

Thesis Title Genotypic Distribution and Molecular Characterization of Porcine Rotaviruses in Piglets with Diarrhea

Author Miss Wilaiporn Saikhreang

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Niwat Maneekarn Advisor
Dr. Pattara Khamrin Co-advisor

ABSTRACT

Rotavirus is the main cause of acute viral gastroenteritis in infants, children and in young animals worldwide. Several epidemiological studies revealed the detection of several rotavirus strains with unusual combinations genetic background of human and porcine rotaviruses in nature. This observation supports the hypothesis of interspecies transmission of rotaviruses between humans and pigs. The aims of the present study were to investigate the genotypes and molecular genetic characterization of rotaviruses circulating in diarrheic piglets in several pig farms in Chiang Mai and Lamphun provinces, Thailand. The rotavirus strains detected were analyzed for their genetic relationships with human rotaviruses. A total of 207 stool samples were collected from diarrheic piglets and 56 from non-diarrheic healthy piglets between January 2009 to August 2010. All specimens were screened for the presence of group A, B, and C rotaviruses by reverse transcription (RT) and multiplex PCR methods

using group specific primers. Group A rotaviruses were detected in 41 out of 207 (19.8%) fecal specimens collected from diarrheic piglets, while group B and C rotaviruses were not detected. It was of note that no rotavirus was detected in healthy piglets control group. The rotaviruses detected were characterized further for their G genotypes, P genotypes, VP6 genogroups, and NSP4 genetic groups by multiplex PCR using type-specific primers. The rotavirus isolates of which their G genotype, P genotype, VP6 genogroup, and NSP4 genetic group could not be identified by multiplex PCR method, so called nontypeable strains, were subjected further to nucleotide sequencing in order to identify their genotypes, genogroups, and genetic groups. From this typing strategy, wide variety of different G and P genotype combinations were detected. The G4P[6] was identified as the most prevalent genotype (39.0%), followed by G4P[23] (12.2%), G3P[23] (7.3%), G4P[19] (7.3%), G3P[6] (4.9%), G3P[13] (4.9%), G3P[19] (4.9%), G9P[13] (4.9%), G9P[19] (4.9%), and G5P[6], G5P[13], each of 2.4%. Furthermore, G5 and G9 in combinations with P nontypeable strains were also found at each of 2.4%. In addition, analysis of VP6 genogroup revealed that 78.0% of porcine rotaviruses belonged to VP6 genogroup II (GII) and 22% belonged to VP6 genogroup I (GI). Regarding NSP4 genetic group, most of rotaviruses belonged to NSP4 genetic group Wa (B) at 95.1% and the remaining 4.9% were unidentifiable NSP4 genetic group. In addition, analysis of their genotypic linkages of G (VP7), P (VP4), I (VP6), and E (NSP4) genotypes by nucleotide sequence analysis demonstrated that rotaviruses circulating in Chiang Mai and Lamphun provinces, Thailand exhibited 2 major genotypic linkage patterns. The I1 and E1 genotypes showed restricted combination pattern with only G4P[6] genotype while, the I5 and E1 genotypes were found in combinations with various G-

P genotypes, including G3P[19], G3P[23], G4P[6], G4P[23], G5P[13], G9P[13], and G9P[19].

It was interesting to point out that several porcine rotavirus strains isolated from diarrheic piglets in the present study carried the VP7 (G9) of G9P[13] and G9P[19] and VP4 genes (P[19]) of G3P[19], G4P[19], and G9P[19] strains similar to those of human rotaviruses. Most interestingly, to best of our knowledge, a novel combination of G4 with P[19] was reported here for the first time in the world. The data implied that these porcine rotaviruses were probably generated in nature from the reassortment between the viruses of human and porcine origins.

In conclusion, this study provided valuable epidemiological information and molecular characteristics of porcine rotaviruses currently circulating in piglets with diarrhea in Chiang Mai and Lamphun provinces, Thailand.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การกระจายตัวของจีโนไทป์และการหาลักษณะเฉพาะ
ในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรตาที่แยกได้จากลูกสุกร
ที่มีอาการอุจจาระร่วง

ผู้เขียน

นางสาว วิลัยพร สายเครื่อง

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. นิวัฒน์ มณีกาญจน์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. ภัทรา คำรินทร์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไวรัสโรตา (rotavirus) เป็นเชื้อไวรัสที่พบเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันในเด็กทารกและเด็กเล็ก และยังก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในลูกสัตว์หลายชนิดทั่วโลก จากการศึกษาทางระบาดวิทยาได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่มีสารพันธุกรรมที่เป็นแบบลูกผสมระหว่างไวรัสโรตาของคนและของสุกรเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นหลักฐานสนับสนุนการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสโรตาของคนและของสุกร ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการกระจายตัวและศึกษาคุณลักษณะเฉพาะในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรตาในลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงในฟาร์มต่างๆในเขตจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับไวรัสโรตาที่แยกได้จากคนในช่วงระยะเวลาเดียวกัน โดยนำตัวอย่างอุจจาระจากลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วง จำนวนทั้งหมด 207 ตัวอย่างและตัวอย่างอุจจาระจากลูกสุกรที่ไม่มีอาการอุจจาระร่วง จำนวนทั้งหมด 56 ตัวอย่าง ที่เก็บในช่วงเดือนมกราคมปี พ.ศ. 2552 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2553 มาตรวจคัดกรองหาเชื้อไวรัสโรตา กลุ่ม A B และ C โดยวิธี reverse transcription (RT) และ multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ การศึกษาในครั้งนี้ตรวจพบไวรัสโรตากลุ่ม A จำนวน 41 ตัวอย่าง จากลูกสุกรที่มีอาการอุจจาระร่วงทั้งหมด 207

ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 19.8 โดยตรวจไม่พบไวรัสโรตาในกลุ่ม B และ C ส่วนการตรวจหาเชื้อไวรัสโรตาในลูกสุกรที่สุขภาพดีไม่มีอาการอุจจาระร่วงก็ไม่พบเชื้อไวรัสโรตาเลย สำหรับเชื้อไวรัสโรตาที่ตรวจพบในตัวอย่างตรวจในครั้งนี้ได้ทำการจัดจำแนกคุณลักษณะของเชื้อไวรัสโรตาออกเป็น G genotype, P genotype, VP6 genogroup, และ NSP4 genetic group ต่อไป โดยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ G genotype, P genotype, VP6 genogroup, และ NSP4 genetic group ต่างๆ ส่วนไวรัสที่ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดของ G genotype, P genotype, VP6 genogroup, และ NSP4 genetic group ได้โดยวิธี multiplex PCR จะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้นเพื่อบอก genotype, genogroup, และ genetic group ต่อไป ผลการศึกษาพบ G-P genotype combinations ที่มีความหลากหลายโดยส่วนใหญ่เป็น G4P[6] ร้อยละ 39.0 รองลงมาคือ G4P[23] ร้อยละ 12.2 G3P[23] และ G4P[19] แต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 7.3 G3P[6] G3P[13] G3P[19] G9P[13] G9P[19] แต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 4.9 และ G5P[6] G5P[13] แต่ละสายพันธุ์พบร้อยละ 2.4 และพบ G5 และ G9 ที่มี P genotype เป็นแบบที่บอกชนิดไม่ได้ ในแต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 2.4 นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ VP6 genogroup พบเชื้อที่มี VP6 genogroup II (GII) ร้อยละ 78 และเชื้อที่มี VP6 genogroup I (GI) ร้อยละ 22 และจากการศึกษา NSP4 genetic group พบว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็น NSP4 genetic group Wa (B) ร้อยละ 95.1 และที่เหลืออีกร้อยละ 4.9 เป็นเชื้อที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง G (VP7) P (VP4) I (VP6) และ E (NSP4) จีโนไทป์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบรูปแบบการกระจายตัวไวรัสโรตาที่อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูนแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ I1 กับ E1 genotype จะอยู่ร่วมกับสายพันธุ์ G4P[6] และอีกรูปแบบหนึ่งคือ I5 และ E1 genotype ที่อยู่ร่วมกับสายพันธุ์ที่หลากหลายได้แก่ G3P[19] G3P[23] G4P[6] G4P[23] G5P[13] G9P[13] และ G9P[19]

สิ่งที่น่าสนใจมากที่สุดที่ต้องยกมากล่าวถึงจากการศึกษาในครั้งนี้ก็คือการค้นพบไวรัสสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างไวรัสของคนและไวรัสของสุกร โดยไวรัสสายพันธุ์ที่มียีน VP7 เหมือนไวรัสของคนได้แก่ G9P[13] และ G9P[19] และไวรัสสายพันธุ์ที่มียีน VP4 เหมือนกับไวรัสของคนได้แก่ G3P[19] G4P[19] และ G9P[19] สิ่งที่น่าสนใจมากที่สุดอีกอย่างหนึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ก็คือการค้นพบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มี G4 ร่วมกับ P[19] เป็นครั้งแรกในโลกที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

จากข้อมูลการค้นพบเชื้อเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าได้เกิดการแลกเปลี่ยนท่อนยีนของไวรัสของคนและ
ไวรัสของสุกรขึ้นในธรรมชาติ

โดยสรุป การศึกษาในครั้งนี้ได้รับข้อมูลที่มีคุณค่าเกี่ยวกับระบาดวิทยาและลักษณะใน
ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรตาที่มีการระบาดและทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในลูกสุกรในจังหวัด
เชียงใหม่และจังหวัดลำพูนในประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved