyping and determining the distribution of prevalent G and P types of group A bovine rotaviruses between 2010 and 2012 in Iran. *Vet Microbiol*, 179(3), 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.024> PMID: [26072368](#)
 19. Maunula, L., von Bonsdorff, C.H. (2002). Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol*, 76(23), 11793-11800. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.11793-11800.2002> PMID: [12414921](#)
 20. Midgley, S.E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsager, C.K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L.E., Monini, M., Poljšak-Prijatelj, M. (2012). Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol*, 156(3), 238-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.027> PMID: [22079216](#)
 21. Modarres, S., Modarres, S., Oskoi, N.N. (1995). Rotavirus infection in infants and young children with acute gastroenteritis in the Islamic Republic of Iran. *La Revue de Sante de la Mediterranee Orientale*, 1(2), 210-214.
 22. Monini, M., Cappuccini, F., Battista, P., Falcone, E., Lavazza, A., Ruggeri, F.M. (2008). Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003-2005. *Vet Microbiol*, 129, 384-389. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.036> PMID: [18191347](#)
 23. Papp, H., Matthijssens, J., Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K. (2013). Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. *Vaccine*, 31, 5627-5633. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.045> PMID: [23994380](#)
 24. Reidy, N., Lennon, G., Fanning, S., Power, E., O'Shea, H. (2006). Molecular characterisation and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002-2004. *Vet Microbiol*, 117, 242-247. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.05.004> PMID: [16844325](#)
 25. Schumann, T., Hotzel, H., Otto, P., Johne, R. (2009). Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology*, 386(2), 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2009.01.040> PMID: [19249805](#)
 26. Snodgrass, D., Ojeh, C., Campbell, I., Herring, A. (1984). Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. *J Clin Microbiol*, 20, 342-346. PMID: [6092421](#)
 27. Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R. (2013). Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol*, 94(1), 136-142. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047381-0> PMID: [23052396](#)
 28. Unicomb, L.E., Podder, G., Gentsch, J.R., Woods, P.A., Hasan, K.Z., Faruque, A.S.G., Albert, M.J., Glass, R.I. (1999). Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol*, 37(6), 1885-1891. PMID: [10325342](#)



Study on the Reassortment and the Presence of G genotypes of Bovine Group A Rotaviruses in the Human Rotaviruses in Tehran

Omid Madadgar¹, Seyed Masoud Hosseini², Ahmad Nazaktabar³, Abbas Barin¹, Faeze Jahangiri², Ahmad Vahedi¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technology, Amol, Iran

[10.22059/jvr.2020.201477.2439](https://doi.org/10.22059/jvr.2020.201477.2439)

Received 12 October 2019, Accepted 18 December 2019

Abstract

BACKGROUND: Rotavirus Group A is one of the most important causes of gastroenteritis as it is isolated from 30 to 50% of infant diarrhea from humans and other animals. G genotype of the virus is determined by gene sequence of a surface protein of the virus (VP7), one of the most important factors in inducing immunity against the virus which acts very specific to each genotype.

OBJECTIVES: In the present study the presence of common bovine rotavirus genotypes A was examined in human rotavirus population.

METHODS: A total of 100 stool samples from children under 2 years of age in Tehran and Varamin were collected and to track the presence of rotavirus A, were evaluated using ELISA method. Positive samples were isolated and cultured on the MA-104 cell line after several passages. The positive samples (49 samples) were determined to be the G type using semi-nested RT-PCR and primers specific for bovine common genotype.

RESULTS: From 100 samples, 49 were positive in ELISA. Eight samples in the first semi nested RT-PCR showed the desired rotavirus bands and in the second round, the results were positive for the presence of bovine VP7 in two samples taken from Varamin, in one sample, G6, and in another sample, two genotypes of VP7, G6 and G8 were detected, indicating infection with at least two strains of human rotavirus reassortant. Six of the ELISA selected positive samples that were taken to the cell line MA104, showed effects of cell damage (CPE) after 4-5 consecutive passages, demonstrating proliferation of the rotaviruses of this study and so, their viability was confirmed.

CONCLUSIONS: The results of this study indicate reassortment between bovine and human rotaviruses and show that in case of occurrence of bovine and human rotavirus infection and the emergence of new human type, due to reassortment strain differences in protein immunogen it is possible to overcome due to lack of maternal immunity in the human population and low efficiency of current vaccines and, ultimately, epidemic and considerable losses may occur. Hence, more research is warranted.

Keywords: Group A rotavirus, Gastroenteritis, Reassortment, VP7, G genotyping

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: madadgar@msu.edu Tel/Fax: 021-61117053, 021-66933222

How to cite this article:

Madadgar, O., Hosseini, S., Nazaktabar, A., Barin, A., Jahangiri, F., Vahedi, A. (2020). Study on the Reassortment and the Presence of G genotypes of Bovine Group A Rotaviruses in the Human Rotaviruses in Tehran, J Vet Res, 75(1), 118-125.
<https://doi.org/10.22059/jvr.2020.201477.2439>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Characteristics and sequences of each primer used in this study.

Figure 1. Cytopathic Effect (CPE) of one Elisa positive sample cultured in MA104 cell line after four passages.

Figure 2. Semi-nested RT-PCR and positive bovine origin G bands; one sample with one band size of 222 bp (G8 genotype) and another sample with two band sizes of 222 bp (G8 genotype) and 448 bp (G6 genotype).