Molecular detection and genotyping of rotaviruses in children with acute gastroenteritis in Karaj hospital

N. Harzandi[*] P. Samiee[**] M. Dezfulian[***]

*Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
**M.Sc. Student of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
***Assistant Professor of Molecular Genetics, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

Abstract

Background: Human group A rotaviruses are the most common viral agents of severe diarrhea in children and infants worldwide.

Objective: The aim of this study was to determine different genotypes of rotaviruses in children with acute gastroenteritis in Karaj.

Methods: This cross- sectional study was performed on 200 stool specimens from under 5 years old children with acute gastroenteritis referred to Bahonar hospital in Karaj from September 2011 to December 2011. Rotavirus contamination and different genotypes were determined by semi-nested multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction RT-PCR.

Findings: Rotavirus contamination was found in 27 samples (13.5%). P and G genotypes prevalence was found to be: P[8]: 44%, P[4]: 4%, P[6] P[8]: 4% , G1: 15%, G2: 8%, G4: 8%, G9: 15% and G4G9: 8%.

Conclusion: With regards to the results, P[8], G1 and G9 were the predominant genotypes. Lack of amplification of segments related to VP7 protein and different genotypes in considerable percentage of the positive samples suggest the necessity of using other primers and further molecular studies in order to select and design new primers.

Keywords: Rotavirus, Genotype, Gastroenteritis, Multiplex PCR

Corresponding Address: Naser Harzandi, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Email: naser.harzandi@kiau.ac.ir
Tel: +98-26-34182770
Received: 17 Sep 2013
Accepted: 15 Apr 2014

تشخیص مولکولی و ژنوتیپ روتاویروس‌های جدا شده از موارد گاستروانتریت حاد کودکان در کرج

دکتر ناصر هرزندی* پریا سمیعی** دکتر مهروز دزفولیان***

* استادیار میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
** دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
*** استادیار ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

آدرس نویسنده مسؤول: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، تلفن ۳۴۱۸۲۷۷۰- ۰۲۶
Email: naser.harzandi@kiau.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۶

چکیده

زمینه: روتاویروس‌های گروه A انسانی شایع‌ترین عامل ویروسی اسهال شدید کودکان و نوزادان در سراسر جهان هستند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین ژنوتیپ‌های دخیل در عفونت روتاویروسی در کودکان مبتلا به گاستروانتریت در شهر کرج انجام شد.

مواد و روش‌ها: این بررسی مقطعی بر روی تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع کودکان زیر ۵ سال با درگیری گوارشی مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید باهنر شهرستان کرج از مهر تا دی ماه ۱۳۹۰ انجام شد. میزان آلودگی به روتاویروس و نوع ژنوتیپ دخیل در موارد درگیری با روش Semi nested multiplex RT- PCR تعیین شد.

یافته‌ها: از۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۲۷ نمونه (۱۳/۵٪) به روتاویروس آلوده بودند. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف عبارت بودند از: P[8] ۴۴٪، G1 ۱۵٪، G9 ۱۵٪، G2 ۸٪، G4 ۸٪، G4G9 ۸٪، P[4] ۴٪ و P[6]P[8] ۴٪.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، P[8]، G1 وG9 به عنوان ژنوتیپ‌های غالب بودند، ولی عدم تکثیر قطعات مربوط به پروتئین VP7و نیز ژنوتیپ‌های مختلف در میزان قابل توجهی از نمونه‌های مثبت، لزوم استفاده از سایر پرایمرها و انجام بررسی‌های مولکولی بیش‌تر جهت انتخاب و طراحی پرایمرهای جدید را مطرح می‌کند.

کلیدواژه‌ها: روتاویروس، ژنوتیپ، گاستروانتریت، Multiplex PCR

مقدمه:

روتاویروس‌های انسانی گروه A شایع‌ترین عامل ویروسی اسهال شدید کودکان و نوزادان در سراسر جهان هستند. اگرچه عوامل باکتریایی، انگلی و سایر عوامل ویروسی از جمله کالیسی ویروس‌ها، ادنو ویروس‌ها، ویروس‌های نورواک و شبه نورواک، استرو ویروس‌ها و غیره از عوامل مهم مسبب گاسترو انتریت هستند، ولی روتاویروس‌ها به تنهایی بیش از ۴۰ درصد موارد اسهال شدید را در کودکان و نوزادان در کشورهای توسعه یافته و درحال توسعه ایجاد می‌کنند. درگیری با روتاویروس‌ها سالیانه منجر به بستری شدن میلیون‌ها کودک و حدود ۶۰۰ هزار مورد تلفات می‌شود که عمده این موارد در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهند. روتاویروس‌ها فاقد غشاء هستند، کپسید سه لایه دارند و ژنوم آن‌ها RNA دو رشته‌ای شامل ۱۱ قطعه است. روتاویروس‌ها براساس نوع شاخص‌های آنتی‌ژنی پروتئین ساختاری VP6 به ۷ گروه طبقه‌بندی می‌شوند. روتاویروس‌های گروه A با توجه به نوع دو پروتئین VP4 و VP7 واقع بر لایه خارجی کپسید که هدف اصلی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ضد ویروس هستند به ژنوتیپ‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. P تایپینگ براساس گوناگونی پروتئین‌های VP4

و G تایپینگ براساس حضور انواع مختلف پروتئین VP7 انجام می‌شود.[۱]

واکسیناسیون به عنوان تنها راه پیشگیری از ابتلا به این بیماری و تلفات در کودکان مطرح است. در سالیان اخیر دو نوع واکسن با نام‌های روتا تک (Rota Teq) و روتاریکس (Rotarix) عرضه شده که استفاده از آن‌ها کاهش قابل توجهی در میزان شیوع و تلفات ناشی از درگیری با روتاویروس‌ها به دنبال داشته است.[۲و۳و۴] به دلیل زیان‌های اقتصادی شدید و تلفات قابل توجه ناشی از موارد اسهال روتاویروسی، سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۵ طرح پایش بیمارستانی جهت شناسایی ژنوتیپ‌های شایع در کشورهای مختلف را به منظور طراحی واکسن مناسب و مؤثر پیشنهاد کرد.[۲] با توجه به کمبود پیشینه تحقیقاتی مستند در داخل کشور (به ویژه در شهرستان کرج) از یک سو و موقعیت جغرافیایی و بافت اجتماعی این شهر از سوی دیگر، مطالعه حاضر با هدف تعیین ژنوتیپ‌های دخیل در عفونت روتاویروسی در کودکان مبتلا به گاستروانتریت این شهر انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه مقطعی در آزمایشگاه تحقیقات مولکولی گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج بر روی تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع مربوط به کودکان زیر ۵ سال مبتلا به گاستروانتریت مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید باهنر شهرستان کرج از مهر تا دی ماه سال ۱۳۹۰ انجام شد. RNA نمونه‌ها بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از کیت RNX plus (سیناژن) و طبق دستور کار شرکت سازنده استخراج و در دمای ۷۰- درجه سیلیسیوس نگه‌داری شد.

واکنَش RT-PCR به منظور بررسی حضور قطعه کدکننده پروتئین VP4 روتاویروس‌های گروه A در نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای Con3 و Con2 بهینه‌سازی و انجام شد.[۵] در این تحقیق نمونه‌های مدفوع کودکان مبتلا به اسهال که آلودگی آن‌ها به روتاویروس‌های انسانی گروه A، با استفاده از کیت ProSpect Rotavirus (Oxoid, UK) به روش الایزای مستقیم تأیید شده بود، از بیمارستان فوق تخصصی کودکان مفید تهران تهیه و به عنوان شاهد مثبت در واکنش‌های مولکولی استفاده شد. ابتدا ۵ میکرولیتر RNA (استخراج شده از نمونه‌های مختلف) به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سیلیسیوس قرار گرفت. سپس به ۱۵ میکرولیتر مخلوط RT شامل ۴ میکرولیتر RT buffer (5X) ، ۱ میکرولیتر (۱۰mM) dNTPs، ۱ میکرولیتر (۱۰۰ واحد) آنزیم RT، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمرهای Con2 و Con3 (۸ پیکومول از هر کدام) و ۸ میکرولیتر آب تیمار شده با "دی اتیل پایروکربنات" اضافه شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه انجام و با قرار گرفتن لوله‌ها در دمای ۷۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، متوقف شد. PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل اجزای زیر به انجام رسید: ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمرهای Con2 و Con3 (۱۰ پیکومول از هر کدام)، ۰/۴ میکرولیتر (۲ واحد) آنزیم Taq، ۱۷/۳۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۲ میکرولیتر cDNA محصول واکنش RT به عنوان الگو. واکنش در ۳۵ چرخه زیر انجام شد: واسرشت در ۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه. واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه و طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس انجام شد. به منظور تعیین نوع و فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف P در نمونه‌های مثبت، روش Semi nested multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژنوتیپ‌های مختلف بهینه‌سازی شد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

نام	ویژه	موقعیت اتصال	توالی پرایمر	طول آمپلیکون جفت باز
9con1	VP7	37-56	TAGCTCCTTTTAAGTATGG	905
9con2		922-941	GTATAAAATACTTGCCACCA	
9T-1	G1	176-195	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	159
9T-2	G2	262-281	GTTAGAAATGATTCTCAACT	245
9T-3	G3	484-503	GTCCAGTTGCAGTGTTAG	467
9T-4	G4	423-440	GGGTCGATGGAAAATTCT	404
9T-9B	G9	131-147	TATAAAGTCCATTGCAC	111
G12R	G12	471-490	AGTACAGTACCAAATTTCAT	454
Con3	VP4	11-32	TGGCTTCGCTCATTTATAGAC	
Con2		868-887	ATTTCGGACCATTTATAACC	877
1T-1	P8	339-356	TCTACTTGGATAACGTGC	346
2T-1	P4	474-494	CTATGGTTAGAGGTTAGAGTC	484
3T-1	P6	259-278	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	268
ND-2	P11	116-133	AGCGAACTCACCAATCTG	123

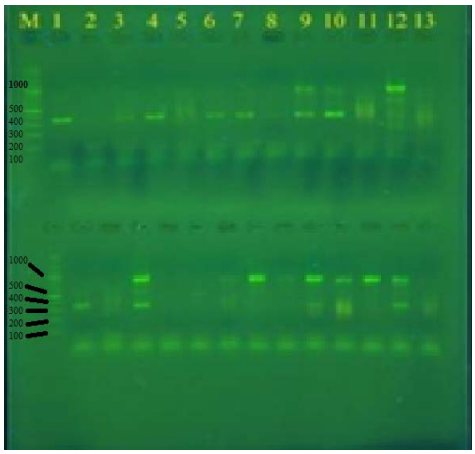
اجزا و مراحل دمایی واکنش عبارت بودند از: ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) پرایمر Con3، ۰/۲۵ میکرولیتر (۵ پیکومول) از هر کدام از پرایمرهای ویژه ژنوتیپ‌های P4, P6, P8, P11، ۰/۲ میکرولیتر (۱ واحد) آنزیم Taq، ۱۸/۰۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۱ میکرولیتر محصول PCR قطعه VP4. واکنش در ۳۵ چرخه زیر انجام شد: واسرشت در ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۴۸ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه. واسرشت اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه و طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس انجام شد.

سپس RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه قطعه VP7 (9Con2 و 9Con1) بر روی نمونه‌های مثبت با شرایط دمایی و مقادیر اجزای مشابه تکثیر قطعه VP4 بهینه‌سازی و انجام شد. در مرحله بعد، ژنوتیپ‌های مختلف G با استفاده از پرایمرهای ویژه (مندرج در جدول شماره ۱) و اجزا و مراحل مشابه P تایپینگ تعیین شدند.

تشکیل قطعه‌های مورد نظر در محصولات PCR در هر مرحله از واکنش‌های مولکولی به روش الکتروفورز بر روی ژل اگارز ۱/۵ درصد (۲ درصد جهت ژنوتایپینگ) بررسی شد.

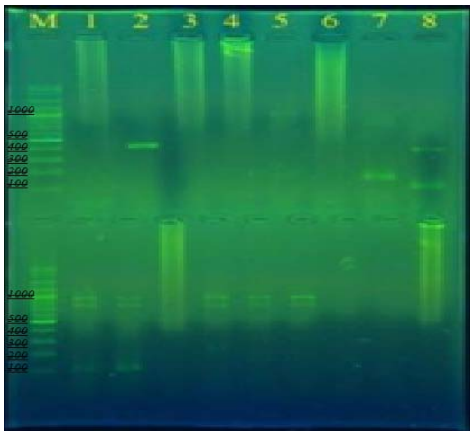
❋ یافته‌ها:

بررسی محصولات RT-PCR به روش الکتروفورز بر روی ژل اگارز ۱/۵درصد نشان‌دهنده آلودگی به روتاویروس (براساس تکثیر قطعه ۸۷۷ جفت بازی کدکننده پروتئین VP4) در۲۷ نمونه (۱۳/۵درصد) بود. براساس نتایج الکتروفورز محصولات Semi nested multiplex PCR بر روی ژل ۲ درصد، فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف P به شرح زیر بود: ۴۴ درصد P[8] (۱۲ نمونه)، ۴ درصد P[4] (۱ نمونه)، ۴ درصد P[6]P[8] (۱ نمونه). تکثیر قطعه ۹۰۵ جفت بازی (مربوط به پروتئین VP7) در ۱۳ مورد از نمونه‌های مثبت مشاهده شد و فراوانی G تایپ‌های مختلف عبارت بود از: ۱۵ درصد G1 (۲ نمونه)، ۸ درصد G2 (۱ نمونه)، ۸ درصد G4 (۱ نمونه)، ۱۵ درصد G9 (۲ نمونه) و ۸ درصد G4G9 (۱ نمونه) (شکل‌های شماره ۱ و ۲).



شکل ۱- ژل الکتروفورز مربوط به جداسازی ژنوتیپ‌های P

چاهک M: مارکر، چاهک ۱۰،۹،۸،۷،۶،۴،۳،۱ از ردیف بالا: ژنوتیپ P8 (قطعه bp ۳۴۶)، چاهک ۵ از ردیف بالا: ژنوتیپ P4 (قطعه bp ۴۸۴)، چاهک ۱۲ از ردیف بالا: ژنوتیپ مخلوط P6P8 (قطعات bp ۲۶۸ و ۳۴۶)، چاهک ۱۲،۹،۳،۱ از ردیف پایین: ژنوتیپ‌های P8 (قطعه bp ۳۴۶)



شکل۲- ژل الکتروفورز مربوط به جداسازی ژنوتیپ‌های G

چاهک M: مارکر، چاهک ۲ از ردیف بالا: G4 (قطعه bp ۴۰۴)، چاهک ۵ از ردیف بالا: شاهد مثبت، چاهک ۷ از ردیف بالا: ژنوتیپ G1 (قطعه bp ۱۵۹)، چاهک ۸ از ردیف بالا: نمونه مخلوط ژنوتیپ G4G9، چاهک ۱و۲ از ردیف پایین: ژنوتیپ G9 (قطعه bp ۱۱۱)، چاهک ۴ از ردیف پایین: ژنوتیپ G2 (قطعه bp ۲۴۵)، چاهک ۵ از ردیف پایین: ژنوتیپ G1

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که P[8]، G1 و G9 ژنوتیپ‌های غالب در موارد درگیری گوارشی کودکان در شهر کرج بودند.

تحقیق‌های انجام شده در هندوستان، ایالات متحده، بنگلادش، دانمارک، فرانسه و بورکینافاسو نیز G1,G9 و P[8] در زمره ژنوتیپ‌های غالب در موارد درگیری گزارش شده‌اند.[۴-۹] نکته شایان توجه نتایج تحقیق‌های به عمل آمده در سالیان اخیر در مقایسه با دهه‌های گذشته پیدایش و افزایش قابل توجه ژنوتیپ G9 در موارد درگیری ناشی از روتاویروس‌هاست. از این‌رو G9 را ژنوتیپ نوظهور در برخی از نقاط جهان معرفی کرده‌اند.[۵و۶] البته علی‌رغم همخوانی ظاهری انواع ژنوتیپ‌های غالب گزارش شده در تحقیق‌های فوق، عدم امکان تعیین تیپ در میزان قابل توجهی از ژنوتیپ‌ها، قطعیت و دقت در اعلام تیپ‌های غالب در نقاط مختلف جهان را زیر سؤال می‌برد.

شجاع و همکاران در سال ۲۰۱۲ ضمن بررسی قطعه کدکننده VP7 در روتاویروس‌های جدا شده از نمونه‌های آلوده در بیمارستان مفید تهران، G1 را به عنوان ژنوتیپ غالب معرفی کردند.[۱۰] نجفی و همکاران در سال ۲۰۱۲ ضمن بررسی نمونه‌های حاصل از دو بیمارستان شیراز، ژنوتیپ مخلوط G1/G4 را ژنوتیپ شایع در نمونه‌های مورد بررسی معرفی کردند.[۱۱] کارگر و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی نمونه‌های حاصل از کودکان زیر ۵ سال در دو بیمارستان شهرستان جهرم، G4 و G1 را به ترتیب به عنوان شایع‌ترین ژنوتیپ‌های دخیل در موارد درگیری گزارش کردند.[۱۲] مدرس گیلانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ ضمن بررسی نمونه‌های مدفوع نوزادان مراجعه‌کننده به بیمارستان بهرامی تهران و معرفی G1، P[8] و P[4] به عنوان ژنوتیپ‌های غالب، با توجه به وقوع تلفات ناشی از موارد اسهال روتاویروسی بر لزوم برنامه‌ریزی جهت انجام واکسیناسیون در نوزادان تأکید کردند.[۱۳] نتایج تحقیق فوق با یافته‌های تحقیق دیگر این گروه در سال ۲۰۱۱ بر روی ۷۰۰ نمونه مدفوع حاصل از دو بیمارستان تخصصی اطفال در تهران هماهنگ بود.[۱۴]

میزان آلودگی نمونه‌ها به روتاویروس در تحقیق حاضر ۱۳/۵ درصد بود. علت پایین‌تر بودن آن در مقایسه با نتایج تحقیق‌های مشابه داخلی و خارجی (۳۶/۹ درصد[۵]، ۲۷/۲ و ۱۹/۴درصد[۶]، ۳۳/۸ درصد[۹]، ۳۴/۷۸ درصد[۱۱]، ۴۶/۰۲ درصد[۱۲]، ۲۰ درصد[۱۳] و ۱۹درصد[۱۴])، شاید به این دلیل باشد که نمونه‌های این تحقیق از کودکان با درگیری گوارشی (مبتلا به گاستروانتریت صرف‌نظر از ابتلا یا عدم ابتلا به اسهال) جمع‌آوری شدند، در حالی‌که در اغلب بررسی مورد اشاره نمونه‌ها از کودکان و نوزادان با اسهال شدید اخذ شده بودند.

در ارتباط با عدم تعیین تیپ (نوع ژنوتیپ‌های P و G) و علت تشکیل نشدن قطعه VP7 در میزان قابل توجهی از نمونه‌های مثبت حاصل از این تحقیق، می‌توان به فرضیه محتمل تغییر در توالی نوکلئوتیدی جایگاه اتصال پرایمرهای مورد استفاده در جدایه‌های داخلی اشاره کرد. در تحقیق سایموندز و همکاران از مجموع ۴۸۹ نمونه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف جهان طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۶، تیپ ۳۶۶ نمونه با استفاده از پرایمرهای

معمول جهت تعیین نوع تیپ P (Con3/Con2) تعیین نشد، در حالی‌که با به کارگیری پرایمرهای جدید (VP4F/VP4R) تیپ ۶۳ درصد از نمونه‌های مذکور با موفقیت تعیین شد.[۱۵]

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان‌دهنده دخالت P[8]، G1 و G9 به عنوان ژنوتیپ‌های غالب بود. البته عدم تکثیر قطعات مربوط به پروتئین VP7 و نیز ژنوتیپ‌های مختلف در میزان قابل توجهی از نمونه‌های مثبت، لزوم استفاده از پرایمرهای دیگر و انجام بررسی‌های مولکولی بیش‌تر جهت انتخاب و طراحی پرایمرهای جدید به منظور تشخیص روتاویروس‌ها و طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های دخیل در موارد درگیری را مطرح کرد.

❋ سپاس‌گزاری:

از همکاری آقای امیر بختیاری کارشناس آزمایشگاه تحقیقات مولکولی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج قدردانی می‌شود.

❋ مراجع:

1. Brooks FG, Carroll KC, Butel JS, et al. Medical microbiology. 25th ed. New York: McGraw Hill; 2010. 508-12

2. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. Clin Microbiol Rev 2008 Jan; 21 (1): 198-208

3. Steele AD, Neuzil KM, Cunliffe NA, et al. Human rotavirus vaccine Rotarix ™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. BMC Infect Dis 2012 Sep 13; 12: 213

4. Sanzone AM, Begue RE. Rotavirus hospital surveillance in the era of immunization. Open Vaccine J 2010; 3: 89-95

5. Chakravarti A, Chauhan MS, Sharma A, Verma V. Distribution of human rotavirus G and P genotypes in a hospital setting from Northern India. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010 Sep; 41 (5): 1145-52

6. Rahman M, Sultana R, Podder G, et al. Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. Virol J 2005 Mar 24; 2: 24

7. Fischer TK, Eugen-Olsen J, Pedersen AG, et al. Characterization of rotavirus strains in a Danish population: high frequency of mixed infections and diversity within the VP4 gene of P[8] strains. J Clin Microbiol 2005 Mar; 43 (3): 1099-104

8. Bon F, Fromantin C, Aho S, et al. G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. The AZAY Group. J Clin Microbiol 2000 Apr; 38(4): 1681-3

9. Bonkoungou IJ, Damanka S, Sanou I, et al. Genotype diversity of group A rotavirus in children with acute diarrhea in urban Burkina Faso, 2008-2010. J Med Virol 2011 Aug; 83 (8): 1484-90

10. Shoja Z, Tagliamonte M, Jalilvand S, et al. Molecular characterization analysis of the outer protein layer (VP7) from human rotavirus A genotype G1 isolate identified in Iran: implications for vaccine development. New Microbiol 2012 Oct; 35 (4): 415-27

11. Najafi A, Kargar M, Jafarpour T. Burden and typing of rotavirus group A in children with acute gastroenteritis in Shiraz, southern Iran. Iran Red Crescent Med J 2012 Sep; 14 (9): 531-40

12. Kargar M, Akbarizadeh AR. Prevalence and molecular genotyping of group A rotaviruses in Iranian children. Indian J Virol 2012 Jan; 23 (1): 24-8

13. Modarres Gilani S, Habibi M, Rahbari-manesh A, Modarres Gilani S. Nosocomial rotavirus gastroenteritis in pediatric patients: a cross sectional study using molecular analysis. J Pediat Sci 2013; 5 (1): e170

14. Modarres S, Rahbarimanesh AA, Edalat R, et al. Human rotavirus genotypes detection among hospitalized children, a study in Tehran, Iran. Arch Iran Med 2011 Jan; 14 (1): 39-45

15. Simmonds MK, Armah G, Asmah R, et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: strategies for typing previously untypeable strains. J Clin Virol 2008 Aug; 42 (4): 368-73