



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة ديالى  
كلية التربية للعلوم الصرفة  
قسم علوم الحياة

## دراسة سيرلولوجية وتنميط جيني عن فايروس العجلى في الاطفال والعجول في محافظة ديالى

اطروحة

مقدمة مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من  
متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

عمار طالب ناصر

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2008

ماجستير علوم حياة/ احياء مجهرية/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى

2014

باشراف

الدكتور

عامر خزعل صالح

استاذ

الدكتور

عبدالرزاق شفيق حسن

استاذ

## Chapter One

### 1. Introduction

Rotavirus is classified in the family Reoviridae and is a non-enveloped double-stranded RNA (dsRNA) viruses that have a complex architecture of three concentric capsids that surround a genome of 11 segments of dsRNA (Matthijnssens *et al.*, 2011). The RNA segments encode six structural viral proteins (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 and VP7) and six non-structural proteins (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6). The proteins in the mature virus particle determine host specificity, cell entry and enzymatic functions necessary for the production of viral transcripts, and contain epitopes that generate immune responses. The non-structural proteins are involved in genome replication and antagonism of the innate immune response (a particular role for NSP1) and include the viral enterotoxin NSP4 (McDonald and John, 2011; Hu *et al.*, 2012; Gomez-Rial *et al.*, 2019).

Ten different rotavirus species (A–J) have been classified on the basis of sequence and antigenic differences of VP6. they are the most common cause of infections in children. Species A rotaviruses are further classified into different genotypes, based on sequence differences in RNA segments 7 and 4 encoding VP7 and VP4, respectively, whereby glycoprotein (G, or VP7) and protease-cleaved protein (P, or VP4) subtypes are differentiated. To date, 32 VP7genotypes and 47VP4genotypes of species A rotavirus have been identified, although globally, six G types (that is, G1, G2, G3, G4, G9 and G12) and three P types (P[4], P[6] and P[8]) predominate (McDonald and John, 2011). In addition, six strains of species A rotavirus generally account for > 90% of globally circulating species A rotavirus: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] and G12P[8] (Hakan and Osman, 2017; Mary-Theresa *et al.*, 2017).

Geographical differences in species A rotavirus strain distribution have been observed, with more strains causing rotavirus disease in children in low-income

countries than those in high-income countries (Vasco *et al.*, 2014). Human species A rotavirus strains that have a high degree of genetic homology with animal strains have been identified, and direct animal-to-human transmission can occur, particularly in low-income countries (Alicia *et al.*, 2018). Virus evolution is driven by the accumulation of point mutations and genome reassortment, which can occur after dual infection of individual cells by different species A rotavirus strains, leading to viral progeny with combinations of the parental genomes. In the East Mediterranean countries, the circulating rotavirus strain prevalence has changed post vaccination where G9P[8], G2P[4], and G9P[4] have become more dominant. Proportion of rotavirus strains in these countries after vaccination has significantly reduced. there is an increase in circulating strain G2P[4] in the post-vaccination period (Almalki, 2018).

Diarrheal diseases are one of the leading causes of illness and death in children being responsible for 500,000 deaths per year globally. Before the 1970s, the etiologic agent in many cases of infantile gastroenteritis was not identified, but a breakthrough occurred in 1973 with the identification of virus particles in duodenal biopsy samples from children with severe diarrhea and in fecal samples from children with acute diarrhea (Martinez-Gutierrez *et al.*, 2019). The name rotavirus (adapted from the Latin word ‘rota’, which translates to wheel) was assigned to this newly discovered virus because of its distinct morphological appearance. Rotaviruses acute gastroenteritis is one of the leading causes of childhood mortality worldwide and accounts for 15% of all deaths in younger children. Most of these deaths occur in malnourished infants from countries of lower socioeconomic status and from the disadvantaged rural regions of Africa and Asia (Vasco *et al.*, 2014; Mokomane *et al.*, 2018).

Rotavirus is also the main viral agent associated to gastroenteritis in animals, and was isolated in several species of domesticated and wild mammals, as well as in birds. These infections cause significant economic losses in livestock –

cattle, swine and horses, because of cost of treatment and weight loss by affected animals. (Dhama *et al.*, 2009; Martella *et al.*, 2010).

The interspecies capacity of rotavirus A transmission among mammal species was demonstrated in early 1980's. Calves were found to be susceptible to rotavirus A infection of rabbits, which, in turn, had been infected with bovine rotavirus A. Calves are equally susceptible to rotavirus A infection of simian. Bovine rotavirus A excretion was detected in dogs and cats, and rotavirus A transmission from mammals to birds has already been documented (Schwers *et al.*, 1982; Castrucci *et al.*, 1984). The advent of molecular biology enabled identification of animal rotavirus A strains infecting humans in different parts of the world (Luchs *et al.*, 2012).

The complete genomic sequence analysis of human rotavirus A strains belonging to G3P[3] genotype revealed that both strains are closely related to canine and feline rotavirus A (Tsugawa *et al.*, 2008) The equine rotavirus A seems to have a very close genetic relation with human and swine rotavirus A (Ciarlet *et al.*, 2001). The G3 (common in cats, dogs, pigs and horses), G5 (common in pigs and horses), G6, G8 and G10 (common in cattle) and G9 (common in pigs and sheep) rotavirus A strains were identified in human populations in different parts of the world (Luchs and Timenetsky, 2016). The swine G4, G5, G6 and G8 genotypes were found circulating in humans, calves and camels (Anupam *et al.*, 2013). These data suggested pigs might be the main rotavirus A reservoir and source of emerging strains, in humans and other animals.

In Diyala province, a study to explore the rotavirus infection rate among patients with diarrhea found that the rotavirus is a common cause of diarrhea particularly among children below 5 years of age (Hasan *et al.*, 2011). In another study to figure out the seroprevalence of rotavirus among general population and patients with diarrhea in Diyala province revealed that the

seroprevalence among general population was 37.1% suggesting that about two thirds of Diyala population were liable to rotavirus infection (Hasan, *et al.*, 2012). The implementation of rotavaccine in Iraq was started in 2014. In a study to investigate the efficacy of rotavirus vaccine in Diyala province, it was found that about one quarter of children received RV vaccine following the universally recommended schedule had protective seropositive levels of anti-rotavirus IgG. Monovalent vaccine was more immunogenic than pentavalent irrespective of vaccine doses or duration (Al-Azawi *et al.*, 2020). For the best of our knowledge no previous molecular studies were conducted in this province, therefore, the current study was suggested to detect and sequencing of rotavirus from both human and animals and to investigate the identical rate among them.

### **Aim of the Study**

1. Serological detection of anti-rotavirus IgG and IgM antibodies and rotavirus stool antigen among children and calves with diarrhea.
2. Molecular detection of rotavirus genes from diarrheic stool of children and calves using conventional polymerase chain reaction.
3. Sequencing of rotavirus genome from both PCR products of human and calves to compare between both sequences.

## الخلاصة

تعد الفيروسات العجلية (الروتا) من الفيروسات التي تسبب مرض الإسهال وتعتبر السبب الثامن الرئيس للوفاة السنوية بين جميع الأعمار لأكثر من 11.6 مليون حالة وفاة والسبب الرئيسي الخامس للوفاة بين الأطفال دون سن الخامسة في جميع أنحاء العالم. وفقاً لبيانات لمنظمة الصحة العالمية (WHO) لعام 2015، يؤثر التهاب المعدة والأمعاء بشكل عام على 3 إلى 5 ملايين طفل كل عام ، منهم ما يقرب من (12 %) من الأطفال الذين تقل أعمارهم عن 5 سنوات في عام 2015 ، وهو مسؤول عن ما يقرب من 446000 حالة وفاة.

أجريت هذه الدراسة في محافظة ديالى. أهداف هذه الدراسة تميل إلى الكشف المصلي عن الأجسام المضادة IgG و IgM بالإضافة إلى مستضد فيروس الروتا في براز الأطفال الذين يعانون من القيء والإسهال مقارنة بالعجول المصابة بالإسهال. تم جمع عينات المصل والبراز من مستشفى بعقوبة التعليمي ، ومستشفى البتول التعليمي للولادة والطفل ، والمستشفى البيطري السريري ، وكذلك من العيادات الخارجية في محافظة ديالى. أجريت الدراسة على مدى الفترة من 16 أكتوبر 2019 إلى 12 فبراير 2020. الكشف الجزيئي الذي استهدف بعض جينات فيروس الروتا في عينات برازية للأطفال والعجول باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي (PCR). تمت مقارنة تسلسل جينوم الفيروس العجلية من كل من ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل للإنسان والعجل في كلا التسلسل. تحديد التنوع الجيني من خلال متواليات النيوكليوتيدات المحلية ، والشجرة الوراثية التطورية داخل العزلات المحلية ومقارنتها مع تسلسلات وأخيراً المقارنة الجينية لعزلات الفيروس العجلي مع عزلات أخرى من بلدان مختلفة من خلال محاذاة تسلسلات متعددة لهذه العزلات الدولية المتاحة في قاعدة بيانات NCBI.

تم الكشف المصلي عن فيروس الروتا IgM و IgG للإنسان والعجول باستخدام تقنية الاليزا (ELISA SUNRed). وبالمثل ، تم أيضاً اكتشاف فيروس الروتا Ag في براز الإنسان والعجول بواسطة تقنية الاليزا (ELISA DRG).

كانت نتائج IgM المضادة للفيروس العجلي إيجابية في 71% من الأطفال مع وجود فرق معنوية إحصائياً (P = 0.001). كما أظهرت النتائج أن 81% من الأطفال كانوا إيجابيين لفيروس الروتا IgG مقابل 19% كانوا سلبيين مع وجود فرق معنوي إحصائياً (P = 0.0001). كان اكتشاف مستضد فيروس الروتا البرازي إيجابياً في 75% من الأطفال. في العجول كان معدل إيجابية IgM المضادة للفيروس العجلي 80% مع اختلاف معنوي 79% كانت موجبة لفيروس الروتا

IgG فرق معنوي ( $P = 0.0001$ ) لكل من معدل إيجابية البراز لفيروس الروتا Ag في العجول كانت 68%. كان الاختلاف الإحصائي معنوياً ( $P = 0.01$ ).

أظهرت النتائج بشكل عام أن الرضاعة بالزجاجة (75.7%) والتغذية المختلطة (78.6%) كلاهما مرتبطان بمعدلات أعلى من إيجابية IgM ضد فيروس الروتا مقارنة بالأطفال الذين يرضعون من الثدي (65.3%). ومع ذلك ، فشل الفرق في الوصول إلى مستويات ذات دلالة إحصائية ( $P = 0.460$ ). وجدت النتائج أيضاً أن 91.8% من الأطفال المقيمين في المناطق الريفية كانوا إيجابيين لمضاد IgG بينما كان 64.1% من الأطفال المقيمين في المناطق الحضرية موجبين لـ IgG المضاد لفيروس الروتا ، وبالتالي كان الاختلاف ذا دلالة إحصائية ( $P = 0.001$ ).

كان للرضع الذين يرضعون من الثدي أعلى معدل إيجابي للإصابة بفيروس الروتا (85.7%) مقارنة بأنواع التغذية الأخرى. كان الفرق ذو دلالة إحصائية ( $P = 0.048$ ). أظهرت النتائج أن 72.3% من الأطفال الذين يعانون من القيء كانت لديهم موجبة IgG. في حين أن 88.7% من الأطفال غير المصابين بالـ IgG يعانون من القيء. كان الفرق ذو دلالة إحصائية ( $P = 0.038$ ).

أظهرت هذه الدراسة أن المتوسط  $\pm$  SD الانحراف المعياري IgM المضاد لفيروس الروتا كان أعلى بشكل ملحوظ بين الأطفال الذين كانوا إيجابيين IgM ( $2.883 \pm 3.423$ ) مقارنةً بـ ( $P = 0.0001$ ). على العكس من ذلك ، كان المتوسط  $\pm$  SD الانحراف المعياري المضاد لفيروس الروتا أعلى بكثير. كان IgG المضاد للفيروس العجلي أعلى بشكل ملحوظ بين هؤلاء الأطفال الذين كانوا سلبيين من IgM المضاد للفيروس العجلي ( $3.952 \pm 2.539$ ) مقارنةً بنظرائهم ( $P = 0.41$ ).

كان مستضد الفيروس العجلي البرازية أعلى بين الأطفال الذين كانوا إيجابيين لـ IgM 83.1% المضاد لفيروس الروتا. كان الفرق ذو دلالة إحصائية ( $P=0.003$ ). حيث أن ارتباط نتائج PCR له علاقة غير مهمة مع فيروس الروتا IgM المضاد ( $P=0.793$ ).

تم فحص واحد وستين عينة براز باستخدام تقنية PCR التقليدية التي تستهدف جين VP7 ، وتم الكشف عن الحمض النووي الريبي لفيروس الروتا في 25 عينة بنسبة 41.0%. كان الفرق ضئيلاً من الناحية الإحصائية ( $P = 0.421$ ). فيما يتعلق بالعجول ، من بين 45 عينة تم تحليلها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل ، كان لدى 13 (28%) فيروس روتا RNA قابل للاكتشاف.

كان الفرق ضئيلاً من الناحية الإحصائية ( $P = 0.084$ ). تم إرسال ناتج تفاعل البلمرة (PCR) لـ 25 طفل و 13 عجلاً للتسلسل.

أشارت النتائج إلى وجود أحد عشر فرقاً في الأحماض النووية موزعة في جميع العينات التي تم فحصها تقريباً. أظهرت غالبية الاختلافات التي تم تحديدها توزيعاً متساوياً نسبياً بين كل من الفيروسات المعزولة من البشر والعجول. أشار تحليل الشجرة الشامل للتطور إلى أن العينات الفيروسية العجالية التي تم فحصها تنتمي إلى النمط الجيني [8]-P-G1.