Thesis Title	Analyses of VP6 Gene of Rotavirus Strains with Unusual Subgroup Specificities, Development of Multiplex RT-PCR for Identification of VP6 Genogroups, and Evaluation of Genetic Linkage Between VP6 and NSP4 Genes
Author	Ms. Aksara Thongprachum
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Advisor Committee	Prof. Dr. Niwat Maneekarn — Chairperson Assoc. Prof. Supatra Peerakome — Member

ABSTRACT

Rotaviruses are the major cause of severe gastroenteritis in young children and young animals. The inner capsid protein VP6 bears the subgroup (SG) specificities that allows the classification of group A rotaviruses into SG I and SG II based on reactivity with SG-specific monoclonal antibodies (MAbs). However, some rotavirus strains could be recognized by both MAbs against SG I and SG II and some failed to be recognized by SG-specific MAbs so-called SG (I+II) and SG non-(I+II) rotavirus, respectively. The full-length VP6 amino acid sequences of rotavirus strains that displayed unusual subgroup specificities, SG (I+II) and SG non-(I+II), were analysed in comparison with those of SG I and SG II. A total of 27 strains of human rotaviruses isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis and 49 strains of porcine rotaviruses isolated from piglets with acute diarrhea in Chiang Mai province were included in this study. In human rotavirus, the deduced amino acid sequences of SG non-(I+II) were closely related with SG II rotavirus isolates (97.1% to 99.7% identity) and somewhat lower homology with SG I strains (91.4% to 92.7% identity). No point mutation or substitution that conferred the difference between SG non-(I+II) and SG II was observed in the entire sequence of VP6 protein. Human rotavirus strains which were serologically assigned as SG I were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

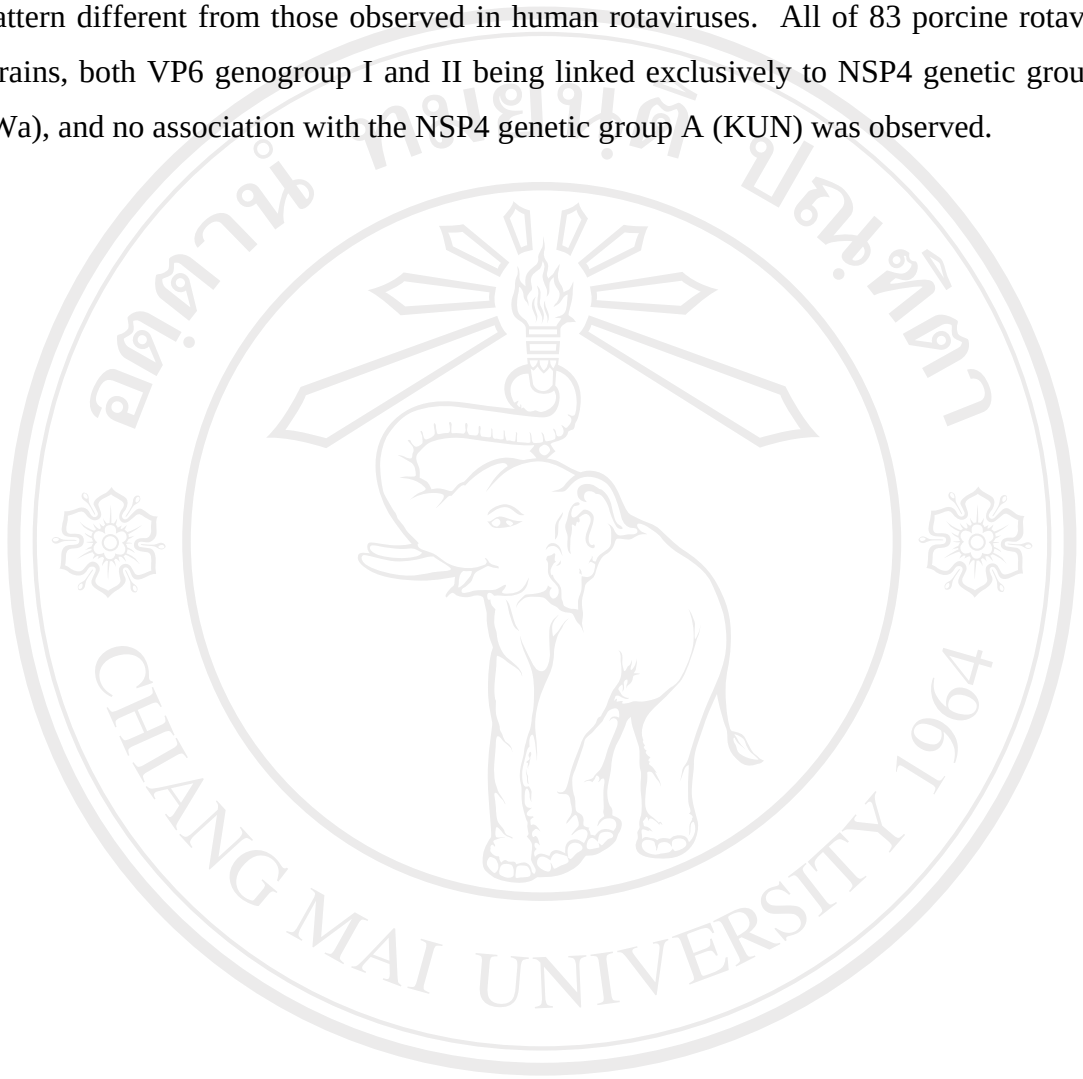
identified as VP6 genogroup I, while the virus strains serologically assigned as SG II and SG non-(I+II) were identified as VP6 genogroup II. Phylogenetic analysis of VP6 sequences of these human rotavirus strains confirmed the results of VP6 sequence alignment and extended further the classification of human rotavirus genogroups I and II into several lineages. The viruses of genogroup I consisted of two genetic lineages, IA and IB, whereas the viruses of genogroup II consisted of four genetic lineages, IIA, IIB, IIC, and IID. In porcine rotaviruses, the deduced amino acid sequences of SG (I+II) and SG non-(I+II) shared a high degree of homology (95.6% to 100%) with those of SG I rotaviruses and somewhat lower homology (91.7% to 94.3%) with those of SG II strains. The rotavirus strains serologically assigned as SG I, SG (I+II), and SG non-(I+II) were, therefore, identified as VP6 genogroup I, and the rotavirus strains serologically assigned as SG II were identified as VP6 genogroup II. Similar to human rotaviruses, the porcine rotaviruses were also classified into two genogroups, I and II, based on the VP6 sequence alignment. The phylogenetic analysis confirmed the results of VP6 sequence alignment and extended further the classification of porcine rotavirus genogroups I and II into several lineages. The strains with genogroup I consisted of three distinct lineages, IA, IB, and IC, whereas genogroup II consisted of two genetic lineages, IIA and IIB.

Subgrouping of human and porcine rotaviruses using SG-specific MAbs against the epitopes on the VP6 protein are sometime resulted in an incorrect assigning the subgroups of rotaviruses from SG II to SG I and SG non-(I+II) in human rotaviruses, and from SG I to SG II, SG (I+II) and SG non-(I+II) in porcine rotaviruses. In order to solve this problem, the multiplex RT-PCR was developed as an alternative tool for identification of VP6 genogroups in this study using the newly designed primers specific for genogroups I and II. The sensitivity and specificity of newly developed multiplex RT-PCR method were evaluated by testing with the selected human and porcine rotavirus isolates of SG I, SG II, SG (I+II), and SG non-(I+II) specificities. In this study, the genogroups of both human and porcine rotaviruses as determined by multiplex RT-PCR were in 100% agreement with those determined by VP6 amino acid sequence analysis. The multiplex RT-PCR method developed in the present study was successfully applicable for genogrouping of the rotavirus clinical isolates circulating both in children and in piglets with diarrhea in Chiang Mai area.

Furthermore, the present study also evaluated the genetic linkage between VP6 and NSP4 genes in human and porcine rotaviruses. In human rotaviruses, investigation of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

144 strains of rotaviruses revealed that VP6 genogroup I being linked to NSP4 genetic group A (KUN), while VP6 genogroup II being linked to NSP4 genetic group B (Wa). In contrast, the linkage between VP6 and NSP4 genes in porcine rotaviruses displayed the pattern different from those observed in human rotaviruses. All of 83 porcine rotavirus strains, both VP6 genogroup I and II being linked exclusively to NSP4 genetic group B (Wa), and no association with the NSP4 genetic group A (KUN) was observed.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ยีน VP6 ของเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะของ Subgroup ที่ผิดปกติ การพัฒนาการตรวจพิสูจน์ VP6 Genogroups โดยวิธี Multiplex RT-PCR และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน VP6 และยีน NSP4
ผู้เขียน	นางสาวอักษรา ทองประชุม
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์ ประธานกรรมการ รศ. สุพัตรา พีราคม กรรมการ

บทคัดย่อ

ไวรัสโรตาเป็นสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงในเด็กเล็กและในลูกสัตว์หลายชนิด โปรตีน VP6 ซึ่งเป็น capsid ชั้นในของเชื้อไวรัสโรตาจะมีความจำเพาะต่อ subgroup (SG) ต่างๆ ดังนั้นจึงใช้ในการจำแนกเชื้อไวรัสโรตากลุ่มเอออกเป็น SG I และ SG II โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAbs) ที่จำเพาะต่อแต่ละ subgroup อย่างไรก็ตามไวรัสโรตาบางสายพันธุ์สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อทั้ง SG I และ SG II เรียกสายพันธุ์นี้ว่า SG (I+II) และบางสายพันธุ์ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้งสองชนิดจึงเรียกสายพันธุ์นี้ว่า SG non-(I+II) การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของยีน VP6 ของเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะของ subgroup ที่ผิดปกติได้แก่สายพันธุ์ SG (I+II) และ SG non-(I+II) โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ SG I และ SG II ไวรัสโรตาที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นไวรัสโรตาที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งประกอบด้วยไวรัสโรตาที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลันจำนวน 27 ตัวอย่าง และที่แยกได้จากลูกสุกรป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วงจำนวน 49 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่าลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสโรตาที่แยกได้จากเด็กสายพันธุ์ SG non-(I+II) มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อสายพันธุ์ SG II สูงมาก (ร้อยละ 97.1-99.7) และมีความเหมือนที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ SG I (ร้อยละ 91.4-92.7) เมื่อตรวจดูลำดับกรดอะมิโนตลอดสายโปรตีน VP6 ของเชื้อสายพันธุ์ SG non-(I+II)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ SG II แล้วไม่พบการกลายพันธุ์หรือการแทนที่กรดอะมิโนที่จำเพาะที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่าง SG non-(I+II) และ SG II เลย ดังนั้นจากผลการศึกษานี้เชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่ถูกจำแนกว่าเป็น SG I โดยใช้ MAb ได้ถูกจำแนกว่าเป็นสายพันธุ์ VP6 genogroup I ส่วนสายพันธุ์ที่ถูกจำแนกว่าเป็น SG II และ SG non-(I+II)ได้ถูกจำแนกว่าเป็นสายพันธุ์ VP6 genogroup II เมื่อตรวจพิสูจน์โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนเพื่อจัดจำแนกกลุ่มและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาโดยวิธีการที่เรียกว่าการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic พบว่าผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP6 ของไวรัสตาในคนโดยวิธี Phylogenetic นี้ให้ผลตรงกันกับการวิเคราะห์โดยวิธีการหาความเหมือนของลำดับอะมิโนและยังสามารถจำแนกไวรัสโรตา genogroup I และ II เป็นตระกูลต่างๆได้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยที่เชื้อไวรัสโรตา genogroup I แบ่งออกเป็น 2 ตระกูลคือ IA และ IB ส่วนเชื้อไวรัสโรตา genogroup II แบ่งเป็น 4 ตระกูลคือ IIA IIB IIC และ IID สำหรับไวรัสที่แยกได้จากลูกสุกรนั้นพบว่าโปรตีน VP6 ของเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ SG (I+II) และ SG non-(I+II) มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับไวรัสสายพันธุ์ SG I สูงมาก (ร้อยละ 95.6-100) ในขณะที่มีความเหมือนที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SG II (ร้อยละ 91.7-94.3) ดังนั้นไวรัสโรตาที่ถูกจำแนกว่าเป็น SG I SG (I+II) และ SG non-(I+II) จึงถูกจำแนกเป็นสายพันธุ์ VP6 genogroup I ส่วนไวรัสโรตาสายพันธุ์ SG II ถูกจำแนกเป็นสายพันธุ์ VP6 genogroup II จะเห็นได้ว่าไวรัสโรตาในสุกรจะถูกจำแนกเป็น genogroup I และ II เช่นเดียวกับไวรัสโรตาในคน การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP6 ของไวรัสโรตาในสุกรโดยวิธี phylogenetic จะให้ผลเหมือนกับการวิเคราะห์โดยดูความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน และยังสามารถจำแนกไวรัสโรตา genogroup I และ II เป็นตระกูลต่างๆ ได้ละเอียดยิ่งขึ้นเช่นเดียวกัน โดยเชื้อไวรัสโรตา genogroup I แบ่งออกเป็น 3 ตระกูลคือ IA IB และ IC ส่วนไวรัสโรตา genogroup II แบ่งออกเป็น 2 ตระกูลคือ IIA และ IIB

การจำแนกไวรัสโรตาที่แยกได้จากคนและจากสุกรออกเป็น subgroup ต่างๆโดยใช้ MAbs ที่จำเพาะต่อ SG I และ SG II มีผลให้การจำแนก subgroup ผิดได้เช่นจาก SG II เป็น SG I และ SG non-(I+II) สำหรับไวรัสโรตาในคน และจาก SG I เป็น SG II SG (I+II) และ SG non-(I+II) สำหรับไวรัสโรตาในสุกร เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าวในการศึกษาในครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธี multiplex RT-PCR เพื่อใช้ในการจำแนก genogroup ต่างๆของไวรัสโรตาโดยได้ออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อ genogroup I และ II ขึ้นใหม่ และได้ประเมินความไวและความจำเพาะของวิธี multiplex RT-PCR และของ primers ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้โดยการทดสอบกับไวรัสโรตาสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งในคนและในสุกร ได้แก่สายพันธุ์ที่มี subgroups เป็น SG I SG II SG (I+II) และ SG non-(I+II) พบว่าการจำแนก genogroups ของไวรัสโรตาโดยวิธี multiplex RT-PCR ให้ผลตรงกันร้อยละ 100 กับการจำแนกโดยวิธีวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP6 จะเห็นได้ว่าวิธี muliplex RT-PCR ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถใช้ในการจำแนกไวรัสโรตาที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสุกรป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ได้เป็นอย่างดีและมีความถูกต้องแม่นยำ

นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังได้ทำการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน VP6 และยีน NSP4 ของเชื้อไวรัสโรตาทั้งไวรัสโรตาที่แยกได้จากคนและจากสุกร โดยได้ทำการศึกษาไวรัสโรตาในคนจำนวน 144 สายพันธุ์ พบว่า VP6 genogroup I จะพบร่วมกับ NSP4 genetic group A (KUN) และ VP6 genogroup II จะพบร่วมกับ NSP4 genetic group B (Wa) เสมอ ส่วนการศึกษาไวรัสโรตาในสุกรจะพบความสัมพันธ์ของยีน VP6 และยีน NSP4 แตกต่างไปจากไวรัสโรตาในคน จากการศึกษาตัวอย่างไวรัสโรตาในสุกรจำนวน 83 สายพันธุ์พบว่ายีน VP6 ทั้งหมด ทั้ง genogroup I และ II จะพบร่วมกับ NSP4 genetic group B (Wa) โดยไม่พบร่วมกับ NSP4 genetic group A (KUN) เลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved