



تریپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس های عامل اسهال ویروسی گوساله ها: مقاله مروری

روزبه فلاحی*

دانشیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۰۶ خرداد ۱۴۰۳، بازنگری: ۱۵ مرداد ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۷ مرداد ۱۴۰۳



10.22034/nfvm.2024.459586.1242

چکیده

روتاویروس های گروه A، عامل اصلی اسهال در اکثر گونه های دام هستند و مرگ و میر گوساله های زیر یک ماه به دلیل اسهال روتاویروسی در بسیاری از کشورها شایع است و هر ساله خسارات اقتصادی هنگفتی را به بار می آورد. برای تشخیص سریع بیماری می توان از روش های سرولوژیکی و مولکولی استفاده کرد، اما جداسازی و شناسایی ویروس با توجه به خصوصیات بیولوژیکی و ساختار خاص آن با روش های معمول بسیار دشوار بوده و به روش های خاص کشت سلول و نیز تیره های سلولی مناسب احتیاج دارد. تلاش برای تهیه واکسن از سویه های بومی جدا شده در هر کشور به کنترل، مبارزه و احیاناً ریشه کن کردن آن کمک می کند و تا حد زیادی از زیان های اقتصادی ناشی از این بیماری جلوگیری می کند. به طور کلی، روتاویروس ها به مقدار کمی تنها در تعداد محدودی از تیره های سلولی تکثیر می شوند و عفونت لازم برای جداسازی ویروس را در کشت های سلولی ندارند. اما وجود تریپسین در شرایط خاصی باعث افزایش تکثیر و تیتراژ ویروس در کشت سلولی می شود. از طرف دیگر، تریپسین بیش از حد در کشت سلولی نیز برای سلول سمی بوده و باعث مرگ سلولی می شود. این مقاله به تشریح عملکرد تریپسین در عفونت زایی روتاویروس ها و روش استاندارد و کاربردی در غلظت غیر سمی آن برای تیره های سلولی مناسب جهت جداسازی روتاویروس ها می پردازد.

واژگان کلیدی: کشت سلولی، جداسازی، روتاویروس، تریپسین، اسهال ویروسی گوساله ها

مقدمه

روتاویروس‌ها عامل اصلی اسهال در حیوانات پرورشی در جهان هستند. علائم بالینی، تشخیص و اپیدمیولوژی این بیماری در همه گونه‌ها یکسان است (۱، ۲). روتاویروس‌ها اغلب باعث اسهال در گوساله‌های ۱ تا ۲ هفته‌ای می‌شوند. برخی از گوساله‌ها مجدداً با روتاویروس‌ها آلوده می‌شوند و یا به‌طور مداوم ویروس را از طریق مدفوع دفع می‌کنند، اما عفونت در گوساله‌های مسن (بیش از یک ماه) اغلب تحت بالینی است (۲). اسهال روتاویروسی سلامت گوساله‌ها را به خطر می‌اندازد و تولید را در گاوها کاهش می‌دهد. همچنین منجر به کاهش وزن و افزایش مرگ و میر می‌شود. همچنین پتانسیل ابتلا به بیماری مشترک بین انسان و دام را نیز دارد (۳). هفت گروه روتاویروسی از A تا G وجود دارد. گروه‌های A، B و C در انسان و حیوانات یافت می‌شوند، در حالی که ویروس‌های گروه D، E، F و G فقط در حیوانات وجود دارند (۷-۳). این گروه‌ها با پروتئین کپسید میانی (VP6) مشخص می‌شوند. مهم‌ترین مشخصه آنتی‌ژنی روتاویروس‌ها ویژگی سروتیپی آنهاست و بر اساس تعریف نوع تعیین شده توسط روش‌های سرولوژیکی و عمدتاً با آزمایش‌های خنثی‌سازی است. در هر گروه از روتاویروس‌ها، سروتیپ‌ها بر اساس تست‌های کاهش پلاک و خنثی‌سازی با سرم هیپرایمیون به چند سروتیپ تقسیم می‌شوند. همچنین طبق تعریف، ژنوتیپ نوعی است که با روش‌های غیر سرولوژیکی مانند RT-PCR، هیبریداسیون یا تعیین توالی ژنومی تعیین می‌گردد. با استفاده از این آزمایش‌ها، حدود ۱۴ سروتیپ و ۵۱ ژنوتیپ از پروتئین VP7 شناسایی شده که نوع G نامیده می‌شوند و ۱۴ سروتیپ و ۵۸ ژنوتیپ از پروتئین VP4 که نوع P نامیده می‌شوند (۴، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱). تکنیک‌های کشت سلولی معمولاً برای جداسازی ویروس برای اهداف تشخیصی و همچنین تکثیر ویروس برای تولید واکسن یا شناسایی بیشتر ویروس از نظر تنوع آنتی‌ژنی یا تعیین توالی ژن‌های آن استفاده می‌شوند. به‌طور کلی جداسازی روتاویروس‌ها

در شرایط آزمایشگاهی به چند دلیل بسیار مشکل است. این ویروس‌ها را نمی‌توان به‌طور معمول از نمونه‌های مدفوع جدا کرد (۱۲). این ویروس‌ها تنها در تعداد محدودی از تیره‌های سلولی و به میزان کمی تکثیر می‌شوند و عفونت لازم برای جداسازی ویروس را ندارند. اما وجود آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند تریپسین در شرایط خاصی باعث افزایش تکثیر و تیترا ویروس در کشت‌های سلولی می‌شود. از طرف دیگر، مقدار بیش از حد این آنزیم‌ها در کشت سلولی سمی بوده و باعث مرگ سلولی می‌شوند. بنابراین، یک روش استاندارد و عملی در غلظت غیر سمی آن با استفاده از تیره سلولی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌ها ضروری است (۳).

ویژگی‌های روتاویروس‌ها: روتاویروس‌ها از خانواده رئوویریده (Reoviridae) هستند. ذرات کامل ویروسی بدون پوشش بوده و دارای قطر ۷۵-۱۰۰ نانومتر می‌باشند و از یک کپسید پروتئینی سه‌لایه متشکل از یک لایه بیرونی، یک لایه میانی و یک لایه داخلی تشکیل شده‌اند. این ویروس‌ها به گرما و pH بسیار مقاوم هستند (۴، ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵). ۶۰ زائده به طول ۱۲۰ آنگستروم از سطح صاف لایه بیرونی بیرون آمده و به این ویروس ظاهری چرخ‌مانند داده است. شکل ظاهری روتاویروس‌ها به دلیل پروتئین VP6 (لایه میانی) است (۱۳، ۱۵). ژنوم این ویروس‌ها دارای ۱۱ قطعه RNA دو رشته‌ای (dsRNA) است (۱، ۳، ۶، ۷، ۸، ۱۳، ۱۵، ۱۶). این ویروس‌ها دارای RNA پلیمرز وابسته به RNA و سایر آنزیم‌هایی هستند که قادر به تولید نسخه‌های RNA سرپوش‌دار می‌باشند (۱، ۳، ۱۳). به دلیل وجود ژنوم‌های قطعه قطعه شده، بازآرایی ژنتیکی اغلب در این ویروس‌ها دیده می‌شود (۱، ۳، ۱۳). تکثیر ویروس در سیتوپلاسم سلول‌های آلوده رخ می‌دهد (۱، ۳، ۱۳). کشت ویروس در شرایط آزمایشگاهی با افزودن آنزیم‌های پروتئولیتیک تسهیل می‌شود. این آنزیم‌ها از طریق جداکردن پلی‌پپتید کپسید VP4 خارجی به VP5 و VP8، باعث افزایش عفونت و تسهیل ورود ویروس به سلول‌ها می‌شوند. VP8

تریپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌های ...

تلقیح سریع به تیره‌های سلولی بدون نگهداری در فریزر نیز به فرآیند جداسازی ویروس کمک می‌کند (۵، ۱۰، ۱۸). تهیه سوسپانسیون مدفوعی ۱۰٪ با استفاده از محلول فسفات بافر سالین (PBS) (۱ گرم مدفوع در ۱۰ میلی‌لیتر PBS، pH=۷/۲) جهت جداسازی ویروس از نمونه‌های مدفوعی که از نظر آلودگی روتاویروس در تست‌های تشخیصی مثبت هستند صورت می‌گیرد. برای مخلوط و همگن کردن سوسپانسیون، می‌توان از دستگاه ورتکس (Vortex) استفاده کرد یا می‌توان آن را به صورت دستی انجام داد (۱، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۱). سپس سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ °C به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه و برداشت مایع رویی به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر صورت می‌گیرد (۵، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴). مرحله بعد عبور دادن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون برای حذف باکتری‌های موجود در مدفوع و ریختن آن در میکروتیوب‌های استریل، تریپسینه کردن نمونه با تریپسین به میزان ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و انکوباسیون در دمای ۳۷ °C به مدت ۳۰ دقیقه می‌باشد (۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۸، ۲۱). شستشوی سلول‌های MA104 رشد یافته (با سطح پوششی ۹۰-۸۰ درصد) در لوله‌های کشت سلولی و فلاسک‌های کشت سلولی ثابت (شکل‌های ۱ و ۲) با محلول PBS یا محیط کشت، برای سه مرتبه به منظور حذف سرم از کشت سلولی صورت می‌گیرد (۶، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۸). مرحله بعد، تلقیح نمونه تریپسینه شده به سلول‌های رشد یافته MA104 در لوله‌های کشت سلولی و فلاسک‌های کشت سلولی ثابت می‌باشد. مقدار تلقیح برای لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری با سطح کشت ۶ سانتی‌متر مربع، ۰/۵-۰/۲ میلی‌لیتر و برای فلاسک‌های کشت سلولی با سطح کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع، ۱ میلی‌لیتر است (۵، ۶، ۱۰). اعلام شده‌اند، به‌عنوان کنترل منفی تلقیح می‌شوند (۶، ۱۰). همچنین در هر سری از کار، یک فلاسک و لوله کشت سلولی حاوی همان سلول، بدون تلقیح نمونه مدفوع و تلقیح با محلول PBS در شرایط مشابه به همراه

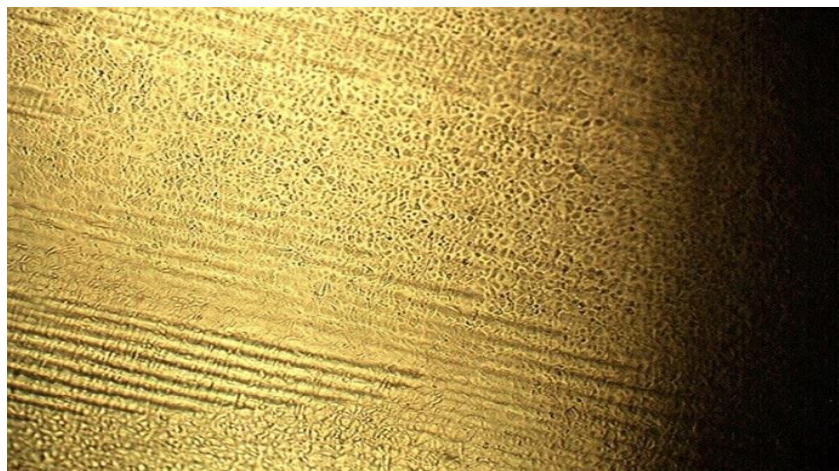
با گیرنده‌های روی سلول میزبان که برای اتصال ویروس ضروری هستند، تعامل دارد و باعث افزایش عفونت روتاویروس‌ها می‌شود و VP5 می‌تواند نفوذ غشای سلولی را افزایش دهد (۱، ۳، ۶، ۱۱، ۱۳). این ویروس‌ها سیر مورفونیک منحصر به فردی دارند به‌عنوان مثال، ذرات ویروس با جوانه زدن به شبکه آندوپلاسمی تشکیل می‌شوند و به‌طور موقت دارای یک غشاء می‌شوند. ویروس‌های بدون غشاء با لیز سلول آلوده آزاد می‌شوند (۲، ۹). روتاویروس‌ها دارای شش پروتئین ساختمانی شامل VP1، VP2، VP3، VP4، VP6، VP7 و VP7 و شش پروتئین غیر ساختمانی هستند (۴، ۷، ۸، ۱۰، ۱۴، ۱۵). VP4 یک هم‌گلوتینین است و در بسیاری از سویه‌های ویروس وجود دارد و نقش اتصال ویروس به سلول را ایفا می‌کند. به موجب اثر پروتئولیتیکی تریپسین، VP4 به دو پروتئین VP5 (با وزن مولکولی تقریبی ۶۰ کیلودالتون) و VP8 (۲۸ کیلودالتون) تبدیل شده که نفوذ ویروس را به داخل سلول تسهیل می‌کند و باعث افزایش عفونت و تیتراژ ویروس می‌شود (۱۶، ۱۷). اگر تریپسین به نمونه‌های مدفوع اضافه نشود، عفونت ویروس در کشت سلولی بسیار کاهش می‌یابد و حتی از بین می‌رود (۶، ۱۲، ۱۸). در این حالت ذرات ویروسی با عمل اندوسیتوز از سطح سلول‌ها حذف می‌شوند و بنابراین عفونت رخ نمی‌دهد (۱۹).

مراحل جداسازی روتاویروس‌ها از نمونه‌های

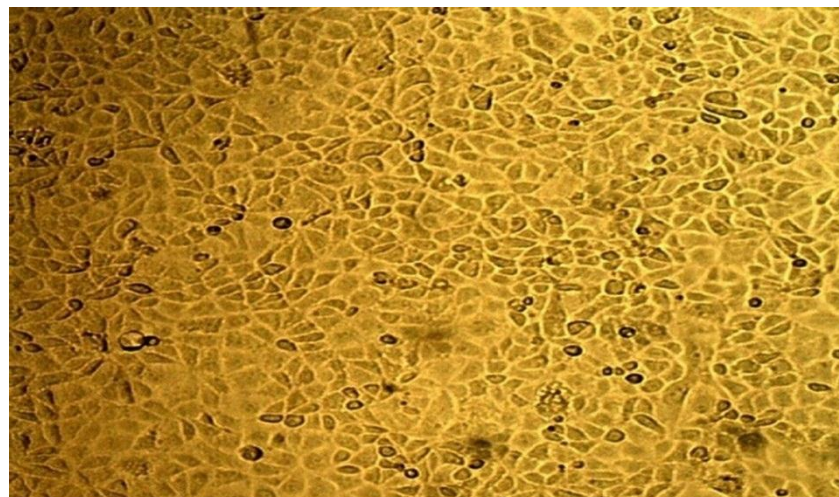
مدفوع به روش تریپسینه کردن: با رعایت اصول اخلاقی، نمونه‌های مدفوع پس از تحریک رکتوم حیوان (گوساله‌های ۳-۰ ماهه) تهیه می‌شود. نمونه‌های مدفوع با کاردک چوبی تهیه شده و در ظروف استریل درب‌دار ریخته می‌شود. پس از ثبت مشخصات آنها در اسرع وقت (کمتر از ۱۲ ساعت) و بر روی یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی منتقل می‌شوند و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰ °C- قرار داده می‌شوند (۱، ۴، ۸، ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۲۰، ۲۱). اگر نمونه‌برداری در زمان شروع بیماری و اوج علائم بالینی انجام شود، احتمال جداسازی ویروس بیشتر است. انتقال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه و آماده‌سازی و

به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه و جمع‌آوری محلول رویی صورت می‌گیرد (۵، ۶، ۱۰). سپس افزودن تریپسین به مقدار ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و قرار دادن در انکوباتور 37°C انجام می‌گردد (۶). لازم به ذکر است که تلقیح در سلول‌های جدید همانند روش قبل صورت می‌گیرد (۶). در صورت عدم مشاهده CPE، پاساژ کور تا ۵ مرتبه متوالی ادامه می‌یابد (۶، ۱۰، ۱۸). یک پاساژ اولیه (P0) و حداقل ۵ پاساژ کور (P1-P5) برای هر نمونه داده می‌شود (۵، ۶، ۱۰). در مجموع در صورت عدم مشاهده CPE در این ۶ پاساژ، می‌توان این نمونه را با اطمینان بالا منفی در نظر گرفت (۵، ۶، ۱۰). در صورت مشاهده CPE در هر پاساژ ممکنه، هنگامی که میزان تخریب سلولی به حدود ۸۰ درصد رسید به فریزر -70°C منتقل می‌شود. عمل ذوب و انجماد برای سه مرتبه انجام و سپس به سلول جدید تلقیح می‌شود (کشت ثابت) و حداکثر ۲-۳ پاساژ دیگر به‌منظور افزایش تیترو ویروس ادامه داده می‌شود. اگر CPE به‌طور مکرر در پاساژهای انجام شده مشاهده گردید، آماده‌سازی جهت تأیید تشخیص با روش RT-PCR انجام می‌گردد (۷-۵). ابتدا روش RT-PCR دو مرحله‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VP6 از نظر روتاو ویروس گروه A بر طبق دستورالعمل‌ها انجام می‌گیرد (۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۲). به‌منظور شناسایی ژنوتیپ نمونه‌های مثبت روتاو ویروس، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VP7 برای شناسایی ژنوتیپ G و پرایمرهای اختصاصی ژن VP4 برای ژنوتیپ P انجام می‌گیرد (۵، ۶، ۸، ۱۱). به‌منظور شناسایی ژنوتیپ G نمونه‌های مثبت روتاو ویروس از محصول اولیه PCR ژن VP7، واکنش Semi nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ‌های G5، G6، G8، G10، G11 و غیره برای تعیین تایپ G انجام می‌شود (۷-۵). RT-PCR مؤثرترین روش برای تایپ نمونه‌های مثبت روتاو ویروس می‌باشد. PCR نسبت به روش‌های سروتا پینگ مانند الیزا حساس‌تر و سریع‌تر است (۶، ۲۳، ۲۴).

نمونه‌های تلقیح شده به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود (۶، ۱۰). انکوباسیون در دمای 37°C به مدت ۱-۱/۵ ساعت به‌منظور جذب ویروس به داخل سلول انجام می‌گیرد. لوله‌های کشت سلولی تلقیح شده در دستگاه کشت لوله چرخان که در انکوباتور است قرار داده می‌شوند (شکل ۳) سرعت چرخش دستگاه کشت لوله چرخان بر روی $0/4$ دور در دقیقه تنظیم می‌شود که کند می‌باشد. فلاسک‌های کشت ثابت نیز در انکوباتور قرار داده می‌شوند (۶، ۷، ۱۸). نمونه تلقیح شده در پایان زمان جذب ویروس از لوله‌ها و فلاسک‌های کشت سلولی تخلیه نمی‌گردد (۶). مرحله بعد افزودن محیط (Dulbecco's Modified Eagle Medium) DMEM حاوی گلوکز بالا، تریپسین و محیط تریپتوز فسفات برات (TPB) جهت غنی‌سازی می‌باشد (تریپسین به میزان $0/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر و محیط TPB به میزان ۱۰ درصد به DMEM اضافه می‌شود). مقادیر بیشتر از $0/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر تریپسین در محیط کشت، باعث سمیت سلولی می‌شود (۶، ۷، ۱۰، ۲۱). مرحله بعد قرار دادن لوله‌های کشت سلولی تلقیح شده در دستگاه کشت لوله چرخان و فلاسک‌های کشت سلولی تلقیح شده در انکوباتور 37°C می‌باشد (۶). به مدت ۱۴ روز، همه لوله‌ها و فلاسک‌های کشت سلولی روزانه زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده می‌شوند تا اثرات ضایعات سلولی (CPE) مشاهده شود (۵، ۶). در عرض ۱۴ روز پس از بررسی کشت‌های سلولی، در صورت تغییر شدید pH، با استفاده از اسید کلریدریک (HCl) یک نرمال و یا سود سوزآور (NaOH) یک نرمال pH تنظیم می‌گردد (۶). در صورت عدم مشاهده CPE در ۱۴ روز پس از بررسی، لوله‌ها و فلاسک‌ها به فریزر -70°C منتقل می‌شوند تا از آنها پاساژ کور تهیه شود (۶، ۱۸). برای این کار عمل ذوب و انجماد برای سه مرتبه انجام می‌شود (ذوب در دمای اتاق و انجماد در فریزر -70°C) سپس جمع‌آوری نمونه از لوله‌ها یا فلاسک‌های کشت سلولی به مقدار کافی و سانتریفیوژ در $3000-4000$ دور در دقیقه



شکل ۱- سلول های MA104 رشد یافته در سیستم کشت لوله چرخان (بزرگنمایی: x ۲۵) (۶)



شکل ۲- سلول های MA104 رشد یافته در سیستم کشت سلولی ثابت (بزرگنمایی: x ۴۰) (۶)



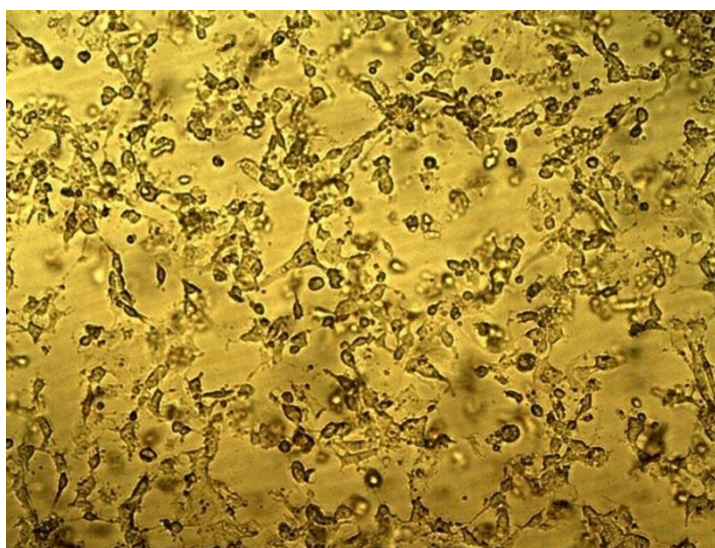
شکل ۳- دستگاه کشت لوله چرخان حاوی لوله های کشت سلولی تلقیح شده در انکوباتور 37°C (۶)

می‌یابد. به طوری که در آخرین پاساژها CPE، ۱-۲ روز پس از تلقیح مشاهده می‌شود و سریع‌تر از قبل (پس از ۱-۲ روز از شروع CPE) به حداکثر میزان تخریب می‌رسد. CPE را می‌توان به صورت گرد، تیره، طویل و مثلثی شدن سلول‌ها و تخریب تدریجی شبیه به رشته‌ای از مروارید مشاهده کرد. در نمونه‌های کنترل منفی، هیچ‌گونه آسیب سلولی پس از پاساژ اولیه و کور نباید مشاهده شود.

معمولاً ظهور CPE از روز سوم یا چهارم پس از تلقیح شروع می‌شود و پس از ۲-۳ روز به حداکثر تخریب سلولی می‌رسد که حدود ۸۰-۹۰ درصد است (شکل‌های ۴ و ۵). در حداکثر تخریب سلولی، لوله‌ها و فلاسک‌های حاوی CPE به فریزر 70°C منتقل می‌شوند و پس از ۳ مرتبه عمل ذوب-انجماد، مجدداً بر روی سلول‌های جدید تلقیح می‌شوند و این کار تا ۳-۴ مرتبه ادامه می‌یابد. با افزایش تعداد پاساژها، زمان ظهور CPE پس از تلقیح کاهش



شکل ۴- CPE در سلول‌های MA104 در سیستم کشت لوله چرخان (بزرگنمایی: x ۲۵) (۵، ۶)



شکل ۵- CPE در سلول‌های MA104 در سیستم کشت سلولی ثابت (سلول‌های آسیب‌دیده بزرگ، گرد، تیره، مثلثی و گرانوله) (بزرگنمایی: x ۴۰) (۵، ۶)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت روتاویروس در گوساله‌ها باعث خسارات اقتصادی سنگین به دلیل سرایت و مرگ و میر، هزینه‌های بالا و همچنین کاهش رشد می‌شود. روتاویروس‌ها تنوع آنتی‌ژنی زیادی دارند و این مسئله مشکلاتی را در تشخیص، اپیدمیولوژی و واکسیناسیون ایجاد می‌کند (۱)، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴، ۲۵). روتاویروس‌های گروه A با توجه به ویژگی‌های آنتی‌ژنی و توالی ژنومی پروتئین‌های VP4 و VP7 به ژنوتیپ‌های G و P تقسیم می‌شوند. این ژنوتیپ‌ها را می‌توان با روش‌های سرولوژیکی یا مولکولی شناسایی کرد (۶، ۸، ۱۱). بر این اساس سروتیپ‌ها یا ژنوتیپ‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. تاکنون ۵۱ ژنوتیپ G و ۵۸ ژنوتیپ P در روتاویروس‌های گروه A شناسایی شده‌اند (۸). از میان آنها، ۸ ژنوتیپ G شامل G1، G3، G5، G6، G7، G8، G10 و G11 و ۶ ژنوتیپ P شامل P[1]، P[5]، P[11]، P[14]، P[17] و P[21] در اسهال روتاویروسی گاوی نقش دارند و از بین آنها ژنوتیپ‌های G6، G8 و G10 و همچنین P[1]، P[5] و P[11] به دلیل شیوع بالای آنها در سراسر جهان قابل توجه هستند (۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱). Sunil-chandra و Mahalingam (۱۹۶۶) ۱۵۰ نمونه مدفوع اسهالی و غیر اسهالی از گوساله‌های گاو میش ۱۵۰-۱ روزه از ۷ گاوداری مختلف در سریلانکا را با روش الیزای غیر مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال آزمایش کردند. از این تعداد، ۲۸ نمونه از نظر روتاویروس گروه A مثبت بودند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، آنها را تریپسینه کرده (به میزان ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و به سلول‌های MA104 در سیستم کشت لوله چرخان تلقیح کردند. سپس محیط نگهدارنده حاوی تریپسین (به میزان ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و محیط تریپتوز فسفات مایع را به سلول‌ها اضافه کردند و پس از ۶-۴ پاساژ متوالی موفق به جداسازی ویروس شدند. کشت سلولی در لوله و قرار دادن آن در دستگاه کشت لوله چرخان با سرعت کم، سطح کشت را در تمام دیواره‌های داخلی آنها فراهم کرده و

تریپسینه کردن، روشی مناسب برای جداسازی روتاویروس‌های ...

باعث افزایش سطح کشت سلول می‌شود. همچنین پس از افزودن نمونه ویروسی، این چرخش ملایم شانس بیشتری را برای قرار گرفتن ویروس‌ها در سطح کشت سلولی فراهم می‌کند. ظهور CPE معمولاً در ۴ روز پس از تلقیح مشاهده شد. با تکرار پاساژ، زمان مشاهده CPE حتی به ۲ روز پس از تلقیح کاهش یافت. با افزایش تعداد پاساژ سلول‌ها با CPE، در پاساژ نهم، ویروس به تکثیر و ظهور علائم CPE در سیستم کشت ثابت نیز عادت کرد. در روش نمونه‌های تهیه شده از سلول‌های حاوی CPE، در روش آنتی‌بادی فلورسنت غیر مستقیم، با استفاده از آنتی‌سرم هیپرایمیون، روتاویروس گروه A تأیید شد (۱۹). گزارش‌هایی در مورد حساسیت تیره‌های سلولی کلیه میمون (BSC-1 و LLC-MK2) و همچنین سلول‌های فیبروبلاستی دیپلوئید انسانی (MRC-5) و تیره سلولی کلیه خوک (IBRS-2) به روتاویروس‌ها وجود دارد که ۱۰-۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تریپسین به محیط کشت اضافه می‌شود (۱۲). همچنین گزارشی از جداسازی روتاویروس گاوی از سلول کلیه میمون (BSC-1) وجود دارد (۱۲). تکثیر روتاویروس گاوی نیز در سلول‌های Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) گزارش شده است (۱۰). در بسیاری از تحقیقات، استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پانکراتین و تریپسین برای جداسازی روتاویروس‌ها توصیه شده است. این آنزیم‌ها پروتئین ساختمانی VP4 را به VP8 و VP5 می‌شکنند و با این عمل، اتصال و ورود ویروس به سلول تسهیل می‌شود (۱۰). بسیاری از محققان افزایش تیتراژ روتاویروس‌های گاوی را در حضور تریپسین توصیف کرده‌اند. اگر تریپسین به نمونه‌های مدفوع اضافه نشود، عفونت ویروس در کشت سلولی بسیار کاهش می‌یابد و حتی از بین می‌رود (۶، ۱۲، ۱۹). با روش‌های معمول، جداسازی روتاویروس‌ها امکان پذیر نیست. برای اولین بار در سال ۱۹۶۹، روتاویروس به‌عنوان عامل اسهال در گوساله‌های نوزاد معرفی شد (۱۲). Babiuk و همکاران (۱۹۷۷) از سلول‌های کلیه میمون (BSC-1) و محیط EMEM برای جداسازی

محیط کشت توسط Sato و همکارانش در سال ۱۹۸۱ ارائه شد (۵، ۶، ۱۲). افزودن تریپسین به محیط کشت نه تنها عفونت‌زایی ویروس را افزایش می‌دهد، بلکه تعداد ذرات عفونی را نیز افزایش می‌دهد. ذرات ویروسی معیوب نسبت به ویروس‌های کامل به تریپسین حساس‌ترند و در حضور تریپسین از بین می‌روند. تریپسین همچنین اینترفرون را غیر فعال می‌کند. بنابراین، تریپسین باعث افزایش عفونت می‌شود (۱۲). مکانیسم اثر تریپسین توسط Arias و همکاران در سال ۱۹۹۸ ارائه شد و این است که VP4 به VP5 و VP8 شکسته می‌شود. آنها از سلول‌های MA104 ۴۸ ساعته برای تلقیح ویروس استفاده کردند. آنها توصیه کردند که پس از تلقیح نمونه به کشت سلولی و زمان لازم برای جذب نمونه تلقیح شده، در صورتی که نمونه برداشته نشود و محیط کشت حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تریپسین به آن اضافه گردد، بهترین نتیجه حاصل خواهد شد. به‌عنوان کنترل منفی از محلول PBS ۰/۱ مولار و $pH=7.2$ استفاده شد. تخریب کامل سلولی ۹۶ ساعت پس از ظهور CPE رخ داد. همچنین مقادیر بیشتر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از تریپسین در محیط کشت باعث سمیت سلولی می‌شود (۱۲). Rodriguez و همکاران (۲۰۰۴) روتاویروس گاوی را با استفاده از سلول‌های MA104 جدا کردند (۲۶). Villarreal و همکاران (۲۰۰۶) موفق به جداسازی روتاویروس از جوجه‌ها با استفاده از سلول‌های MA104 شدند (۱۸). Castrucci و همکاران (۱۹۸۳) روتاویروس گاوی را با استفاده از سلول‌های MA104 و تریپسین کردن نمونه‌های مدفوع و افزودن تریپسین به محیط نگهداری، جدا کردند. آنها نتوانستند ویروس را بدون استفاده از تریپسین جدا کنند (۳۱-۲۷).

روتاویروس گاوی استفاده کردند. قبل از تلقیح، سلول‌ها دو بار با محلول هنکس (Hanks) شسته شده تا سرم از محیط خارج شود. از نمونه‌های اسهالی گوساله‌ها که در روش ایمونوفلورسانس ۱۰۰ درصد آلوده به روتاویروس گاوی بودند، ذرات ویروسی در ۴۲ درصد نمونه‌های مدفوع در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد. آنها با تریپسین کردن نمونه‌ها و تلقیح آنها در کشت سلولی، موفق به جداسازی ویروس در ۷۵ درصد از نمونه‌ها شدند. با حذف تریپسین، فقط در ۱۵ درصد از نمونه‌ها ویروس جدا شد (۱۲). به‌طور کلی، جداسازی روتاویروس‌ها دشوار است. برای سایر ویروس‌ها می‌توان از چندین سلول مختلف استفاده کرد، اما برای روتاویروس‌ها، مناسب‌ترین سلول، MA104 است (این سلول توسط OIE به‌عنوان بهترین سلول برای جداسازی روتاویروس‌ها معرفی شده است) (۷-۵). در ابتدا تصور می‌شد که وجود برخی آنتی‌بادی‌ها در مدفوع، از جداسازی ویروس در کشت سلولی جلوگیری می‌کند و تریپسین آن آنتی‌بادی‌ها را غیر فعال می‌کند و در نتیجه ویروس را آلوده می‌کند. اما بعداً مشخص شد که این فرضیه درست نیست. فرضیه‌هایی که اکنون مورد بحث قرار می‌گیرند عبارتند از اینکه تولید تعداد زیادی از ذرات ویروسی که معیوب هستند و قادر به تکثیر نیستند، همچنین تولید و نشت برخی از مهارکننده‌ها مانند اینترفرون در داخل محیط کشت و نیز وجود برخی از مواد در خارج از پیکره ویروس یا اجزای سلول میزبان از پوشش‌برداری و تکثیر ویروس جلوگیری می‌کنند (۱۲). اولین جداسازی روتاویروس‌ها از کشت سلولی در سال ۱۹۷۲ توسط Mebus و همکاران انجام شد. در سال ۱۹۶۹، آنها برای اولین بار بیماری اسهال روتاویروسی را در گوساله‌ها توصیف کردند. روش تریپسین کردن نمونه قبل از تلقیح و افزودن تریپسین به

References

1- Aliyu AM, Aminu M, Ado SA, Jatau ED. Epidemiological studies on rotavirus associated

with diarrhoea among calves and children in Kaduna state, Nigeria. *BAJOPAS*. 2018; 11: 101-105.

- 2- Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Saunders-Elsevier, Philadelphia. 2007.
- 3- Geletu US, Usmael MA, Bari FD. Rotavirus in calves and its zoonotic importance. *Vet Med Int.* 6639701. 2021.
- 4- Ahmed NU, Khair A, Hassan J, Noor Ali Khan MAH, Rahman AK, Hoque MA, et al. Risk factors for bovine rotavirus infection and genotyping of bovine rotavirus in diarrheic calves in Bangladesh. *PLOS ONE.* 2022; 17: e0264577.
- 5- Fallahi R. Isolation and G-typing of rotaviruses from diarrheal calves in Tehran and Alborz provinces, Iran. Paper presented at: The 1st International Congress of Large animal Internal Medicine, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran, 6 May 2016; (p: 1-4). [In Persian]
- 6- Fallahi R, Bakhshesh M, Lotfi M. Isolation and G-typing of rotaviruses from diarrheal calves in Tehran and Alborz provinces, Iran. *Arch Razi Inst.* 2015; 70: 237-243.
- 7- Pardo-Mora D, Vargas-Bermudez DS, Oliver-Espinosa O, Jaime-Correa J. Molecular characterization of rotaviruses isolated from calves with bovine neonatal diarrhea (BND) in Colombia. *Infectio.* 2018; 22: 99-104.
- 8- Aksoy E, Kara E, Yagci BB, Azkur AK. Investigation of bovine coronavirus and bovine rotavirus in calves with neonatal diarrhea in Kirikkale and surrounding provinces. *MAKU Journal of Health Sciences Institute.* 2021; 9: 38-46.
- 9- Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil. 1996-1999. *Vet Microb.* 2004; 99: 167-173.
- 10- Ates O, Yesilbag K. Characterization of bovine rotavirus isolates from diarrheic calves in Turkey. *Mol Biol Rep.* 2023; 50: 3063-3071.
- 11- Liu X, Yan N, Yue H, Wang Y, Zhang B, Tang C. Detection and molecular characteristics of bovine rotavirus A in dairy calves in China. *J Vet Sci.* 2021; 22, e69.
- 12- Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J Clin Microbiol.* 1977; 6: 610-617.
- 13- Bertoni E, Aduriz M, Bok M, Vega C, Saif L, Aguirre D, et al. First report of group A rotavirus and bovine coronavirus associated with neonatal calf diarrhea in the northwest of Argentina. *Trop Anim Health Pro.* 2020; 52: 2761-2768.
- 14- Medeiros TNS, Lorenzetti E, Massi RP, Alfieri AF, Alfieri AA. Neonatal diarrhea and rotavirus A infection in beef and dairy calves, Brazil, 2006-2015. *Pesqui Vet Bras.* 2020; 40: 7-11.
- 15- Patel J, Mathakiya R, Golaviya A. Detection of bovine rotavirus from diarrheic bovine calves in Gujarat region, India. *Int J Current Microbiol App Sci.* 2019; 8: 1282-1293.
- 16- Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol.* 2004; 78: 2310-2318.
- 17- Estes MK, Cohen I. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989; 53: 410-449.
- 18- Villareal LY B, Uliana G, Valenzuela C, Chacon JLV, Saidenberg ABS, Sanches AA, et al. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. *Braz J Poultry Sci.* 2006; 8: 187-191.
- 19- Sunil-Chandra NP, Mahalingam S. Isolation and subgrouping of rotaviruses from buffalo calves in Sri Lanka. *Res Vet Sci.* 1996; 60: 187-189.
- 20- Fallahi R, Sadri R. Preparation of primary cell culture from honey bee (*Apis mellifera*) by enzymatic disaggregation and planting method. Paper presented at: 13th Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM) Conference, Bangkok, Thailand, 24 August 2010, (p: 212-213).
- 21- Fallahi, R. Review on application and preparation of cell cultures of honey bee (*Apis mellifera*) Research in Karyotic Cell & Tissue. 2020; 1: 37-43. [In Persian]
- 22- Gomara MI, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002; 76: 6596-6601.
- 23- Asmah RH, Green J, Armah GE, Galimore CI, Gray JJ, et al. Rotavirus G and P genotypes in rural Ghana. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1981-1984.
- 24- Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1338-1340.
- 25- Brunauer M, Roch FF, Conrady B. Prevalence of worldwide neonatal calf diarrhoea caused by bovine rotavirus in combination with bovine

coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium spp*: A meta-analysis. *Animals*. 2021; 11, 1014.

26- Rodriguez CAR, Brandao PE, Ferreira F, Gregori F, Buzinaro MG, Jerez JA. Improved animal rotavirus isolation in MA104 cells using different trypsin concentration. *Arquivos do Instituto Biologico, Sao Paulo*. 2004; 71: 437-441.

27- Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Cilli V, Donelli G, Angelillo G, *et al*. A study of cytopathic rotavirus strains isolated from calves with acute enteritis. *Comparative Immunology. Microbiol Infec Dis*. 1983; 6: 253-264.

28- Martin CSS, Lopez T, Arias F, Lopez S.

Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol*. 2004; 78(5): 2310-2318.

29- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology*. 3rd Edition, Academic Press, San Diego, California. 1999.

30- Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol*. 1980; 46, 75-85.

31- Knipe DM, Howley PM. Rotaviruses and their replication, In: Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, and Roizman B. *Fields Virology*. 6th edition, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013; p: 1347-1401.




Trypsinization is a Suitable Method to Isolate Rotaviruses Causing Viral Diarrhea in Calves: A Review

Roozbeh Fallahi

Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Receive: May 26, 2024; Revise: August 5, 2024; Accept: August 7, 2024

 [10.22034/nfvm.2024.459586.1242](https://doi.org/10.22034/nfvm.2024.459586.1242)

Summary

Group A rotaviruses are the main cause of diarrhea in most livestock species, and the death of calves under one month due to rotavirus diarrhea is common in many countries and causes huge economic losses every year. Serological and molecular methods can be used for quick diagnosis of the disease, but isolation and identification of the virus causes the disease in terms of the specific biological and structural characteristics of this virus is very difficult in usual methods, and needs to special methods of cell culture and suitable cell line. The effort to prepare a vaccine from the native strains isolated in each country helps to control, combating and possibly eradicate it and prevents the economic losses caused by this disease to a great extent. In general, rotavirus small amount reproduces only in a limited number of cell lines and they do not have the infectivity necessary to isolate the virus. But the presence of trypsin, under certain conditions, increases the proliferation and titer of the virus in cell cultures. On the other hand, too much trypsin in cell culture is toxic and causes cell death. This article describes the function of trypsin in the infectivity of rotaviruses, and standard and practical method in its non-toxic concentration for the appropriate cell line to isolate rotaviruses.

Keywords: *Cell culture, Isolation, Rotavirus, Trypsin, Viral diarrhea of calves*