Thesis Title Molecular Characterization of VP4, VP7, and NSP4 Genes of Nontypeable Rotavirus Strains Isolated from Porcines in Chiang Mai

Author Mr. Wisoot Chan-it

Degree Master of Science (Microbiology)

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

ABSTRACT

Epidemiological survey of rotaviruses in porcines during the year 2000-2003 in Chiang Mai found that some of porcine rotavirus strains were nontypeable, i.e., their G- and/or P-genotypes could not be identified by using multiple sets of G-and P-type-specific primers. The main aim of the present study was to characterize the G- and P-genotypes of those nontypeable strains by nucleotide sequence analysis. The VP7 and/or VP4 genes of nontypeable strains were sequenced and their G- and P-genotypes were assigned based on the relative nucleotide and deduced amino acid sequence identities with those of the reference strains available in the GenBank database. Of these 24 nontypeable strains, 16 were G-nontypeable, 6 were P-nontypeable, and 2 were both G- and P-nontypeable.

Among 18 strains of G-nontypeable, as determined by sequence analysis, 13 turned out to be G4, 4 were G5, and 1 was G2, respectively. As expected, the VP7 nucleotide sequences of these G-nontypeable strains revealed several point mutations at the primer binding site. In order to solve this problem, the degenerate primers, SG4d (for G4) and SG5d (for G5), were newly designed based on the variations of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

nucleotides at the primer binding sites of G4 and G5 nontypeable strains detected in this study. These newly designed degenerate primers were used successfully for genotyping of the corresponding G4 and G5 nontypeable strains.

It was noteworthy to point out the prominent discovery of new P-genotypes in the present study that analyses of VP4 nucleotide and deduced amino acid sequences of 8 P-nontypeable strains revealed two distinct groups of P genotypes. One represented by P34/00 strain and the other represented by P15/02 strain. Both of them shared a relatively low sequence identity with those of the existing 25 P genotypes previously reported. The strain P34/00 shared only 42% to 67% of VP4 nucleotide and 33% to 66% of deduced amino acid sequence identities with those of 25 P genotype reference strains. Similarly, P15/02 was also displayed a low VP4 nucleotide and deduced amino acid sequence identities with those of the known 25 P genotypes, ranging from 50% to 78% and 34% to 79%, respectively. In addition, when comparing the VP4 sequence of P34/00 with that of P15/02, they shared only 62% nucleotide and 53% amino acid sequence identities. Based on the low sequence identities between the strain P34/00 and P15/02 and with those of the known 25 P genotypes indicate that each of them was a distinct new P genotype. Therefore, the P34/00 strain was tentatively proposed as a novel P[26] genotype and P15/02 (the representative of 7 P-nontypeable strains) was tentatively proposed as a novel P[27] genotype.

When considering the G-P combination, the novel P[26] was combined with G2, while the novel P[27] was combined with G3 and G5, respectively. In addition, the common porcine rotavirus strains such as G4P[6], G4P[13], G5P[6], and G5P[7] were also detected in this study.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณลักษณะในระดับโมเลกุลของจีน VP4 VP7 และ NSP4 ของเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกจีโนไทป์ ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากสุกรในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน นายวิสูตร จันทร์อิฐ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์ ประธานกรรมการ
รศ. สุพัตรา พีราคม กรรมการ

บทคัดย่อ

การสำรวจการระบาดของเชื้อไวรัสโรตาในสุกรในช่วงปี พ.ศ. 2543 ถึงปี พ.ศ. 2546 ในจังหวัดเชียงใหม่พบว่า ไวรัสโรตาบางตัวอย่างไม่สามารถจำแนกชนิดของ G-genotype P-genotype หรือทั้ง G- และ P-genotypes ได้โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ G-genotype และ P-genotype หลายชุดที่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นเป้าหมายหลักของการศึกษานี้คือการตรวจจำแนกชนิดของ G-genotype และ P-genotype โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเหล่านั้น โดยตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำไปศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน VP7 และ VP4 และชนิดของ G-genotype และ P-genotype จะถูกกำหนดโดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิงที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างเชื้อไวรัสโรตาทั้งหมดที่นำมาศึกษาจำนวน 24 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ G-genotype จำนวน 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ P-genotype จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ ทั้ง G- และ P-genotypes จำนวน 2 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ G-genotype รวมทั้งหมดเป็น 18 ตัวอย่างนั้น เมื่อตรวจโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน VP7 แล้วพบว่า 13 ตัวอย่างเป็นชนิด G4 4 ตัวอย่างเป็นชนิด G5 และ 1 ตัวอย่างเป็นชนิด G2 ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน VP7 ของเชื้อไวรัสโรตาทั้งหมดนี้พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

point mutation เกิดขึ้นหลายตำแหน่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณตำแหน่งที่ primer มาจับ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหานี้ จึงได้ทำการออกแบบ primers ขึ้นใหม่ ซึ่งเป็น degenerate primers ซึ่งจำเพาะกับ G4 เรียกชื่อว่า SG4d และที่จำเพาะกับ G5 เรียกชื่อว่า SG5d โดยการออกแบบ primers ใหม่นี้เป็นไปตามการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ primer มาจับของเชื้อไวรัสโรตา G4 และ G5 ตามลำดับ Degenerate primers ที่สร้างขึ้นมาใหม่นี้ได้นำกลับไปทดสอบโดยการทำ genotyping ของเชื้อ G4 และ G5 พบว่าสามารถใช้งานได้เป็นอย่างดีในการตรวจหา G-genotype ของเชื้อ G4 และ G5 ซึ่งแต่เดิมเป็นเชื้อที่ไม่สามารถตรวจหา genotype ได้โดยใช้ primers ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้

การค้นพบที่สำคัญมากจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ต้องกล่าวถึงเป็นพิเศษคือ การค้นพบ P-genotypes ใหม่ โดยจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของจีน VP4 ของเชื้อไวรัสโรตาทั้ง 8 ตัวอย่างซึ่งแต่เดิมเป็นเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของ P-genotype ได้ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกมีสายพันธุ์ (strain) P34/00 เป็นตัวแทน และอีกกลุ่มหนึ่งมีสายพันธุ์ P15/02 เป็นตัวแทน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน VP4 ของทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างไปจากเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการอ้างอิงที่มีรายงานอยู่ก่อนแล้วทั้ง 25 P genotypes โดยพบว่าสายพันธุ์ P34/00 มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชื้อมาตรฐานทั้ง 25 P genotypes เพียง 42%-67% และ 33%-66% ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน สายพันธุ์ P15/02 ก็มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างไปจากเชื้อมาตรฐานทั้ง 25 P genotypes เช่นเดียวกัน โดยพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชื้อมาตรฐานเพียง 50%-78% และ 34%-79% ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของจีน VP4 ของสายพันธุ์ P34/00 กับสายพันธุ์ P15/02 พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ก็แตกต่างกัน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันเพียง 62% และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันเพียง 53% เท่านั้น การที่เชื้อสายพันธุ์ P34/00 และ P15/02 มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ต่ำมาก เมื่อเทียบระหว่างสองสายพันธุ์ และเมื่อเทียบกับเชื้อมาตรฐานสำหรับการอ้างอิงทั้ง 25 P genotypes แสดงว่า P34/00 และ P15/02 แต่ละสายพันธุ์น่าจะเป็น P-genotypes ใหม่ และต่างไปจากสายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาแล้ว ดังนั้น ผลจากการศึกษานี้จึงขอเสนอให้สายพันธุ์ P34/00 เป็น novel P[26] genotype และเสนอให้สายพันธุ์ P15/02 (ตัวแทนของ 7 สายพันธุ์) เป็น novel P[27] genotype

เมื่อพิจารณาถึงการรวมกันของ G-genotype และ P-genotype พบว่า novel P[26] ถูกรวมอยู่กับ G2 ในขณะที่ novel P[27] ถูกรวมอยู่กับ G3 และ G5 ตามลำดับ นอกจากนั้น เชื้อไวรัสโรตาที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พบได้บ่อยในสุกร เช่น G4P[6] G4P[13] G5P[6] และ G5P[7] ก็ถูกตรวจพบเช่นกันในการศึกษาครั้งนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved