نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات ۱- ۱۰

اپیدمیولوژی مولکولی، تعیین ژنوتیپ و مطالعه فیلوژنتیکی نورووویروس گاوی در گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران

بهمن عابدی کیاسری*[۱]، محمدمهدی رنجبر[۲]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.
۲- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ فروردین ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۷ خرداد ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۸ خرداد ۱۴۰۴

10.22034/NFVM.2025.515517.1279

چکیده

نوروویروس، به‌ویژه نورویروس‌های گاوی (BoNoV)، ویروس‌های RNA دار و عامل گاستروانتریت در انسان و دام هستند و برخی ژنوتیپ های آن در اسهال گوساله‌ها نقش دارند. بیماری‌های گوارشی در گوساله‌های جوان می‌تواند خسارات اقتصادی قابل توجهی ایجاد کرده و بهره‌وری گله‌های گاو شیری را تحت تأثیر قرار دهد. نوروویروس ها قادرند گونه‌های مختلفی از جمله گاو، خوک، سگ، گربه، موش، و انسان را آلوده کنند. نورویروس‌های حیوانی (مانند نورویروس گاوی، خوکی) از نورویروس انسانی متمایز هستند و شواهد قطعی در مورد عفونت متقاطع بین گونه‌ها کم است . همچنین، اطلاعات علمی درباره احتمال آلودگی شیر با نوروویروس بسیار اندک گزارش شده است. در این مطالعه، شیوع و ویژگی‌های ژنتیکی نوروویروس گاوی به‌عنوان یکی از عوامل گاستروانتریت در گوساله‌های ایران بررسی شد. در مجموع، ۱۶۳ نمونه مدفوع از گوساله‌های اسهالی کمتر از دو ماه از پنج استان کشور طی سال‌های ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۰ جمع‌آوری و با روش RT-PCR و استفاده از دو جفت پرایمر تحلیل شدند. با توجه به محدودیت منابع، تنها دو نمونه برای انجام آنالیزهای فیلوژنتیک مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. داده‌های توالی در حال حاضر با شماره‌های SUB13053245 و SUB13053259 در GenBank ثبت شده‌اند. نتایج RT-PCR نشان داد که ۶۸ نمونه (۴۱٪) برای ژنوتیپ III نوروویروس گاوی مثبت بودند. همچنین، فراوانی موارد مثبت در فصول سرد سال (پاییز و زمستان) بیشتر بود. تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که نمونه SUB13053245 شباهت ژنتیکی بالایی (۹۷٪) با سویه‌های گزارش‌شده از کشورهای شرق آسیا و مصر دارد؛ در حالی‌که نمونه SUB13053259 بیشترین نزدیکی ژنتیکی را با سویه‌های کشورهای اروپایی مانند بلژیک، فرانسه و انگلستان نشان داد. این یافته‌ها بیانگر شیوع بالای ژنوتیپ III نوروویروس گاوی در گوساله‌های اسهالی در ایران است. همچنین، نتایج بر ضرورت انجام مطالعات گسترده‌تر در چارچوب رویکرد «یک‌بهداشت» (One Health) برای درک بهتر اپیدمیولوژی نوروویروس‌های حیوانی و بررسی احتمال انتقال بین‌گونه‌ای تأکید دارد.

واژگان کلیدی: *اپیدمیولوژی مولکولی، اسهال گوساله، تحلیل فیلوژنتیک، تعیین ژنوتیپ، نوروویروس گاوی*

مقدمه

نورویروس‌ها گروهی از ویروس‌های بسیار مسری هستند که به عنوان عامل ایجاد گاستروانتریت در گونه‌های مختلف، از جمله انسان‌ها و دام‌ها شناخته می‌شوند (۱). در میان این ویروس‌ها، نورویروس گاوی به عنوان یک پاتوژن مهم در دام‌ها مورد توجه قرار گرفته است، به ویژه در مورد تأثیر آن بر گوساله‌های جوان. نورویروس‌ها عمدتاً از طریق مسیر مدفوعی-دهانی، از جمله مصرف آب یا غذای آلوده یا تماس مستقیم با حیوان آلوده منتقل می‌شوند، بروز عفونت ناشی از نورویروس گاوی معمولاً با اسهال شدید همراه است که می‌تواند منجر به کم‌آبی، کاهش وزن و در موارد شدید، مرگ و میر شود (۲, ۳). در گوساله‌هایی که به‌طور تجربی با نورویروس گاوی آلوده شده‌اند، علائم بالینی اصلی شامل گاستروانتریت، اسهال و ضایعات روده‌ای بوده است(۴, ۵). ضایعات روده‌ای شامل آتروفی شدید پرزهای روده‌ای و از دست رفتن و کاهش ضخامت اپیتلیوم پرزها بود مطالعات جهانی وجود نورویروس گاوی را با نرخ‌های شناسایی مولکولی بین ۱ تا ۸۰ درصد و در برخی کشورها حتی تا ۱۰۰ درصد شیوع سرولوژیک گزارش کرده‌اند. این اختلاف گسترده در میزان شناسایی می‌تواند ناشی از تفاوت در روش‌های نمونه‌گیری، سن گوساله‌ها، شرایط مزرعه و حساسیت روش‌های تشخیصی باشد (۶–۹). پیامدهای اقتصادی این بیماری قابل توجه است؛ زیرا علاوه بر تأثیر بر سلامت و رفاه حیوان، بر تولید و سودآوری صنعت دامداری نیز اثر می‌گذارد. بر اساس گزارش‌ها، تقریباً نیمی از موارد مرگ‌ومیر در گوساله‌های شیری زیر یک ماه ناشی از اسهال شدید است (۱۰). هرچند گوساله‌های مبتلا به اسهال معمولاً به‌طور هم‌زمان به چندین عامل عفونی آلوده می‌شوند، اما نقش نورویروس گاوی در میان عوامل مختلف قابل توجه است. شیوع اسهال گوساله‌ها به عواملی مانند موقعیت جغرافیایی مزارع، روش‌های مدیریت دامداری و اندازه گله نیز وابسته است(۱۲,۱۱). در حال حاضر درمان اختصاصی برای نورویروس گاوی وجود ندارد و درمان‌های حمایتی برای کاهش علائم و بهبود وضعیت گوارشی حیوان توصیه می‌شود. این درمان‌ها شامل تأمین مایعات و الکترولیت‌ها برای جلوگیری از دهیدراتاسیون، استفاده از داروهای ضد درد و تب‌بر و ارائه مراقبت‌های عمومی مانند تغذیه مناسب و استراحت کافی است (۱۳). با وجود شواهد محدود سرولوژیک، همچنان نیاز به تحقیقات بیشتر برای درک بهتر پتانسیل زئونوزی این ویروس‌ها وجود دارد (۶). همچنین، شناسایی آنتی‌بادی‌های نورویروس گاوی و سگی در انسان‌ها نشان‌دهنده اهمیت بالقوه ویژگی‌های زئونوزی آن‌ها است (۱۴). انتقال بین‌گونه‌ای سایر ویروس‌های خانواده *Caliciviridae* نیز گزارش شده است؛ از جمله برخی رخدادهای زئونوزی بین پستانداران دریایی و انسان‌ها. افزون بر این، نورویروس‌ها از طریق جهش‌های ژنتیکی و بازترکیب تکامل یافته و به‌طور منظم ژنوتیپ‌های جدیدی ایجاد می‌کنند(۱۵).

نورویروس‌ها که به خانواده *Caliciviridae* تعلق دارند، فاقد پوشش بوده و دارای ژنوم *RNA* تک‌رشته‌ای با قطبیت مثبت به طول تقریبی ۷.۳ تا ۷.۵ کیلوباز هستند. در ژنوم نورویروس گاوی سه فریم خوانش باز (*ORFs*) وجود دارد: *ORF1* که پلی‌پروتئینی را رمزگذاری می‌کند و به شش پروتئین غیرساختاری از جمله *RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)* پردازش می‌شود؛ *ORF2* که پروتئین کپسیدی (*VP1*) را رمزگذاری می‌کند؛ و *ORF3* که یک پروتئین ساختاری فرعی (*VP2*) را تولید میکنند (۱۵). بر اساس تحلیل‌های فیلوژنتیک پروتئین کپسیدی، نورویروس‌ها به پنج گروه ژنی اصلی *GI* تا *GV* تقسیم‌بندی می‌شوند. نورویروس‌ها در انسان‌ها عمدتاً از طریق گروه های ژنی *GI*، *GII* و *GIV* موجب بیماری می‌شوند (۱۶). در حالی که نورویروس‌های موجود در حیواناتی مانند خوک‌ها، سگ‌ها و گربه‌ها به‌طور نزدیک با سویه‌های انسانی مشابه هستند و در گروه‌های *GII* (نورویروس خوک) و نورویروس‌های موجود در گربه‌ها عمدتاً در گروه *GIV* و در سگ‌ها در گروه‌های *GIV* و *GVI* طبقه‌بندی می‌شوند.(۱۷)

نورویروس‌های گاو و گوسفند به‌طور عمده در گروه ژنی *GIII* قرار دارند، در حالی که گروه ژنی *GV* شامل

نورویروس‌های موش‌ها می‌شود (۱۸). تمامی گزارش‌های موجود از نورویروس‌های گاوی مربوط به ژنوتیپ*III*، زیرگروه‌های ۱ یا ۲ است (۶). تنها یک گزارش از نورویروس*GIII* زیرگروه ۳ در گوسفندان نیوزیلند وجود دارد (۱۹).

با توجه به کمبود داده‌های اپیدمیولوژیک درباره نورویروس گاوی در ایران و اهمیت این ویروس به‌عنوان یک عامل بالقوه در اسهال گوساله‌ها، مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع مولکولی نورویروس‌ها در نمونه‌های مدفوعی گوساله‌های اسهالی در ایران با استفاده از روش *RT-PCR* انجام شد. همچنین، بخشی از ژن *RdRp* برخی از نمونه‌های مثبت تعیین توالی شد و با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده *GenBank* مقایسه و برای شناسایی روابط فیلوژنتیکی هم‌راستاسازی گردید. انتظار می‌رود نتایج این مطالعه تأثیرات قابل توجهی بر سلامت عمومی دامپزشکی، شیوه‌های دامداری و توسعه مداخلات هدفمند برای کنترل شیوع نورویروس گاوی داشته باشد. با افزایش شناخت ما از ویژگی‌های مولکولی و الگوهای اپیدمیولوژیک نورویروس گاوی، می‌توان مسیر ارتقای راهبردهای مدیریتی و حفظ سلامت گوساله‌ها و بهره‌وری صنعت دامداری را هموار کرد. این مطالعه با توجه به محدودیت داده‌های موجود، تلاشی در جهت پر کردن بخشی از خلأ دانشی درباره شیوع و ویژگی‌های ژنتیکی نورویروس گاوی در ایران است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها: در مجموع ۱۶۳ نمونه مدفوع از گوساله‌های مبتلا به اسهال که کمتر از یک ماه سن داشتند، در فاصله زمانی سال‌های ۱۴۰۱ تا اوایل ۱۴۰۳ جمع آوری و به آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد. نمونه‌ها از پنج استان مرکزی ایران شامل تهران (۵۵ نمونه)، البرز (۷۰ نمونه)، قزوین (۲۶ نمونه)، قم (۸ نمونه) و همدان (۴ نمونه) تهیه شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با رونویسی معکوس (RT-PCR): نمونه‌های مدفوع با استفاده از روش RT-PCR جهت شناسایی نورویروس گاوی مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا نمونه‌ها در محلول استاندارد بافر فسفات نمکی (PBS) با pH برابر با ۷.۲ معلق شدند تا هموژنات ۱۰ درصدی تهیه شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند تا شفاف‌سازی شوند، همان‌گونه که در مطالعات پیشین گزارش شده است. پس از آن، فاز رویی برای استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت استخراج RNA سیناپور (شرکت آپلاید سیناژن، تهران، ایران) طبق دستورالعمل سازنده مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش خلوص و غلظت RNA، از اسپکتروفتومتر نانودراپ شرکت ترموفیشر استفاده شد. تمامی نمونه‌های RNA استخراج‌شده در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند تا در مراحل بعد مورد آزمایش قرار گیرند. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز سیناکلون و با بهره‌گیری از هگزامرهای تصادفی انجام شد. فرآیند سنتز cDNA شامل انکوباسیون در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و در ادامه گرمادهی در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت، نمونه‌ها به دمای ۴ درجه سلسیوس رسانده شده و تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.(۲۰)

واکنش RT-PCR برای شناسایی نورویروس گاوی با استفاده از دو جفت پرایمر مختلف شامل پرایمرهای یونیورسال CBECu و پرایمرهای اختصاصی MON انجام شد. این واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf Thermocycler) اجرا گردید.

برای هر واکنش، ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده همراه با ۱۸ میکرولیتر از محلول واکنش استفاده شد. ترکیب محلول واکنش شامل ۰.۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار dNTP mix، ۱۰ میکرولیتر بافر PCR ۱۰× و ۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase بود که حجم

نهایی واکنش را به ۲۵ میکرولیتر می‌رساند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ویروس در جدول ۱ ارائه شده است. این ترکیب با هدف افزایش حساسیت و ویژگی واکنش جهت شناسایی دقیق ویروس طراحی شده است و مشابه با روش‌هایی است که پیش‌تر برای شناسایی نورووویروس در نمونه‌های بالینی و محیطی پیشنهاد شده‌اند (۲۱).

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای شناسایی نورووویروس گاوی

نام پرایمر	توالی (´۵ - ´۳)	محصول PCR	دناتوراسیون اولیه	دناتوراسیون	اتصال	مرجع
CBECu-F	AGTTAYTTTTCCTTY-TAYGGBGA	۵۳۲ جفت باز	۹۴ °C ۴ دقیقه	۹۴ °C ۲۵ ثانیه	۵۰ °C ۴۵ ثانیه	۲۲
CBECu-R	AGTGTCTCTGTCAG-TCATCTTCAT					
MON 432 F	TGGACICGYGGICCY-AAYCA	۲۱۳ جفت باز	۹۴ °C ۳ دقیقه	۹۴ °C ۳۰ ثانیه	۵۰ °C ۹۰ ثانیه	۲۳
MON 477 R	AAAICGCATCCAIG-CAAACAT					

بررسی محصولات RT-PC با روش الکتروفورز: برای بررسی نتایجRT-PCR ، از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. پس از انجام واکنش RT-PCR و تولید محصولات تقویت‌شده، محصولات به ژل آگارز ۱ درصد منتقل شدند و با استفاده از الکتروفورز در یک محیط با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت جداسازی شدند. این فرآیند به تفکیک محصولات PCR بر اساس اندازه کمک می‌کند. پس از پایان الکتروفورز، ژل تحت تابش نور فرابنفش قرار گرفت و با استفاده از ماده رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، باندهای تقویت‌شده مشاهده شدند.

توالی‌یابی و تحلیل توالی: برای تعیین ساختار ژنومی سویه‌ها، داده‌های توالی گسترده‌ای به‌دست آمد. دو آمپلیکون DNA مثبت پس از خالص سازی با کیت ژل اکستراکشن با استفاده از پرایمرهای یونیورسال CBECu (۵۳۲ نوکلئوتید) به‌طور مستقیم توسط دستگاه ABI Prism 3730XI Biosystems (ایالات متحده آمریکا) در مؤسسه توالی‌یابی DNA Macrogen (کره جنوبی) توالی‌یابی شدند. برای انجام تحلیل‌های مقایسه‌ای فیلوژنتیکی، داده‌های توالی دیگر نورویروس‌های موجود در GenBank دانلود شد. تحلیل مقایسه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Sequence Editor نسخه ۶.۶.۹ انجام گرفت. به‌منظور ساخت درخت فیلوژنتیکی، درخت با روش Neighbor-Joining و الگوریتم BioNJ در نرم‌افزار MEGA X و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap ترسیم شد.

یافته ها

یافته‌های مولکولی و تحلیل فیلوژنتیکی: از مجموع ۱۶۳ نمونه مدفوع جمع‌آوری‌شده از گوساله‌های مبتلا به اسهال، ۶۸ نمونه (۴۱.۷٪) با استفاده از پرایمرهای MON و ۵۸ نمونه (۳۵.۶٪) با استفاده از پرایمرهای یونیورسال CBECu در آزمون RT-PCR مثبت شناسایی شدند. شایان ذکر است که تمامی نمونه‌های مثبت با پرایمر CBECu، توسط پرایمر MON نیز تأیید شدند. علاوه بر این، نرخ شناسایی در فصول سرد سال (پاییز و زمستان) بالاتر از فصول گرم بود؛ به‌طوری که از ۹۱ نمونه مربوط به فصول

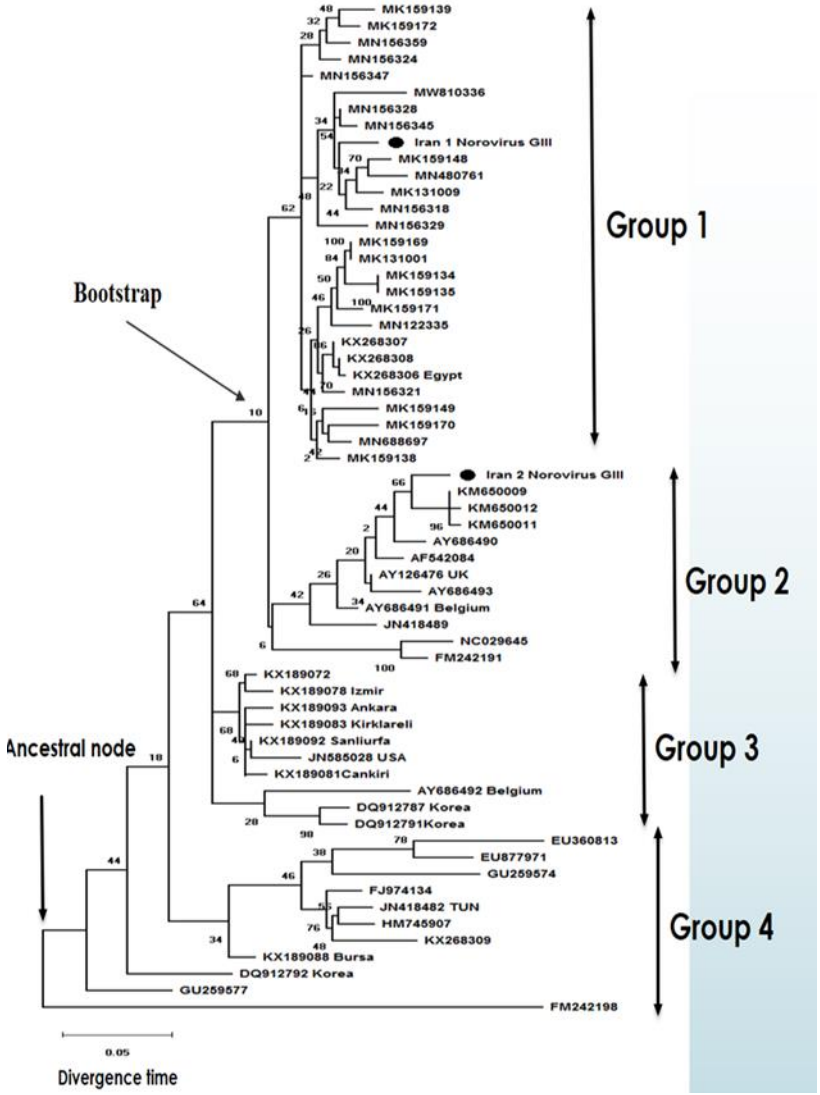
سرد، ۴۰ نمونه (۴۴٪) و از ۷۲ نمونه مربوط به فصول گرم، ۲۸ نمونه (۳۸.۹٪) مثبت گزارش شدند. برای بررسی دقیق‌تر ویژگی‌های ژنتیکی ویروس، توالی‌یابی ژن RNA وابسته به RNA پلیمراز (RdRp) در دو نمونه مثبت انجام شد. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit نسخه ۶.۶.۹ و الگوریتم Neighbor-Joining نشان داد که هر دو نمونه متعلق به ژنوگروه GIII نورووویروس گاوی هستند اما در دو خوشه متفاوت قرار دارند.

نمونه نخست با شناسه Iran 1 Norovirus GIII در گروه ۱ قرار گرفت و بیشترین شباهت ژنتیکی را با سویه‌هایی از شرق آسیا (MK159148، MK159145، MW810336) و شمال آفریقا (KX268307، KX268308 از مصر) نشان داد. این شباهت در سطح توالی نوکلئوتیدی حدود ۹۷٪ برآورد شد. از سوی دیگر، نمونه دوم با شناسه Iran 2 Norovirus GIII در گروه ۲ خوشه‌بندی شد و نزدیکی ژنتیکی بیشتری با سویه‌هایی از اروپا مانند بلژیک (AY686493)، بریتانیا (AY126476) و آلمان داشت.

درخت فیلوژنتیک حاصل از این تحلیل، چهار خوشه اصلی ژنتیکی (گروه‌های ۱ تا ۴) را در میان سویه‌های نورووویروس گاوی GIII مشخص نمود. خوشه‌بندی متفاوت دو نمونه ایرانی در این درخت، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی منشأهای متفاوت آلودگی در گوساله‌های کشور باشد. داده‌های حاصل از توالی‌یابی نیز به پایگاه داده GenBank با شناسه‌های SUB13053245 و SUB13053259 ارسال شدند (تصویر ۱).

جدول ۲. نمونه‌های ارزیابی‌شده برای نورووویروس گاوی بر اساس فصول

فصل نمونه گیری	نمونه‌های RT-PCR	نتایج تعداد مثبت‌ها RT-PCR	درصد مثبت‌ها RT-PCR
	با پرایمر CBECu		
پاییز و زمستان(سرد)	۹۱	۳۵	۴۸٪
بهار و تابستان (گرم)	۷۲	۲۳	۳۱.۹٪
	با پرایمر MON		
پاییز و زمستان(سرد)	۹۱	۴۰	۴۱.۷٪
بهار و تابستان (گرم)	۷۲	۲۸	۳۵.۵٪
مجموع	۱۶۳	۶۸	۴۱.۷٪



تصویر ۱ درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ژن RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) از ژنوم نورویروس گاوی، حاصل از توالی‌یابی دو نمونه ایرانی Iran 1: SUB13053245 و Iran 2: SUB13053259 به همراه سایر توالی‌های مرجع ثبت‌شده در پایگاه داده GenBank. درخت با استفاده از روش Neighbor-Joining و الگوریتم BioNJ با مدل بیشینه احتمال (Maximum Composite Likelihood) در نرم‌افزار BioEdit ساخته شده است. درصد تکرار خوشه‌بندی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار در کنار شاخه‌ها نشان داده شده است. دو نمونه ایرانی به‌ترتیب در خوشه‌های مرتبط با سویه‌های شرق آسیا-آفریقا و اروپا خوشه‌بندی شده‌اند. مقیاس پایین نمودار نمایانگر تعداد جایگزینی‌های نوکلئوتیدی در هر موقعیت است.

بحث و نتیجه‌گیری

اســـهال در گوســـاله‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل بروز زیان‌های اقتصادی در صنعت دامپروری محسوب می‌شود، به‌ویژه در گله‌های گاو شـــیری که مرگ‌ومیر، کاهش نرخ رشـــد و افزایش هزینه‌های درمان و مدیریت از پیامدهای عمده آن است (۲۴). در میان عوامل ویروسی، نورویروس گـاوی (Bovine Norovirus; BNoV) بـه‌عنوان یکی از عوامل اصلی در بروز اسهال نوزادان گاو شناخته شده است (۲۵). این ویروس از خـانواده Caliciviridae بوده و در گونه‌های مختلفی از جمله انســـان، خوک، گاو و ســـایر نشخوارکنندگان شناسایی شده است (۱۸). به‌ویژه ژنوتیپ GIII این ویروس، در کشـــورهای متعددی از جمله ایالات متحده، ژاپن، چین، کره جنوبی و برخی کشورهای اروپایی گزارش شده و میزان شیوع آن در مطالعات مختلف بین ۱

تا ۹۳ درصد متغیر بوده است (۲۴). مطالعات سرولوژیک نیز شیوع بالای این ویروس را در گله‌های گاو شیری نشان داده‌اند، به‌طوری که در برخی موارد شیوع سرولوژیک به ۱۰۰ درصد نیز رسیده است (۲۴, ۲۵).

در مطالعه حاضر، برای نخستین‌بار شیوع BNoV در گوساله‌های کمتر از دو ماه مبتلا به اسهال در پنج استان مرکزی ایران طی سال‌های ۱۴۰۲–۱۴۰۳ بررسی شد. شناسایی ویروس با روش RT-PCR و با استفاده از دو جفت پرایمر MON و CBECu انجام شد که نتایج نشان داد از میان ۱۶۳ نمونه، به‌ترتیب ۶۸ نمونه (۴۱.۷٪) و ۵۸ نمونه (۳۵.۵٪) با استفاده از پرایمرهای مذکور مثبت بودند. اغلب نمونه‌های مثبت با هر دو جفت آغازگر شناسایی شدند، با این حال اختلاف در حساسیت این آغازگرها مشاهده شد. یافته‌های حاضر با نتایج مطالعه Pourasghari و همکاران (۳۹.۵٪) همخوانی دارد (۲۶). چنین تفاوت‌هایی ممکن است به دلیل تفاوت در اقلیم منطقه، مدیریت گله یا پایداری بیشتر ویروس در دمای پایین باشد (۲۷). تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که توالی یکی از نمونه‌های ایرانی (SUB13053245) بیشترین شباهت را با سویه‌های گزارش‌شده از شرق آسیا و مصر دارد، در حالی‌که نمونه دوم (SUB13053259) به سویه‌های اروپایی شباهت بیشتری داشت. این یافته‌ها، وجود تنوع ژنتیکی بین سویه‌های در گردش در ایران را نشان می‌دهد و می‌تواند نشانه‌ای از ورود ویروس از مناطق مختلف جهان باشد.

علاوه بر این، بررسی الگوی فصلی بروز عفونت نشان داد که شیوع در فصول سرد (پاییز و زمستان) بالاتر از فصول گرم (بهار و تابستان) بود. این یافته با مطالعه Hassine-Zaafrane و همکاران هم‌راستا است، اما با نتایج Pourasghari و همکاران که شیوع بالاتری را در فصول گرم گزارش کردند، تفاوت دارد (۲۶). افزایش شیوع در فصول سرد ممکن است به دلیل شرایط محیطی مساعدتر برای بقای ویروس در دمای پایین، تغییرات در رفتارهای مدیریتی گله در فصول سرد، و کاهش ایمنی گوساله‌ها در این دوره باشد (۲۸). در مجموع، این مطالعه نشان داد که BNoV ژنوتیپ GIII با شیوع نسبتاً بالا در گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران وجود دارد. داده‌های فیلوژنتیکی به تنوع بالای سویه‌ها و احتمال منشأهای مختلف اشاره دارند. از این‌رو، شناسایی دقیق‌تر سویه‌های ویروسی و پایش مداوم آن‌ها می‌تواند به کنترل مؤثرتر بیماری کمک کند. از سوی دیگر، با توجه به قابلیت انتقال میان‌گونه‌ای این ویروس و حضور آن در انسان و دام، اتخاذ رویکرد «بهداشت واحد» (One Health) در مطالعات آینده ضروری است. انجام تحقیقات جامع‌تر درباره عوامل خطر، نقش سایر پاتوژن‌های هم‌زمان، و ارزیابی استراتژی‌های پیشگیری مانند واکسیناسیون، می‌تواند نقش کلیدی در کاهش بار بیماری داشته باشد(۳۰، ۲۹).

مطالعه حاضر برای نخستین‌بار به بررسی شیوع و ویژگی‌های ژنتیکی ویروس نورووویروس گاوی (BNoV) در گوساله‌های مبتلا به اسهال در ایران پرداخت و با بهره‌گیری از آزمون‌های مولکولی و تحلیل فیلوژنتیکی، شواهدی از حضور گسترده ژنوتیپ GIII این ویروس در پنج استان مرکزی کشور به‌دست داد. نتایج نشان‌دهنده‌ی شیوع نسبتاً بالای ویروس به‌ویژه در فصول سرد، و تنوع ژنتیکی قابل‌توجه میان سویه‌های شناسایی‌شده بود که می‌تواند حاکی از منشأهای متفاوت آلودگی و ورود ویروس از مناطق مختلف جهان باشد. این تنوع از نظر اپیدمیولوژیک و مدیریت بیماری اهمیت بالایی دارد. از آن‌جا که نورووویروس گاوی قابلیت انتقال میان‌گونه‌ای داشته و در گونه‌های مختلف از جمله انسان نیز گزارش شده، اتخاذ رویکرد «بهداشت واحد» در پایش و کنترل آن ضروری به‌نظر می‌رسد. ادامه مطالعات در زمینه عوامل خطر، نقش پاتوژن‌های همراه و امکان‌سنجی واکسیناسیون می‌تواند به کاهش بار بیماری و بهبود مدیریت بهداشتی گله‌ها کمک شایانی کند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

References

1- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. N Engl J Med. 2009; 361(18): 1776-85.

2- Di Felice E, Mauroy A, Dal Pozzo F, Thiry D, Ceci C, Di Martino B, et al. Bovine noroviruses: a missing component of calf diarrhoea diagnosis. Vet J. 2016; 207: 53-62.

3- Ushijima H, Fujimoto T, Müller WE, Hayakawa S. Norovirus and foodborne disease: a review. Food Saf (Tokyo). 2014; 2(3): 37-54.

4- Jung K, Scheuer KA, Zhang Z, Wang Q, Saif LJ. Pathogenesis of GIII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. Vet Microbiol. 2014; 168(1): 202-7.

5- Otto PH, Clarke IN, Lambden PR, Salim O, Reetz J, Liebler-Tenorio EM. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. J Virol. 2011; 85(22): 12013-21.

6- Villabruna N, Koopmans MP, de Graaf M. Animals as reservoir for human norovirus. Viruses. 2019; 11(5): 478.

7- Castells M, Caffarena RD, Casaux ML, Schild C, Castells F, Castells D, et al. Detection, risk factors and molecular diversity of norovirus GIII in cattle in Uruguay. Infect Genet Evol. 2020; 86: 104613.

8- Gülacti I, Sözdutmaz I, Işıdan H. Molecular characterization of the bovine noroviruses from diarrheic calves in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2016; 40(4): 428-33.

9- Guo Z, He Q, Yue H, Zhang B, Tang C. First detection of Nebovirus and Norovirus from cattle in China. Arch Virol. 2018; 163: 475-8. 2010; 166(26): 818-822.

10- Berchtold JF, Constable PD. Antibiotic treatment of diarrhea in preweaned calves. Food Anim Pract. 2009; 520.

11- Bartels CJ, Holzhauer M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ. *Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Prev Vet Med. 2010; 93(2-3): 162-9.*

12- Izzo M, Kirkland P, Mohler V, Perkins N, Gunn A, House J. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. Aust Vet J. 2011; 89(5): 167-73.

13- Castells M, Colina R. Viral enteritis in cattle: to well known viruses and beyond. Microbiol Res. 2021; 12(3): 663-82.

14- Mesquita JR, Costantini VP, Cannon JL, Lin S, Nascimento MSJ, Vinjé J. Presence of antibodies against genogroup VI norovirus in humans. Virol J. 2013; 10: 1-5.

15- Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Saegerman C, Mast J, Bridger JC, et al. Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. Vet Microbiol. 2009; 137(3-4): 243-51.

16- Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. Trends Microbiol. 2004; 12(6): 279-87.

17- Vinjë J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. J Clin Microbiol. 2015; 53(2): 373-81.

18- Scipioni A, Mauroy A, Vinje J, Thiry E. Animal noroviruses. Vet J. 2008; 178(1): 32-45.

19- Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, et al. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(17): 5464-70.

20- Cho YI, Kim WI, Liu S, Kinyon JM, Yoon KJ. Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. J Vet Diagn Invest. 2010; 22(4): 509-17.

21- Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(5): 1388-94.

22- Cui Y, Chen X, Yue H, Tang C. First detection and genomic characterization of bovine norovirus from yak. Pathog. 2022; 11(2): 192.

23- Richards GP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS. Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(12): 7179-84.

24- Pinior B, Firth CL, Richter V, Lebl K, Trauffler M, Dzieciol M, et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. Prev Vet Med.

2017; 137: 77-92.

25- Mischenko VA, Mischenko AA, Nikeshina TB, Petrova ON, Brovko YV, Kushlubaeva AI. The problem of norovirus infection in animals (literature review). Vet Sci Today. 2024; 118.

26- Farahmand M, Moghoofei M, Dorost A, Shoja Z, Ghorbani S, Kiani SJ, et al. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: a meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020. Rev Med Virol. 2022; 32(1): e2237.

27- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(1): 134-64.

28- Pourasgari F, Kaplon J, Sanchooli A, Fremy C, Karimi-Naghlani S, Otarod V, et al. Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses in newborn calves in Iran. Arch Virol. 2018; 163(5): 1271-7.

29- Karayel-Hacioglu I, Alkan F. Molecular characterization of bovine noroviruses and neboviruses in Turkey: detection of recombinant strains. Arch Virol. 2019; 164: 1411-7.

30- Klein-Jöbstl D, Iwersen M, Drillich M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. J Dairy Sci. 2014; 97(8): 5110-9.

New Findings in Veterinary Microbiology
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Quarterly - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 1-10

Molecular epidemiology, genotyping and phylogenetic study of bovine norovirus from diarrheic calves in Iran

Bahman Abedikiasari*[1], Mohammadmehdi Ranjbar[2]

1- Assistant professor, Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Razi vaccine and serum research institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Corresponding author: abedikiasaribahman@gmail.com

Receive: April 07, 2025; Revise: June 07, 2025; Accept: June 08, 2025

10.22034/NFVM.2025.515517.1279

Abstract

Norovirus is a highly contagious foodborne pathogen associated with calf diarrhea, causing economic losses in dairy cattle herds. This virus can infect a wide range of species, including cattle, pigs, dogs, cats, mice, sheep, lions, and humans. In this study, the prevalence and genetic sequencing of bovine norovirus as a causative agent of gastroenteritis in calves in Iran were investigated. A total of 163 fecal samples were collected from diarrheic calves under two months of age across five provinces in Iran during 2023–2024 and analyzed using RT-PCR with two pairs of primers. Two positive samples were sequenced for phylogenetic analysis (GenBank accession numbers: SUB13053245 and SUB13053259). RT-PCR results indicated that 68 samples (41%) tested positive for bovine norovirus genogroup III. Additionally, a higher prevalence of norovirus was observed in colder seasons (autumn and winter). Phylogenetic analysis revealed that sample SUB13053245 exhibited a close genetic relationship (97% similarity) with bovine norovirus strains reported from East Asia and Egypt, while sample SUB13053259 clustered with norovirus strains from European countries such as Belgium, France, and the United Kingdom. These findings highlight the high prevalence of bovine norovirus genogroup III in diarrheic calves in Iran, emphasizing the need for further investigations, particularly within the One Health framework, to assess the molecular epidemiology and risk factors associated with norovirus infections in Iran.

Keywords: *Bovine norovirus, calf diarrhea, genotyping, molecular epidemiology, phylogenetic analysis*