Thesis Title Serotypic and Genotypic Analyses of Group A Rotavirus in Human and Porcine in Chiang Mai

Author Ms. Pattara Khamrin

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Niwat Maneekarn Chairperson
Assoc. Prof. Supatra Peerakome Member

ABSTRACT

Group A rotavirus is the most common etiologic agent of acute gastroenteritis in young children and is also associated with diarrhea in the young of many animal species, including porcine. The present study had investigated the prevalence of group A rotavirus and the distribution patterns of G-genotype and P-genotype in children hospitalized with diarrhea and diarrheic piglets in the same epidemic season in Chiang Mai area. The fecal specimens collected from children hospitalized with diarrhea and from diarrheic piglets during the year 2000 to 2001 were tested for the presence of group A rotavirus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The G-genotype, P-genotype and NSP4 genetic group were determined by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) using primers specific for G-genotype, P-genotype and NSP4 genetic group, respectively. The virus isolates of which the G-genotype, P-genotype and NSP4 genetic group could not be determined by multiplex RT-PCR, the VP7, VP4, and NSP4 genes of these isolates were then sequenced and their G-genotype, P-genotype and NSP4 genetic group were assigned based on the relative homology with those of the reference strains available in the GenBank database. The total of 315 fecal specimens collected from hospitalized diarrheal children, group A rotavirus was detected in 107 specimens (34%). Among

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

107 isolates of human group A rotavirus, it was surprisingly found that the majority of the isolates (98 of 107) were G9 (91.6%) and only 3 (2.8%) were G2 and 6 (5.6%) were G3. For the P-genotype, the majority of the samples (103 of 107) were P[8] (96.3%) and only 3 (2.8%) were P[4]. However, there was 1 isolate of P-nontypeable. When examined for the relative frequencies of various combinations of G-genotype and P-genotype, it was found that all isolates of the most predominant G9 genotype were combined with majority of the most common P[8] genotype. As a result of this combination, the G9P[8] became the most prevalent genotype detected in this study and accounted for 91.6% (98 of 107) of rotavirus in children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai area. Analysis of NSP4 gene of human G9 rotavirus isolates revealed that 97 of 98 isolates belonged to genetic group B (Wa) and unexpectedly, 1 isolate (Mc59) exhibited dual specificity to both genetic groups B (Wa) and C (RRV).

The investigation of the prevalence of porcine rotavirus in diarrheic piglets in the same epidemic season revealed that 22.3% (39 out of 175) were group A rotavirus. Among 39 isolates of porcine group A rotavirus, 16 (41.0%) were G3, 2 (5.1%) were G5 and 1 (2.6%) was G9 genotype and approximately half (20 of 39; 51.3%) were G-nontypeable isolates. For the P-genotype determination, P[6] and P[7] were found in diarrheic piglets and represented 51.3% (20 of 39) and 2.6% (1 of 39), respectively. Again, about half (18 of 39; 46.1%) of porcine group A rotavirus isolates were P-nontypeable isolates. When examined for the relative frequencies of various combinations of G-genotype and P-genotype, the completed combination of G-genotype and P-genotype were observed only in 2 isolates of G3P[6] and 1 isolate of G9P[7] whereas most of the isolates were either partially identified, i.e. only G-genotype or P-genotype was identified, or both G-genotype and P-genotype were unidentifiable.

An attempt had been made to further identify the nontypeable isolates of human and porcine origins, by sequencing of their VP7 and VP4 genes, respectively. It was found that the only one P-nontypeable of human isolate turned out to be P[3], which was an unusual P-genotype in human. In contrast, among 20 isolates of porcine G-nontypeable, by analysis of VP7 nucleotide sequence, only 5 isolates could be

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

identified as G4 while the other 15 remained the G-nontypeable. In addition, among 18 isolates of porcine rotavirus P-nontypeable, they could be identified by nucleotide sequencing as P[12], P[13], and P[19] for 1, 3 and 13 isolates, respectively. However, there was 1 isolate remained P-nontypeable due to its VP4 gene could not be amplified even though the PCR product was readily generated from its VP7 gene. It was interesting to point out that 13 isolates of P[19] of porcine rotavirus shared more than 90% of nucleotide sequence homology with P[19] of human rotavirus reference strains (Mc323 and Mc345) previously reported in 1988-1989 in children hospitalized with diarrhea at McCormick Hospital in Chiang Mai province. This finding implies that the interspecies transmission among rotaviruses circulated in Chiang Mai area might be taken place in the nature. In fact, there was one isolate of human rotavirus (coded S52) detected in the present study was found to be the unusual strain that shared a great homology of its VP4 and NSP4 nucleotide sequences with those of the reference strains of caprine (GRV) and canine, respectively. This observation is an additional evidence to support the notion that interspecies transmission of rotaviruses might be probably occurring in the natural circumstance.

In conclusion, the information obtained from this study demonstrated that G9P[8] rotavirus has emerged with an exceptionally high prevalent and accounted for 91.6% of rotavirus detected in children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai area during the year 2000 to 2001. Moreover, several evidences observed in this study implied that reassortment and interspecies transmission among rotavirus currently circulated in Chiang Mai community might be taken place in the nature.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ซีโรไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อโรตาไวรัส กลุ่มเอ ในคนและสุกรในจังหวัดเชียงใหม่
ผู้เขียน	นางสาวภัทรา คำรินทร์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์ ประธานกรรมการ รศ. สุพัตรา พีราคม กรรมการ

บทคัดย่อ

โรตาไวรัสกลุ่มเอเป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันได้บ่อยในเด็กเล็กและยังก่อให้เกิดอาการอุจจาระร่วงในลูกสัตว์หลายชนิดรวมถึงลูกสุกรด้วย การศึกษานี้ได้ตรวจหาความชุกและศึกษาการกระจายตัวของ G-genotype และ P-genotype ของเชื้อโรตาไวรัสกลุ่มเอในเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยโรคอุจจาระร่วงและในลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงในเขตจังหวัดเชียงใหม่ในช่วงการระบาดเดียวกัน โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระจากเด็กเล็กและลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงในช่วงปี พ.ศ. 2543 ถึงปี พ.ศ. 2544 ตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้นำมาตรวจหาเชื้อโรตาไวรัสกลุ่มเอโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และทำการจำแนกชนิดของ G-genotype P-genotype และ NSP4 genetic group โดยวิธี multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ G-genotype P-genotype และ NSP4 genetic group ตามลำดับ ส่วนไวรัสที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ G-genotype P-genotype และ NSP4 genetic group ได้โดยวิธี multiplex RT-PCR จะถูกนำไปศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP7 VP4 และ NSP4 ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อมาตราฐานที่ใช้ในการอ้างอิงซึ่งมีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จากการตรวจตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยโรคอุจจาระร่วงจำนวน 315 ตัวอย่าง พบโรตาไวรัสกลุ่มเอจำนวน 107 ตัวอย่าง (34%) และในจำนวนโรตาไวรัสกลุ่มเอทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

107 ตัวอย่างนั้นเมื่อทำการตรวจจำแนกชนิดของ G-genotype และ P-genotype ได้พบโดยที่คาดไม่ถึงว่าเชื้อโรตาไวรัสกลุ่มเอ ส่วนใหญ่ (98 ตัวอย่างจาก 107 ตัวอย่าง) เป็นชนิด G9 (91.6%) และมีเพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้นเป็นชนิด G2 (2.8%) และ 6 ตัวอย่างเป็นชนิด G3 (5.6%) ส่วนการตรวจหาชนิดของ P-genotype นั้นพบว่าส่วนใหญ่ (103 ตัวอย่างจาก 107 ตัวอย่าง) เป็นชนิด P[8] (96.3%) และมีเพียง 3 ตัวอย่าง เป็น P[4] (2.8%) อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างอุจจาระ 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ P-genotype ได้ จากการศึกษาหาความถี่ของ G-genotype และ P-genotype ร่วมกัน พบว่า G9 ซึ่งเป็น G-genotype ที่พบสูงที่สุดในการศึกษาในครั้งนี้ทุก isolates พบร่วมกับ P[8] genotype ซึ่งก็เป็น P-genotype ที่พบสูงที่สุดเช่นเดียวกัน ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ลักษณะ genotype ที่พบมากที่สุดจึงเป็นแบบ G9P[8] ซึ่งคิดเป็น 91.6 เปอร์เซ็นต์ (98 ตัวอย่างจาก 107 ตัวอย่าง) ของโรตาไวรัสที่พบในเด็กที่มารับการรักษาโรคอุจจาระร่วงในโรงพยาบาลในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จากการศึกษายีน NSP4 ของโรตาไวรัส G9 ทั้งหมดพบว่า 97 ตัวอย่างจาก 98 ตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่ม genetic group B (Wa) ส่วนอีกหนึ่งตัวอย่าง (Mc59) พบอย่างคาดไม่ถึงว่ามี genetic group ที่จำเพาะต่อทั้ง genetic group B (Wa) และ genetic group C (RRV)

ส่วนการศึกษาหาความชุกของโรตาไวรัสในลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงในช่วงการระบาดเดียวกันกับของคน พบเชื้อโรตาไวรัสกลุ่มเอ 22.3 เปอร์เซ็นต์ (39 ตัวอย่างจาก 175 ตัวอย่าง) โดย 39 ตัวอย่างของเชื้อไวรัสกลุ่มเอในลูกสุกรนั้นเมื่อตรวจหาชนิดของ G-genotype พบว่า 16 ตัวอย่างเป็นชนิด G3 (41.0%) 2 ตัวอย่างเป็นชนิด G5 (5.1%) และ 1 ตัวอย่างเป็นชนิด G9 (2.6%) และประมาณครึ่งหนึ่งของตัวอย่างทั้งหมด (20 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง; 51.3%) ไม่สามารถตรวจแยกชนิดของ G-genotype ได้ ส่วนการตรวจแยกชนิดของ P-genotype นั้นพบ P[6] สูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 51.3 (20 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง) และ P[7] คิดเป็นร้อยละ 2.6 (1 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง) ตามลำดับ และประมาณครึ่งหนึ่งของตัวอย่างทั้งหมด (18 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง; 46%) ของโรตาไวรัสกลุ่มเอที่แยกได้จากลูกสุกรไม่สามารถตรวจแยกชนิดของ P-genotype ได้ จากการศึกษาหาความถี่ร่วมกันของ G-genotype และ P-genotype ของเชื้อไวรัสกลุ่มเอในลูกสุกร พบว่ามีเพียง 3 ตัวอย่างที่สามารถตรวจแยกชนิดของ G-genotype และ P-genotype ได้ครบสมบูรณ์โดย 2 ตัวอย่างเป็น G3P[6] และอีก 1 ตัวอย่างเป็น G9P[7] ในขณะที่ตัวอย่างส่วนใหญ่การจำแนกชนิดของ G-genotype และ P-genotype ยังไม่สมบูรณ์เนื่องจากบางตัวอย่างสามารถจำแนกชนิดได้เฉพาะ G-genotype หรือ P-genotype เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือบางตัวอย่างไม่สามารถจำแนกชนิดทั้ง G-genotype และ P-genotype ได้

เชื้อโรตาไวรัสที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ G-genotype และ P-genotype ได้โดยวิธี multiplex RT-PCR ทั้งของคนและของสุกรได้ถูกนำมาตรวจแยกชนิดของ G-genotype และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

P-genotype โดยวิธีการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP7 และ VP4 ตามลำดับ พบว่าเชื้อไวรัสกลุ่มเอของคน 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ P-genotype ได้นั้น เมื่อตรวจโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 แล้วพบว่ามีลักษณะ P-genotype เป็นชนิด P[3] ซึ่งเป็นชนิดที่ไม่ค่อยพบระบาดทั่วไปในคน ส่วนโรตาไวรัสของลูกสุกรจำนวน 20 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ G-genotype ได้ เมื่อตรวจโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP7 พบว่ามีเพียง 5 ตัวอย่างที่สามารถบอกชนิดของ G-genotype ได้และพบว่าทั้ง 5 ตัวอย่างเป็นชนิด G4 ส่วนที่เหลืออีก 15 ตัวอย่างยังคงไม่สามารถแยกชนิดของ G-genotype ได้เช่นเดิม นอกจากนี้โรตาไวรัสกลุ่มเอที่แยกได้จากลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงจำนวน 18 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ P-genotype ได้นั้น เมื่อตรวจโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 พบว่ามีลักษณะ P-genotype เป็นชนิด P[12] จำนวน 1 ตัวอย่าง P[13] จำนวน 3 ตัวอย่างและ P[19] จำนวน 13 ตัวอย่างตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังคงมีอีก 1 ตัวอย่างที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของ P-genotype ได้เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA จากยีน VP4 ได้ ถึงแม้ว่าจะสามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA ของยีน VP7 ของเชื้อตัวนี้ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 ของโรตาไวรัสที่แยกได้จากลูกสุกรที่พบว่า 13 ตัวอย่างมี P-genotype เป็นชนิด P[19] นั้นมีประเด็นที่น่าสนใจมากคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ได้จากลูกสุกรมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ P[19] ของคนซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการอ้างอิง (Mc323 และ Mc345) และเป็นเชื้อที่เคยมีรายงานว่าแยกได้จากเด็กที่เข้ารับการรักษาโรคอุจจาระร่วงในโรงพยาบาลแมคคอร์มิคในจังหวัดเชียงใหม่ในปีพ.ศ. 2531-2532 ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าอาจมีการแพร่ระบาดของเชื้อโรตาไวรัสข้ามไปมาระหว่างคนและสุกรเกิดขึ้นในธรรมชาติในเขตจังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนั้นแล้วการศึกษาครั้งนี้พบโรตาไวรัสกลุ่มเอที่แยกได้จากเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วง 1 ตัวอย่าง (รหัส S52) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 และ NSP4 คล้ายคลึงกับของเชื้อมาตรฐานสำหรับการอ้างอิงที่แยกได้จากแพะ (GRV) และสุนัขตามลำดับ ข้อมูลนี้เป็นหลักฐานเพิ่มเติมที่ช่วยสนับสนุนว่าอาจเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อโรตาไวรัสระหว่างคนและสัตว์เกิดขึ้นได้ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ

โดยสรุป ข้อมูลวิจัยทั้งหมดจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อโรตาไวรัสชนิด G9P[8] เป็นไวรัสระบาดใหม่ (emerging virus) และพบได้สูงถึง 91.6 เปอร์เซนต์ของเชื้อโรตาไวรัสทั้งหมดที่พบได้ในเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลในเขตจังหวัดเชียงใหม่ในระหว่างปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2544 นอกจากนี้ผลจากการศึกษาในครั้งนี้มีหลักฐานที่ช่วยสนับสนุนว่าอาจมีการแลกเปลี่ยนท่อนยีน (reassortment) และการแพร่ระบาดของเชื้อโรตาไวรัสข้ามจากสัตว์ไปสู่คนหรือจากคนไปสู่สัตว์เกิดขึ้นได้ในธรรมชาติในเขตจังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved