

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาคุณลักษณะเฉพาะในระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการติดเชื้อจากสัตว์สู่คนของเชื้อไวรัสโรตาที่พบในผู้ป่วยเด็กและในลูกสุกรที่มีอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลัน

ผู้เขียน นางสาว อภาภรณ์ ขอดมีกลิ่น

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา ดร. ภัทรา คำรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ.ดร. นีวัฒน์ มณีกาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไวรัสโรตาเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงในเด็กทารก เด็กเล็ก และในลูกสัตว์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุกร ความใกล้ชิดกันระหว่างคนและสุกรอาจทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์และมีการแลกเปลี่ยนท่อนยีนระหว่างที่มีการติดเชื้อร่วมในเซลล์เดียวกันและทำให้เกิดไวรัสลูกผสมชนิดใหม่เกิดขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาทางระบาดวิทยาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่ามีการตรวจพบการแลกเปลี่ยนท่อนยีนระหว่างเชื้อไวรัสโรตากลุ่มเอของคนและของสุกรเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสโรตาของคนและสุกรอาจเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติ จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาระบาดวิทยาและตรวจหาคุณลักษณะเฉพาะในระดับโมเลกุลของไวรัสโรตาในเด็กและในลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วง และทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัสโรตาในเด็กและในลูกสุกรที่ตรวจพบ เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์และแลกเปลี่ยนท่อนยีนระหว่างไวรัสโรตาของคนและของสุกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน โดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจำนวน 401 ตัวอย่างจากผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการอุจจาระร่วงในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทยในช่วงเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2556 จนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2557 และเก็บตัวอย่างอุจจาระจำนวน 491 ตัวอย่างจากลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงจากฟาร์มต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูนในช่วงเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2554 จนถึงเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2557

นำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดมาทำการตรวจเพื่อคัดกรองหาเชื้อไวรัสโรคากลุ่มเอ โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และนำไวรัสโรคากลุ่มเอที่แยกได้มาจำแนกสายพันธุ์ออกเป็น G และ P จีโนไทป์ต่างๆ ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแต่ละจีโนไทป์หรือจำแนกโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไวรัสโรตาของคนและของสุกรโดยวิธี phylogenetic analysis ซึ่งจากผลการศึกษาสามารถตรวจพบไวรัสโรคากลุ่มเอในเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วงจำนวนทั้งสิ้น 137 ตัวอย่างจากทั้งหมด 401 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 34.2 และพบเชื้อไวรัสโรคากลุ่มเอในลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงจำนวน 113 ตัวอย่างจากทั้งหมด 491 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 23.0 และจากการศึกษาเพื่อจัดจำแนกไวรัสโรตาออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีความหลากหลายของ G-P genotype combinations ทั้งในคนและในสุกรที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ โดยไวรัสโรตาในคน G3P[8] มีความชุกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 49.6 รองลงมาคือ G1P[8] ร้อยละ 23.4, G2P[4] ร้อยละ 13.9, G1P[4] ร้อยละ 4.4, G8P[8] ร้อยละ 2.9, G2P[8] และ G9P[8] แต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 2.2, และพบการติดเชื้อร่วม (mixed-infection) ของ G3 ร่วมกับ P[8] และ P[4] ร้อยละ 0.7 การศึกษาในครั้งนี้พบสิ่งที่น่าสนใจมากคือ สามารถตรวจพบไวรัสโรตาสายพันธุ์ G9P[19] ร้อยละ 0.7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ค่อยตรวจพบในคน สำหรับไวรัสโรตาในลูกสุกรตรวจพบ G4P[13] มีความชุกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 29.2 รองลงมาคือ G4P[23] ร้อยละ 14.1, G5P[23] ร้อยละ 11.5, G4P[6] ร้อยละ 9.7, G3P[23] ร้อยละ 7.0, G5P[13] ร้อยละ 6.1, G3P[13] ร้อยละ 4.4, G3P[6] และ G5P[6] แต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 2.7 นอกจากนี้ยังตรวจพบ G-P genotype combinations ที่มีความชุกน้อยกว่าร้อยละ 2.0 ในแต่ละจีโนไทป์ ได้แก่ G3P[19], G4P[7], G9P[19], G9P[23], G9P[7], G4P[19], และ G11P[13] อย่างไรก็ตามยังพบ G4 และ G11 ที่มี P genotype แบบที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ร้อยละ 0.9 สำหรับไวรัสโรตา G9P[19] ที่แยกได้จากคนเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน VP7 และ VP4 พบว่ามีความเหมือนกันอย่างมากกับไวรัสโรตาที่แยกได้จากลูกสุกรในการศึกษาเดียวกันนี้ นอกจากนี้เมื่อได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์ยีนทั้ง 5 ท่อน คือ VP7, VP4, VP6, NSP4, และ NSP5 พบว่าทั้ง 5 ยีนของไวรัสโรตาสายพันธุ์ G9P[19] ที่แยกได้จากคนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอย่างมากกับไวรัสโรตาของลูกสุกรสายพันธุ์ G9P[19] ที่ตรวจพบในช่วงระยะเวลาเดียวกัน และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง G (VP7) P (VP4) I (VP6) E (NSP4) และ H (NSP5) จีโนไทป์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีรูปแบบเป็น G9-P[19]-I5-E1-H1 เหมือนกันทั้งไวรัสโรตาในคนและลูกสุกรที่แยกได้ จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสโรตาของคนและของสุกรสามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ

โดยสรุป การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสโรตาที่ก่อโรคอุจจาระร่วงในเด็กและในลูกสุกร ในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน และแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการเกิดการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์และมีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างเชื้อไวรัสโรตาของคนและสุกรได้ในธรรมชาติ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Molecular Characterization and Zoonotic Potential Analysis of Rotaviruses Detected in Pediatric Patients and Piglets with Acute Gastroenteritis	
Author	Miss Arpaporn Yodmeeklin	
Degree	Master of Science (Microbiology)	
Advisory Committee	Dr. Pattara Khamrin	Advisor
	Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Co-advisor

ABSTRACT

Rotaviruses are the major cause of severe acute gastroenteritis in infants, young children, and in young animals of many species, especially in pigs. Close contact between humans and pigs may facilitate interspecies transmission and genetic reassortment during co-infection in the same cell and result in the generation of novel progeny virus strains. Moreover, several epidemiological studies revealed the increasing detections of porcine-human group A rotavirus reassortant strains. These findings indicate that interspecies transmission among humans and porcine rotaviruses may have been occurred in nature. The objectives of the present study aimed to assess the prevalence and to perform molecular characterization of human and porcine rotaviruses with diarrhea. After that, the human rotavirus strains detected were analyzed for their genetic relationships with porcine rotaviruses in order to elucidate the possibility of interspecies transmission and reassortment of these viruses circulating in Chiang Mai and Lamphun provinces. A total of 401 stool specimens were collected from children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand during January 2013 through February 2014. In addition, 491 stool samples were collected from diarrheic piglets in several pig farms in Chiang Mai and Lamphun provinces during January 2011 to March 2014. All stool samples were screened for group A rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The detected group A rotaviruses were identified for their G and P genotypes by multiplex PCR method using genotype-specific primers

or nucleotide sequencing. The sequences were analyzed for the genetic relationship between human and porcine rotaviruses by phylogenetic analysis. Group A rotaviruses were detected in 137 out of 401 (34.2%) and 113 out of 491 (23.0%) stool specimens collected from children hospitalized with diarrhea and diarrheic piglets, respectively. The identification of rotavirus genotypes revealed wide variety of G-P genotype combinations. For human rotaviruses, G3P[8] was the most predominant genotype (49.6%), followed by G1P[8] (23.4%), G2P[4] (13.9%), G1P[4] (4.4%), G8P[8] (2.9%), G2P[8] and G9P[8] (each of 2.2%), and mix-infection of G3 in combination with P[8] and P[4] (0.7%). Interestingly, the uncommon strain of human rotavirus G9P[19], was detected in a child with diarrhea in this study. For porcine rotaviruses, G4P[13] was the most prevalent genotype (29.2%), followed by G4P[23] (14.1%), G5P[23] (11.5%), G4P[6] (9.7%), G3P[23] (7.0%), G5P[13] (6.1%), G3P[13] (4.4%), G3P[6] and G5P[6] (each of 2.7%). In addition, the other G-P combinations were detected at less than 2.0% in each of the following G-P combination, including G3P[19], G4P[7], G9P[19], G9P[23], G9P[7], G4P[19], and G11P[13] strains. However, G4 and G11 in combination with P nontypeable strains were also detected at each of 0.9%. The genetic sequence analysis of VP7 and VP4 genes of G9P[19] rotavirus demonstrated that the virus isolated from human was more closely related to the porcine rotavirus than to human rotaviruses detected in the same study. It was interesting to point out that additional full-length nucleotide sequence analysis of VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5 genes of those G9P[19] rotavirus strains revealed high nucleotide sequence identity of those genes between human and porcine rotavirus strains detected in the same study period. The genotype constellation of G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4), and H (NSP5) genotypes by nucleotide sequence analysis of these G9P[19] strains were assigned as the G9-P[19]-I5-E1-H1 genotypes for both human and piglet rotavirus isolates. The finding implies that interspecies transmission among human and porcine rotaviruses could be occurred in nature.

In conclusion, the present study provides valuable epidemiological information and molecular characteristics of rotavirus strains circulating in pediatric patients and in piglets with acute gastroenteritis in Chiang Mai and Lamphun provinces. In addition,

the evidence of interspecies transmission and reassortment events between rotaviruses of human and pig origins were occurred in nature.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved