

Serotype Relationships of Rotaviruses Causing Diarrhea in Patients and Mammals

Teewasit Phatsaman^{1*}, Phakapun Singchai¹, Santip Kongjorn¹,
Tipsuda Luechakham¹, Karun Sutthivarakom¹,
Napa Onvimala¹, Wandee Thiangtum², Boonnipa Songkham³,
Walailak Kaewwongsa⁴, Noppamas Wuttha⁵,
Ratigorn Guntapong¹, Ratana Tacharoenmuang¹ and Archawin Rojanawiwat⁶

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health,
Nonthaburi Province, Thailand.

²Department of Large Animal and Wildlife Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,
Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom Province, Thailand.

³Regional Medical Sciences 8th, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health,
Udon Thani Province, Thailand.

⁴Faculty of Biotechnology, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani Province, Thailand.

⁵Department of Medical Technology, Nong Han Hospital, Udon Thani Province, Thailand.

⁶Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences,
Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand.

Abstract

Group A rotavirus (RVA) is the major pathogen causing acute gastroenteritis, and new strain of RVA could be generated by reassortment between rotavirus genes among RVA strains. Vaccination could not be effective to prevent the disease if mutant RVA carries mutational point(s) at binding site(s) of vaccine. The aim of this study was to determine the serotype relationships of RVA from patients and mammals by nucleotide sequences analysis using Sanger sequencing. A total of 350 stool samples were collected from Nakhon Pathom, Ratchaburi, and Udon Thani, during September 2022 and May 2023. We found that 83 samples showed positive results by reverse transcription PCR and 56 samples (67.47%, from 83 detectable samples) could be classified as the VP7 (G-serotype) and VP4 (P-serotype) of RVA. Results of phylogenetic analysis showed that G3 was major VP7 (41.07%), followed by G9 (33.93%). The major VP4 was P[8] (51.79%), followed by P[13] (33.93%). The predominant RVA was G3P[8], followed by G8P[8].

*Corresponding author E-mail address: teewasit.p@dmshc.mail.go.th

Received: 14 January 2025

Revised: 3 April 2025

Accepted: 4 April 2025

Interestingly, we found that the VP7 gene of G9 were closely related to porcine-like human RVA. The VP7 gene of G5 and G1 human RVA were also closely related to those of porcine RVA. The VP7 gene of G6 genotype from cattle was closely related to porcine and/or porcine-like human RVA. Analysis of neutralization epitopes using amino acid sequences revealed that the G10P[11] strain in cattle and the G5P[8] strain in patients carried the amino acid change at 33 and 10 positions, respectively. The polar amino acid changes were 19 and 6 positions, respectively, in comparison to vaccine strains. These RVA isolates might be generated by reassortment between human and animal RVAs. These variations in antigenic sites might lead to escape from the RVA neutralizing-antibody in rotavirus vaccines. Therefore, continuous monitoring of RVA serotypes and RVA reassortment is necessary to provide relevant data for assessing the impact on the protectiveness of currently available vaccines.

Keywords: Rotaviruses, Diarrhea, Mammals, Zoonosis, Serotype

ความสัมพันธ์ทางซีโรทัยป์ของไวรัสโรทาที่ก่อโรคอุจจาระร่วง ในผู้ป่วยและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ธีรวัชชัย แพทย์สมาน^{1*}, ผกาพรรณ สิงห์ชัย¹, สรรทิพย์ กองจร¹,
ทิพย์สุดา ลือชาคำ¹, กรณ์ย์ สุทธิวราคม¹, นภา อ่อนนิมิต¹, วันดี เทียงธรรม²,
บุญนิภา สงคราม³, วลัยลักษณ์ แก้ววงษา⁴, นพมาศ วุฒา⁵, รติกร กันทะพงศ์¹,
รัตนา ตาเจริญเมือง¹ และ อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์⁶

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

²ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

³ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุตรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดอุตรธานี

⁴คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรธานี จังหวัดอุตรธานี

⁵กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลหนองหาน จังหวัดอุดรธานี

⁶สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

ไวรัสโรทากลุ่ม เอ เป็นสาเหตุหลักของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนและจัดเรียงตัวของชุดยีนทำให้เกิดไวรัสโรทาสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งวัคซีนที่ใช้อาจไม่สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัสโรทาสายพันธุ์ใหม่ได้หากมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจดจำของวัคซีน คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาซีโรทัยป์ของสายพันธุ์ไวรัสโรทาที่พบในผู้ป่วยและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วยวิธี Sanger sequencing เพื่อคาดการณ์ประสิทธิภาพของวัคซีนต่อการป้องกันโรคจากไวรัสโรทา โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2566 ในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และอุตรธานี รวมจำนวน 350 ตัวอย่าง ตรวจหาไวรัสโรทากลุ่ม เอ ด้วยวิธี reverse transcription PCR พบผลบวกจำนวน 83 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน VP7 (G serotype) และ VP4 (P serotype) พบว่า 56 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับไวรัสโรทากลุ่ม เอ คิดเป็นร้อยละ 67.47 เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ VP7 พบ G3 มากที่สุด (ร้อยละ 41.07) รองลงมาคือ G9 (ร้อยละ 33.93) ส่วน VP4 พบ P[8] มากที่สุด (ร้อยละ 51.79) รองลงมาคือ P[13] (ร้อยละ 33.93) สามารถจำแนกเป็นสายพันธุ์ G3P[8] มากที่สุด รองลงมาคือ G8P[8] จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: teewasit.p@dmsc.mail.go.th

รับบทความ: 14 มกราคม 2568

แก้ไขบทความ: 3 เมษายน 2568

รับตีพิมพ์บทความ: 4 เมษายน 2568

G9 ซึ่งพบมากในหมู มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่พบในคน ส่วน G5 และ G1 ที่พบในคน มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่พบในหมู และ G6 ซึ่งพบในวัว มีความใกล้เคียงกับของคนและหมู เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ neutralization epitopes พบว่าสายพันธุ์ G10P[11] ที่พบในวัว และสายพันธุ์ G5P[8] ที่พบในผู้ป่วย มีความแตกต่างกัน 33 และ 10 ตำแหน่ง ตามลำดับ โดยความแตกต่างเป็นการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วที่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์วัวซึ่งพบจำนวน 15 และ 6 ตำแหน่ง ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงนี้อาจส่งผลให้ไวรัสสามารถหลบเลี่ยงแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อของไวรัสโรทาจากวัวได้ ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์และการผสมแลกเปลี่ยนยีนข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสโรทาในคนกับสัตว์ เพื่อช่วยสนับสนุนการวางแผนวัคซีนป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมได้

คำสำคัญ: ไวรัสโรทา โรคอุจจาระร่วง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ซีโรทัยป์

บทนำ

ไวรัสโรตาเป็นสาเหตุหลักของโรคอุจจาระร่วง มีการประมาณไว้ว่าในทุก ๆ ปีจะมีผู้ป่วยอุจจาระร่วงจากเชื้อไวรัสโรตาเสียชีวิตจำนวน 215,000 คน ทั่วโลก ส่วนใหญ่เป็นเด็กที่อายุน้อยกว่า 5 ปี นอกจากก่อโรคในคนแล้วไวรัสโรตายังสามารถก่อโรคอุจจาระร่วงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจ เช่น วัว หมู และม้า สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดเป็น reservoirs ของไวรัสโรตาที่ก่อโรคในคน⁽¹⁻³⁾ โครงสร้างโปรตีนของไวรัสโรตาประกอบด้วยแคปซิด 2 ชั้น (outer และ inner capsid) แคปซิดชั้นนอก ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ VP4 และ VP7 แคปซิดชั้นใน ประกอบด้วย VP6 ส่วน inner core เป็น VP1, VP2 และ VP3⁽⁴⁻⁵⁾ ปัจจุบันไวรัสโรตาแบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม คือ A-G สามารถจำแนกซีโรทัยป์ของไวรัสโรตาตาม VP4 และ VP7 โดยอาศัยโปรตีนส่วนที่มี neutralization antigen คือ VP4 เป็น protease sensitive protein หรือเรียกว่า P protein ซีโรทัยป์ที่ได้จากยีนส่วนนี้เรียกว่า P serotype มีประมาณ 28 ซีโรทัยป์ โดยมี P[4] และ P[8] เป็นซีโรทัยป์หลักในการก่อโรค นอกจากนั้นส่วนของ VP7 เป็นไกลโคโปรตีน หรือเรียกว่า G protein ซีโรทัยป์ที่ได้จากยีนส่วนนี้เรียกว่า G serotype ปัจจุบันนี้พบ G serotype มีประมาณ 14 ซีโรทัยป์ โดยซีโรทัยป์ที่มักพบเป็นสาเหตุของโรคทั่วไป คือ G1-G4 และ G9⁽⁶⁾ แม้ว่าไวรัสโรตาจะมีวัคซีนที่ใช้ป้องกันถึง 2 ชนิด แต่เมื่อนำ G และ P ซีโรทัยป์มารวมกันจะได้เชื้อประมาณ 80 สายพันธุ์ ด้วยคุณสมบัติของไวรัสโรตาจึงทำให้เกิดการผสมข้ามกันในแต่ละซีโรทัยป์ (reassortment) เกิดเป็นสายพันธุ์ใหม่ได้ง่าย⁽⁷⁾ โดยปกติไวรัสโรตาที่ก่อโรคในคนส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] และ G12P[6] ในหมูจะเป็นสายพันธุ์ G2, G3, G4, G5, G9, G11,

P[6], P[7], P[13], P[19] และ P[23] ส่วนที่พบในวัวจะเป็นสายพันธุ์ G6, G8, G10, P[1], P[5], P[11], P[15] และ P[21]⁽²⁾ แต่ปัจจุบันพบไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์กันระหว่างไวรัสโรตาในคนและในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะ วัว หมู และม้า (human-bovine, human-porcine and human-equine rotaviruses) ที่พบในอัตราที่สูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น⁽⁸⁾ ซึ่งหลายประเทศได้รายงานการพบไวรัสโรตาสายพันธุ์ผสมระหว่างคนกับสัตว์ เช่น สายพันธุ์ G3P[9], G4P[6], G6P[10], G9P[19], G9P[23], G10P[6] และ G10P[14]⁽⁹⁻¹⁴⁾ ปัจจุบันมีวัคซีนที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก คือ Rotarix ชนิด monovalent human rotavirus vaccine เตรียมจาก human rotavirus ประกอบด้วยสายพันธุ์ G1P[8]⁽¹⁵⁾ และ RotaTeq ชนิด pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine เตรียมจาก bovine rotavirus ประกอบด้วย G6P[8] มา reassorted กับ human rotavirus ที่ประกอบด้วย G1, G2, G3, G4 และ P[8]⁽¹⁵⁾ ถึงแม้ว่าจะมีวัคซีนในการป้องกันโรคแล้วก็ตาม แต่ไวรัสที่มีการผสมแลกเปลี่ยนข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสโรตาในคนกับสัตว์ ทำให้วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันอาจไม่สามารถป้องกันเชื้อสายพันธุ์ใหม่และอาจก่อความรุนแรงของโรคได้ การศึกษาความสัมพันธ์ทางซีโรทัยป์ของไวรัสโรตาที่ก่อโรคอุจจาระร่วงในคนและในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วยวิธี conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ VP7 และ VP4 ซึ่งเป็น neutralization genes และวิเคราะห์ phylogenetic tree หาความสัมพันธ์ในการผสมแลกเปลี่ยนข้ามสายพันธุ์ระหว่างไวรัสโรตาในคนกับสัตว์ ทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสโรตาที่ก่อโรคอุจจาระร่วง เพื่อหาความสัมพันธ์ทางซีโรทัยป์ของโปรตีนระหว่างสายพันธุ์ไวรัสโรตาที่พบตามฤดูกาลและ

สายพันธุ์วัคซีน จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็น neutralization epitopes ของ VP7 ที่เป็น โกลโคโปรตีน (G protein) ซึ่งมี 3 บริเวณ (7-1a, 7-1b และ 7-2) และ VP4 ที่เป็น protease sensitive protein (P protein) ซึ่งมี 4 บริเวณ (8-1, 8-2, 8-3 และ 8-4)⁽¹⁶⁾ ของสายพันธุ์ไวรัสโรทาที่ศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์วัคซีน ข้อมูลสามารถช่วยสนับสนุน การพิจารณาเลือกใช้ยารักษาโรคหรือวัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรคอย่างเหมาะสมและจำเพาะ นำไปสู่การรักษา โรคหรือพัฒนาวัคซีนให้มีประสิทธิภาพและลดอัตราการเจ็บป่วยจากโรคอุจจาระร่วงในคนและสัตว์เศรษฐกิจ ในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมโครงการ (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงจำนวน 150 ตัวอย่าง ไม่จำกัดเพศ ทั้งกลุ่มที่เคยได้รับและไม่เคยได้รับ วัคซีนโรทา ที่เข้ารับการรักษาที่ โรงพยาบาลหนองหาน จังหวัดอุดรธานี ที่มีอาการอุจจาระร่วงมากกว่า 2 ครั้ง ต่อวัน อายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุไม่เกิน 10 ปี แม้ว่าเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี จะเป็นกลุ่มเสี่ยงของ โรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรทา แต่เนื่องจากรายงานการ เฝ้าระวังโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรทาของประเทศไทย ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาพบไวรัสโรทาในผู้ป่วยที่เป็น เด็กโตช่วงอายุ > 5-10 ปีเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 43 ของกลุ่มผู้ป่วยช่วงอายุดังกล่าว

วัว หมู และม้า ที่ป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วง โดยเป็นตัวอย่างวัว 100 ตัวอย่าง หมู 70 ตัวอย่าง และ ม้า 30 ตัวอย่าง ไม่จำกัดเพศ ในฟาร์มวัว ฟาร์มหมู และฟาร์มม้า ในเขตจังหวัดนครปฐม อุดรธานี และ ราชบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีอัตราการป่วยด้วยโรคอุจจาระ ร่วงสูง มีอาการอุจจาระร่วงมากกว่า 2 ครั้งต่อวัน

อายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุไม่เกิน 3 ปี ซึ่งวัว หมู และม้า อายุช่วงไม่เกิน 3 ปีนี้เป็นกลุ่มเสี่ยงสูงต่อ โรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรทา

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจริยธรรม การวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ วันที่ให้การรับรอง 4 มกราคม 2566 เลขที่โครงการ 12/2564

2. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย วัว หมู และม้า ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2566 จำนวน 350 ตัวอย่าง นำตัวอย่างอุจจาระ หนักประมาณ 0.1 กรัม ผสมกับ PBS (+) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่านานประมาณ 2 นาที จากนั้นปั่นแยก ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน (supernatant) มาสกัด RNA ใช้ชุดสกัดน้ำยาสำเร็จรูป QIAGEN (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Germany)

3. การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสโรทา โดยวิธี Conventional RT-PCR

ขั้น 1st consensus primer pre-mix ทำการ เตรียม consensus primer pre-mix ประกอบด้วย Primer T31F : 5' GGCTTTAAAGAGAG AATTTCCTGCTG 3' (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่ 1-28) และ Primer T32R : 5' GGTCAC ATCATACAATTCTAATCTAAG 3' (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1,039-1,062) สำหรับยีน VP7 (G-serotype)⁽¹⁷⁾ ส่วน Primer VP4F : 5' TGGCTTCGTTTCATTTATAGACA (ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 11-32) และ Primer VP4R :

5' CTAAATGCTTTTGAATCATCCCA (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1,072-1,094) สำหรับยีน VP4 (P-serotype)⁽¹⁸⁾ เตรียมปฏิกิริยาของแต่ละยีนโดยใช้ primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ DEPC-DW ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร ผสมกับ RNA (100 นาโนกรัม) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที

ขั้น 2nd RT-PCR ทำการเตรียม PCR master mix ประกอบด้วย 2X KOD PCR buffer (TOYOBO, Japan) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร 2.0 มิลลิโมลาร์ dNTPs (TOYOBO, Japan) 5 ไมโครลิตร 0.1 M DTT (TOYOBO, Japan) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร Rnase inhibitor (Thermo Fisher, USA) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร Rever Tra Ace RT (TOYOBO Japan) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร KOD FX Neo (TOYOBO, Japan) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ DEPC-DW ปริมาตร 14.2 ไมโครลิตร จากนั้นเปิด master mix ปริมาตร 40.5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดในขั้น 1st consensus primer pre-mix ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 30 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 45 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

หลังจากปฏิกิริยา RT-PCR เสร็จสิ้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาจะถูกนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ ยีน VP7 และ VP4 โดยใช้วิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนอะกาโรสเจล (Vivantis, Malaysia) บันทึกข้อมูลจากการถ่ายภาพเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (Thermo Fisher, USA)

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสโรทา โดยวิธี Direct PCR sequencing

เตรียม PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตามวิธีการของชุดน้ำยา ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนอะกาโรสเจล จากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยนำ PCR product บริสุทธิ์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ reaction mix ทั้งหมด 7 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ประกอบด้วย BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Reaction Mix (Thermo Fisher, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5X Sequencing Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-DW ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้บริสุทธิ์ด้วย BigDye XTerminatorTM (Thermo Fisher, USA) โดยเปิดตัวอย่างทั้งหมด 10 ไมโครลิตร เติมในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม SAMTM Solution ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ BigDye XTerminatorTM Solution ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นปั่นแยกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เปิดส่วนใสมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Genetic analyzer 3500XL, Applied BioSystem; USA)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence analysis)

นำผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสโรทา โดยวิธี Direct PCR sequencing มาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence data) หลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องและตัดลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนหรือมีสัญญาณรบกวนออก เปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank database (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA) (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) จัดเรียงวิเคราะห์ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม MEGA11 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาสายพันธุ์ไวรัสโรทา ด้วยฐานข้อมูล Rota A Genotype Determination หลังจากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) หาความสัมพันธ์และเส้นทางการติดต่อเชื้อจากสัตว์สู่คน (zoonosis pathogens) จากโปรแกรม MEGA11 โดยการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยที่ค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ (phylogram)

6. การวิเคราะห์เอพิโทปแอนติเจนของ G protein และ P protein

ศึกษาความสัมพันธ์ทางซีโรทัยป์ของ G protein (VP7) และ P protein (VP4) ซึ่งเป็น neutralization epitopes โดยนำผลการวิเคราะห์ Sanger sequencing แปลรหัสให้เป็นกรดอะมิโน

ด้วยโปรแกรม Geneious จากนั้นทำ alignment ด้วยโปรแกรม MAFFT เพื่อหาความสัมพันธ์ของโปรตีนระหว่างสายพันธุ์ไวรัสโรทาที่ศึกษาและสายพันธุ์วัคซีน จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนที่เป็น neutralization epitopes ของ VP7 (G-serotype) ซึ่งมี 3 บริเวณ (7-1a, 7-1b และ 7-2) และ VP4 (P-serotype) ซึ่งมี 4 บริเวณ (8-1, 8-2, 8-3 และ 8-4) เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งเอพิโทป ที่ส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ทำให้ไวรัสสามารถหลบเลี่ยงแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อ (neutralizing-antibody)

ผลการศึกษา

1. การตรวจหาไวรัสโรทาโดยวิธี Conventional RT-PCR

ผลการตรวจตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากคน วัว หมู และม้าที่ป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วง จำนวน 350 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และอุดรธานี พบไวรัสโรทา กลุ่ม เอ จำนวน 83 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.71 จากจำนวนตัวอย่างตรวจทั้งหมด พบไวรัสโรทาในคน วัว และ หมู คิดเป็นร้อยละ 25.33, 26.00, และ 27.14 ตามลำดับ แต่ไม่พบในตัวอย่างม้า (ร้อยละ 0) นอกจากนั้นไม่พบไวรัสโรทากลุ่ม บี และ ซี ตามลำดับ (Table 1) โดยที่ขนาดดีเอ็นเอของยีน VP4 และ VP7 มีขนาด 1,094 8 คู่เบส (base pair) และ 1,062 คู่เบส ตามลำดับ (Fig. 1)

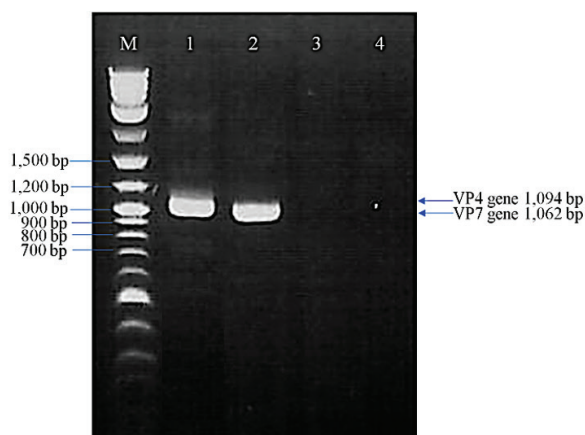


Fig. 1 PCR products of VP4 and VP7 rotavirus. Lanes: M, 100 bp plus ladder marker; Lanes: 1, VP4 rotavirus at 1,094 base pair (bp); Lanes: 2, VP7 rotavirus at 1,062 bp; Lanes: 3, Negative control of VP4; Lanes: 4, Negative control of VP7.

Table 1 Detection of rotavirus by using conventional RT-PCR method.

Source of sample	No. of sample	Negative of rotavirus	Positive of rotavirus group		
			Rotavirus group A	Rotavirus group B	Rotavirus group C
Human	150	112	38 (25.33%)	0	0
Cow	100	74	26 (26.0%)	0	0
Pig	70	51	19 (27.14%)	0	0
Horse	30	30	0 (0%)	0	0
Total	350	267	83 (23.71%)	0	0

2. การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสไวรัสโรตาโดยวิธี Sanger sequencing

เมื่อนำไวรัสโรตาที่พบผลบวกจำนวน 83 ตัวอย่าง ด้วยวิธี conventional RT-PCR มาตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส่วน VP7 และ VP4 ด้วยวิธี Sanger sequencing สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองยีนของไวรัสโรตาจำนวน 56 ตัวอย่าง อีก 27 ตัวอย่าง ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยมาก เมื่อวัดความเข้มข้น

RNA พบว่า ได้น้อยกว่า 0.05 นาโนกรัม โดยตัวอย่างทั้ง 56 ตัวอย่าง สามารถจำแนกเป็น G-serotype โดยพบ G3 สูงสุด (ร้อยละ 41.07) รองลงมาคือ G9 (ร้อยละ 33.93) และพบ G6, G10, G8, G1 และ G5 ตามลำดับ ส่วน P-serotype พบ P[8] สูงสุด (ร้อยละ 51.79) รองลงมาคือ P[13] (ร้อยละ 33.93) และ P[11] (ร้อยละ 14.29) ตัวอย่างที่พบในผู้ป่วยจำนวน 29 ตัวอย่าง จำแนกเป็นสายพันธุ์ G3P[8] G8P[8] G1P[8] และ

G5P[8] ตามลำดับ ตัวอย่างในหมูจำนวน 19 ตัวอย่าง จำแนกเป็นสายพันธุ์ G9P[13] และตัวอย่างที่พบในวัวจำนวน 8 ตัวอย่าง จำแนกเป็นสายพันธุ์ G6P[11] และ G10P[11] ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

3. การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ยีน VP7 (G-serotype) และ VP4 (P-serotype) ของไวรัสโรค

ผลการวิเคราะห์หาไวรัสโรคจาก phylogenetic tree ของ VP7 สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 7 ชนิด พบว่า G9 ซึ่งเป็น Porcine cluster จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับของคนที่เป็นยีนมาตรฐานสำหรับอ้างอิง (Human B3458 BEL G9P[8]) ในส่วน G1, G3 และ G5 ซึ่งเป็น Human cluster พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับของหมูที่เป็นยีนมาตรฐานสำหรับอ้างอิง (Porcine

OSU USA G5P[7] และ P21-5 SVN G1P[27]) นอกจากนั้นส่วน G6 ซึ่งเป็น Bovine cluster พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับของคนและหมูที่เป็นยีนมาตรฐานสำหรับอ้างอิง (Human B1711 BEL G6P[6] และ Porcine HP140 IND G6P[13]) (Fig. 2) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงหลักฐานที่ช่วยสนับสนุนว่าอาจมีไวรัสสายพันธุ์ดั้งเดิมเดียวกันระหว่างคนและสัตว์เกิดเป็นสายพันธุ์ผสมระหว่าง host ต่างสปีชีส์กัน ส่วน VP4 สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 3 ชนิด พบ P[8] สูงสุด รองลงมาคือ P[13] และ P[11] พบว่าทั้ง 3 ชนิด ให้ผลตรงกับ cluster ที่เกิดขึ้น คือ P[8] ซึ่งเป็น Human cluster จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับของคน ส่วน P[13] ซึ่งเป็น Porcine cluster จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับของหมู และ P[11] ซึ่งเป็น Bovine cluster พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับของวัว (Fig. 3)

Table 2 Result of VP7 and VP4 by using Sanger sequencing.

Source of sample	G-serotype (VP7)	P-serotype (VP4)			G/P types	Total
		P[8]	P[11]	P[13]		
Human	G1	2	0	0	G1P[8]	2
	G3	23	0	0	G3P[8]	23
	G5	1	0	0	G5P[8]	1
	G8	3	0	0	G8P[8]	3
Cow	G6	0	5	0	G6P[11]	5
	G10	0	3	0	G10P[11]	3
Pig	G9	0	0	19	G9P[13]	19
Total		29	8	19		56

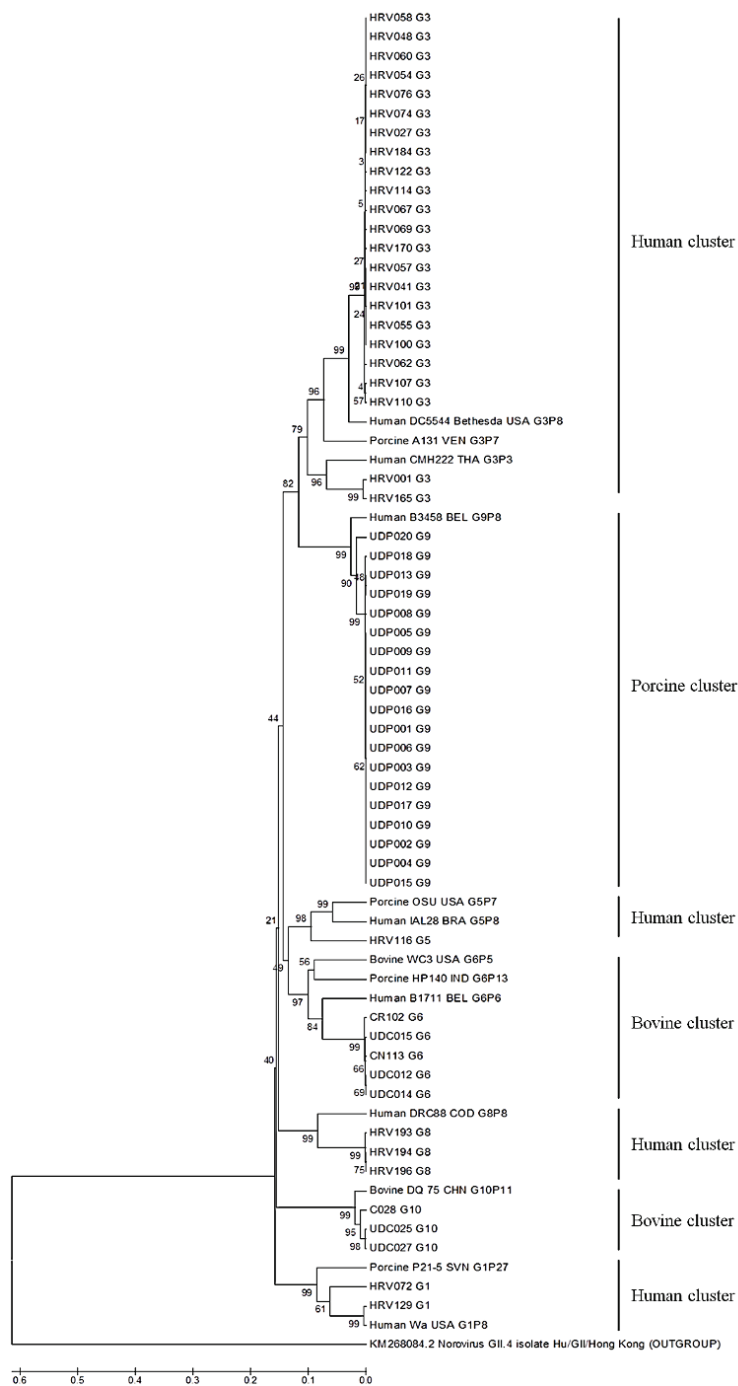


Fig. 2 Phylogenetic analysis of VP7 gene segment of G-serotype rotavirus strains.

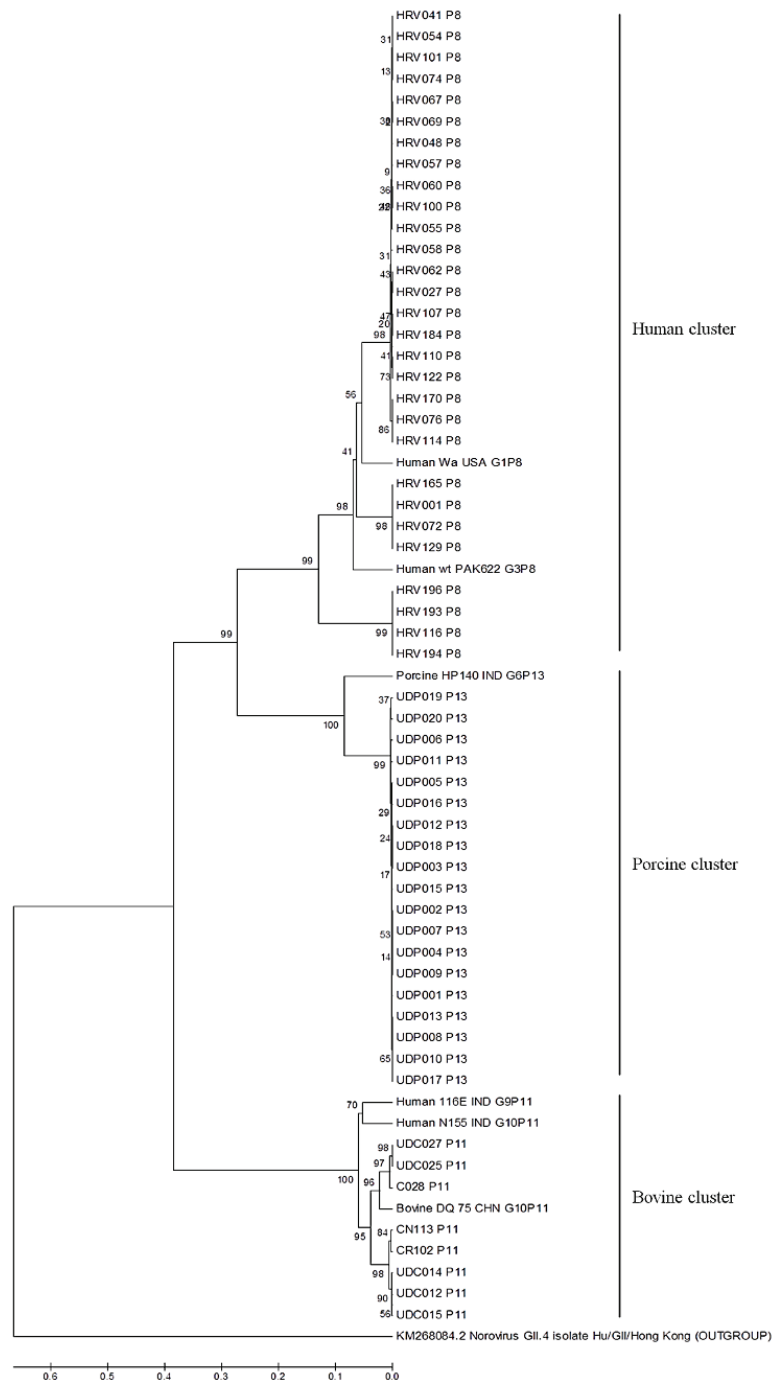


Fig. 3 Phylogenetic analysis of VP4 gene segment of P-serotype rotavirus strains.

4. การวิเคราะห์เอพิโทปแอนติเจนของ G protein และ P protein

การวิเคราะห์ไวรัสโรทาสายพันธุ์ G10P[11] ในวัว และสายพันธุ์ G5P[8] ในผู้ป่วย พบความแตกต่างของกรดอะมิโนมากที่สุด โดย G-serotype มีความแตกต่างของ G10 ที่พบในตัวอย่างวัวเมื่อเทียบกับสายพันธุ์วัคซีน Rotarix (G1P[8]) และ RotaTeq (G1, G2, G3, G4, G6P[8]) ซึ่งมีความเหมือนของกรดอะมิโนร้อยละ 75.00, 74.38, 70.00, 77.19, 69.30 และ 76.88 ตามลำดับ ส่วน P-genotype ที่เป็น P[11] มีความเหมือนของกรดอะมิโนร้อยละ 57.27 และ 57.01 ตามลำดับ รองลงมาพบความแตกต่างของ G5 และ P[8] ที่พบในตัวอย่างผู้ป่วย แต่เมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็น neutralization epitopes แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ G10P[11] ที่พบในวัวซึ่งมีความแตกต่างของกรดอะมิโนมากที่สุดถึง 33 ตำแหน่ง โดยความแตกต่างเป็นการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วที่แตกต่างจากสายพันธุ์วัคซีน 19 ตำแหน่ง ในส่วนของ G-serotype ประกอบด้วยบริเวณ epitope 7-1a ได้แก่ K/E99T บริเวณ epitope 7-1b ได้แก่ N/D211G, D(N/S/A)213F และ T(S/D/A) 242R บริเวณ epitope 7-2 ได้แก่ D/A145N (Table 3) ส่วน P-serotype คือ บริเวณ epitope 8-1 ได้แก่ D100T, E150S, S188V, L193N, N/D195V และ I196P บริเวณ epitope 8-2 ได้แก่ T180A

และ A183Q บริเวณ epitope 8-3 ได้แก่ N113A, V115T, D116N, S/R131D และ D133S บริเวณ epitope 8-4 ได้แก่ N89D (Table 4) รองลงมาพบสายพันธุ์ G5P[8] ในผู้ป่วยมีความแตกต่างของกรดอะมิโน 10 ตำแหน่ง เป็นการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วจากสายพันธุ์วัคซีน 6 ตำแหน่ง ในส่วน G-serotype ประกอบด้วยบริเวณ epitope 7-1a ได้แก่ E97K, K99T และ D100E (Table 3) ส่วน P-serotype คือ บริเวณ epitope 8-1 ได้แก่ S146G และ N195G บริเวณ epitope 8-3 ได้แก่ N113D (Table 4) ส่วนสายพันธุ์ G9P[13] ในหมู พบว่าในส่วน G-serotype ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วจากสายพันธุ์วัคซีน แต่กลับพบว่าในส่วน P-serotype มีการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วจากสายพันธุ์วัคซีน 14 ตำแหน่งประกอบด้วยบริเวณ epitope 8-1 ได้แก่ S146R, S188E, T190G, N192E, L193T และ I196Y บริเวณ epitope 8-2 ได้แก่ T180D และ A183N บริเวณ epitope 8-3 ได้แก่ V115E, D116T, S/R131E และ D133V บริเวณ epitope 8-4 ได้แก่ T88D และ N89E (Table 4) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งเอพิโทปเหล่านี้อาจส่งผลให้ไวรัสสามารถหลบเลี่ยงแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อของไวรัสโรทาที่เกิดจากวัคซีน

Table 3 Differences in amino acid composition of neutralization epitopes between the study VP7 strains and the VP7 components of the rotavirus vaccine strains.

Rotavirus	Neutralization epitopes																			
	Epitope 7-1a										Epitope 7-1b									
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242
Vaccine strains	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T
	T	T	N	G	D	W	K	D	Q	D	T	M	N	K	Q	N	V	D	N	T
	A	N	S	D	E	W	E	N	Q	D	T	M	N	K	Q	D	V	S	N	S
	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	N	K	D
	S	T	S	T	E	W	K	D	Q	N	L	I	D	K	Q	D	T	A	D	T
Study strains	V	N	A	T	E	W	K	D	Q	D	A	V	E	K	Q	N	P	D	N	A
	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T
	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T
	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	T	D	A
	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	T	N	N	N
	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	T	N	N	N
	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	T	D	A
	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	T	D	A
	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	T	N	N	N
	N	T	A	N	K	W	T	E	Q	D	A	I	E	R	Q	D	I	N	D	S
Study strains	I	N	A	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	Q	N	P	D	D	T
	I	N	A	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	Q	N	P	D	D	T
	V	N	A	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	Q	N	P	D	D	T
	V	N	A	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	Q	N	P	D	D	T
	T	T	A	S	S	W	K	D	Q	D	S	I	N	K	Q	D	T	N	T	T
	T	T	A	S	S	W	K	D	Q	D	S	I	N	K	Q	D	T	N	T	T
	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N
	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N
	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N
	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N
	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	N	T	A	D	N
	T	T	N	N	E	W	T	S	Q	D	A	V	D	K	Q	G	T	F	T	R
	T	T	N	N	E	W	T	S	Q	D	A	V	D	K	Q	N	T	G	D	A
	T	T	N	N	E	W	T	S	Q	D	A	V	D	K	Q	N	T	G	D	A
	T	T	N	N	E	W	T	S	Q	D	A	V	D	K	Q	N	T	G	D	A

Alignment of epitope residues in VP7 between the study G strains and the strains present in Rotarix[®] and RotaTeq[™]. The three VP7 epitopes (7-1a, 7-1b, and 7-2) are shown. Amino acids that showed variations between the vaccine strains and the study strains are highlighted in a yellow color for better visualization, as they involved altering either the charge or the polarity of the amino acid. The rest of the amino acid differences were considered non-changes, as they were in the same group of the charge or the polarity of the amino acid (highlighted in a blue and green color).

Table 4 Differences in amino acid composition of neutralization epitopes between the study VP4 strains and the VP4 component of the rotavirus vaccine strains.

Vaccine strains	Neutralization epitopes																			
	Epitope 8-1										Epitope 8-2									
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132
RVA/Vaccine/USA/RotariixA41CB052A/1988/G1P[8]	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	T	A	N	P	V	D	S	S	D
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-W179-4/1992/G6P[8]	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	D	I	T	A	D	P	V	D	N	N	D
HRV072_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV129_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV001_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV027_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV041_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	D
HRV054_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	D
HRV058_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	D
HRV107_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	D
HRV110_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	D
HRV165_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV170_P[8]	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	D
HRV116_P[8]	D	G	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV193_P[8]	D	G	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
HRV194_P[8]	D	G	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	D
C028_P[11]	T	S	T	S	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	T	D	S
CR102_P[11]	T	S	T	S	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	T	D	S
CNT13_P[11]	T	S	T	A	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	T	D	S
UDC014_P[11]	T	S	T	A	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	M	D	S
UDC015_P[11]	T	S	T	A	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	M	D	S
UDC025_P[11]	T	S	T	A	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	M	D	S
UDC027_P[11]	T	S	T	A	V	T	S	N	P	V	P	A	Q	A	Q	T	N	T	D	S
UDP001_P[13]	D	R	Q	D	E	G	E	T	N	N	Y	D	N	P	Q	E	T	Q	E	N
UDP009_P[13]	D	R	Q	D	E	G	E	T	N	N	Y	D	N	P	Q	E	T	Q	E	N
UDP015_P[13]	D	R	Q	D	E	G	E	T	N	N	Y	D	N	P	Q	E	T	Q	E	N
UDP020_P[13]	D	R	Q	D	E	G	E	T	N	N	Y	D	N	P	Q	E	T	Q	E	N

Alignment of antigenic residues in VP4 between the study P strains and the strains present in Rotarix® and RotaTeq™. The antigenic residues are categorized into four epitopes (8-1, 8-2, 8-3 and 8-4). Amino acids that showed variations between the vaccine strains and the study strains are highlighted in a yellow color for better visualization, as they involved altering either the charge or the polarity of the amino acid. The rest of the amino acid differences were considered non-changes, as they were in the same group of the charge or the polarity of the amino acid (highlighted in a blue and green color).

วิจารณ์

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรทาจากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากคน วัว หมู และม้าที่ป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วง จำนวน 350 ตัวอย่าง พบผลบวกจำนวน 83 ตัวอย่าง ด้วยวิธี conventional RT-PCR แต่เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของทั้งยีนส่วน VP7 และ VP4 ด้วยวิธี Sanger sequencing พบผลบวกต่อยีนทั้งสองของไวรัสโรทาจำนวน 56 ตัวอย่างเท่านั้น การพบ false negative จากปฏิกิริยา RT-PCR อาจเป็นผลมาจากการสกัด RNA ออกมาจากอุจจาระโดยบางตัวอย่างอาจสกัดได้ความเข้มข้นของ RNA น้อยเมื่อวัดความเข้มข้น RNA พบว่าได้น้อยกว่า 0.05 นาโนกรัม ทำให้การขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR มีระดับต่ำเกินกว่าความไวของสีที่ใช้ย้อม DNA (ethidium bromide) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเมื่อศึกษาคุณสมบัติของสีที่ใช้ย้อมพบว่าไม่มีข้อจำกัดในการตรวจ DNA อยู่ที่ 0.5-5.0 นาโนกรัม (Thermo Fisher, USA)

การวิเคราะห์หา G-serotype พบ G3 สูงสุด รองลงมาคือ G9 และพบ G6, G10, G8 และ G5 ส่วน P-serotype พบเป็น P[8] สูงสุด รองลงมาคือ P[13] และ P[11] พบว่า G9 ซึ่งเป็น Porcine cluster มีความใกล้เคียงกับของคน ในส่วน G1, G3 และ G5 ซึ่งเป็น Human cluster พบว่ามีความใกล้เคียงกับของหมู นอกจากนั้น G6 ซึ่งเป็น Bovine cluster พบว่ามีความใกล้เคียงกับของคนและหมู ส่วน P-serotype พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับยีนมาตรฐานสำหรับอ้างอิง ซึ่งให้ผลตรงกับ cluster ที่เกิดขึ้น ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงหลักฐานที่ช่วยสนับสนุนว่าอาจเกิดการแพร่ระบาดของไวรัสโรทาระหว่างคนและสัตว์ เกิดเป็นสายพันธุ์ผสมระหว่าง host ต่างสปีชีส์กัน ลักษณะการกลายพันธุ์ที่อาจเป็นสายพันธุ์ลูกผสม หรือสายพันธุ์ที่ไม่พบโดยปกติทั่วไป (unusual strains) คือ

G5P[8] ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ค่อยพบในประเทศไทย และ G8P[8]⁽¹⁹⁻²¹⁾

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้พบจีโนทัยป์ G8 ซึ่งไม่ใช่สายพันธุ์ที่ระบาดตามปกติในทุกประเทศทั่วโลก (uncommon stain) มีการศึกษาพบ G8 ครั้งแรกในประเทศอินโดนีเซีย ในปี พ.ศ. 2528⁽²²⁾ และต่อมาพบการระบาดในหลายๆ ประเทศ โดยมีอัตราการระบาดในระดับต่ำและพบไม่บ่อย แต่ในการศึกษาค้นพบไวรัสโรทา G8 ร้อยละ 5.36 ต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้มีการติดเชื้อไวรัสโรทาในเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลบาราศนราศุรในช่วงปี พ.ศ. 2556-2557 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ G8P[8] สูงถึงร้อยละ 21.92⁽²¹⁾ นอกจากนั้นยังพบว่าจีโนทัยป์ G8 มักได้มาจากสายพันธุ์ที่ติดเชื้อในวัวและสัตว์พาหะอื่นๆ⁽²⁰⁾ ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก เพราะถ้าอัตราการระบาดที่เพิ่มสูงขึ้นหมายถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่มีอยู่ในปัจจุบันก็จะต่ำลง เนื่องจากวัคซีนที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันทั้ง Rotarix® และ RotaTeq™ อาจจะไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันจีโนทัยป์ G8

จากสถานการณ์ที่เกิดขึ้นทั่วโลกจะพบการแพร่ระบาดของไวรัสโรทา G9 ในผู้ป่วยเด็ก ซึ่งในประเทศไทยก็มีรายงานในอดีตว่า G9 ถูกแยกได้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2532 จากผู้ป่วยเด็กในจังหวัดเชียงใหม่⁽²³⁾ นอกจากนั้นยังมีอัตราพบ ร้อยละ 16.2 ในตัวอย่างที่เก็บได้ในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2539-2540 และเพิ่มขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2543-2544 มากถึงร้อยละ 91.6⁽²³⁾ จากการศึกษาในครั้งนี้ได้พบ G9 ในหมู่มากถึงร้อยละ 33.93 ทำให้ทราบว่าจีโนทัยป์ G9 มีความใกล้เคียงกับคน

ในการศึกษาค้นครั้งนี้ได้จำแนกเป็นสายพันธุ์ G3P[8] G8P[8] G1P[8] G5P[8] G9P[13] G6P[11] และ G10P[11] ตามลำดับ ซึ่งวัคซีนสามารถใช้ครอบคลุมได้เฉพาะ G1P[8] เท่านั้น แต่อาจจะ

ไม่ครอบคลุมทุกส่วนของ G และ P serotype ได้แก่ G3P[8] G8P[8] G5P[8] G9P[13] G6P[11] และ G10P[11] อย่างไรก็ตาม Rotarix ที่เป็น monovalent G1P[8] human attenuated vaccine ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันครอบคลุม genotype G1P[8] ได้เท่านั้น จากรายงานการทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพกับซีโรทัยป์ G1 ร้อยละ 92 และมีประสิทธิภาพกับซีโรทัยป์ G3, G4 หรือ G9 ร้อยละ 88 และมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของซีโรทัยป์ G2 ร้อยละ 41⁽⁶⁾ ส่วน RotaTeq™ ที่เป็น pentavalent human bovine reassorted vaccine ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ G1P[4], G2P[4], G3P[4], G4P[4] และ G6P[8] ซึ่งได้รับอนุญาตให้ใช้ได้หลายประเทศ⁽²⁴⁾ จากรายงานการทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพกับซีโรทัยป์ G1 ร้อยละ 75 และซีโรทัยป์ G2 ร้อยละ 63 มีแนวโน้มว่าซีโรทัยป์ที่เหลือจะมีประสิทธิภาพร้อยละ 83 สำหรับซีโรทัยป์ G3 ร้อยละ 48 สำหรับซีโรทัยป์ G4 และ ร้อยละ 65 สำหรับซีโรทัยป์ G9⁽⁶⁾

ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของโปรตีนระหว่างสายพันธุ์ไวรัสโรทาที่พบตามฤดูกาลและสายพันธุ์วัคซีนจาก alignment ด้วยโปรแกรม MAFFT แสดงให้เห็นว่าแม้กรดอะมิโนของทั้ง 25 สายพันธุ์จะมีความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์วัคซีนที่มีซีโรทัยป์เดียวกัน แต่เมื่อวิเคราะห์เชิงลึกของกรดอะมิโนที่เป็น neutralization epitopes แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ G10P[11] มีการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วที่แตกต่างจากสายพันธุ์วัคซีนมากถึง 19 ตำแหน่ง ยกตัวอย่างเช่น เปลี่ยนจาก negatively charged เป็น positively charged เป็น polar ของ epitope 7-1a (K/E99T) หรือการเปลี่ยนจาก polar เป็น nonpolar ของ epitope 7-1b (N/D211G และ N/S213F) epitope 8-1 (S188V และ N/D195V) epitope 8-2 (T180A) หรือการเปลี่ยนจาก nonpolar

ไปเป็น polar ของ epitope 7-2 (D/A145N) epitope 8-1 (L193N และ I196P) epitope 8-2 (A183Q) epitope 8-3 (N113A และ V115T) หรือเปลี่ยนจาก positively charged เป็น negatively charged ของ epitope 8-3 (S/R131D) หรือเปลี่ยนจาก polar เป็น positively charged ของ epitope 7-1b (T/S242R) เป็นต้น ส่วนสายพันธุ์ G5P[8] ที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุหรือขั้วที่แตกต่างจากสายพันธุ์วัคซีน 6 ตำแหน่ง ยกตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนจาก negatively charged เป็น positively charged ของ epitope 7-1a (E97K) หรือการเปลี่ยนจาก polar เป็น nonpolar ของ epitope 8-1 (S146G และ N195G) เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งเอพิโทปเหล่านี้อาจส่งผลให้โครงของโปรตีนเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลให้ไวรัสสามารถหลบเลี่ยงแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อของไวรัสโรทาที่เกิดจากวัคซีน ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์จากวิวัฒนาการของการผสมแลกเปลี่ยนยีนข้ามสายพันธุ์ของจีโนมไวรัสโรทาและใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวางแผนทางในการคัดเลือกวัคซีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงกับเด็กไทย เพื่อช่วยสนับสนุนการวิจัยพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมได้

การศึกษาต่ออย่างละเอียดในอนาคตควรนำตัวอย่างที่ได้ไปถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมด้วยเทคนิค Next-generation sequencing แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLC genomics workbench และ Geneious เบื้องต้นทั้ง 11 ยีนที่มีต้นกำเนิดมาจากโรทาในคน และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพันธุกรรมไวรัสใน EMBL/GenBank หรือ DDBJ เพื่อให้ทราบการเปลี่ยนแปลงและวิวัฒนาการของจีโนมของเชื้อไวรัสโรทาที่พบในโครงการศึกษานี้ และใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวางแผนทางในการคัดเลือกวัคซีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงกับเด็กไทย สนับสนุน

นโยบายด้านการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคอุจจาระร่วงให้กับเด็กไทย รวมถึงข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการวิจัยต่อยอดด้านการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค การวางแผนป้องกันโรค เพื่อช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยของเด็กไทย และส่งเสริมให้คนไทยมีสุขภาพที่ดีขึ้น

สรุป

ไวรัสโรทากลุ่ม เอ มีอัตราการติดเชื้อร้อยละ 23.71 ของผู้ป่วยและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ วัว หมู และม้า ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และอุตรธานี ในปี พ.ศ. 2565-2566 สายพันธุ์ของไวรัสโรทาที่พบมากที่สุดคือ G3P[8] G8P[8] G1P[8] G5P[8] G9P[13] G6P[11] และ G10P[11] ตามลำดับ ไวรัสโรทามีความหลากหลายจึงควรมีการเฝ้าระวังและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์ด้านระบาดวิทยา นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งเอพิโทปอาจส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลให้ไวรัสสามารถหลบเลี่ยงแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อ ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์จากวิวัฒนาการของเชื้อ การผสมแลกเปลี่ยนยีนข้ามสายพันธุ์ของซีโรทัยป์ไวรัสโรทา และข้อมูลในการทดลองยังจะช่วยสนับสนุนการวางแผนทางในการคัดเลือกวัคซีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงกับเด็กไทย เพื่อช่วยสนับสนุนการวิจัยพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) และได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรธานี และโรงพยาบาลหนองหาน จังหวัดอุดรธานี ในการเก็บตัวอย่าง

ในผู้ป่วยและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการให้สถานที่ทดลองวิจัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. Jelle M, Max C, Erica H, *et al.* Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 2008; 82: 3204-19.
2. Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 2010; 140: 246-55.
3. Ghosh S, Alam MM, Ahmed MU, Talukdar RI, Paul SK, Kobayashi N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J Gen Virol* 2010; 91: 2367-73.
4. Maes P, Matthijnssens J, Rahman M, Ranst MV. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol* 2009; 9: 238.
5. Viralzone.expasy.org [homepage on the Internet]. Rotavirus [cited 2025 Jan 6]. Available from: https://viralzone.expasy.org/107?outline=all_by_species
6. Dennehy PH. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 198-208.

7. KU LEUVEN [homepage on the Internet]. Newly assigned genotypes: List of accepted genotypes. Rotavirus Classification Working Group [cited 2025 Jan 6]. Available from: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
8. Asma S, Bostan N, Khan J, Aziz A. Effect of rotavirus genetic diversity on vaccine impact. Wiley 2021; 32: e2259.
9. Mukherjee A, Ghosh S, Bagchi P, *et al.* Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from North-eastern India- evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1343-6.
10. Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. Vet Microbiol 2012; 158: 410-4.
11. Wang YH, Pang B, Zhou X, *et al.* Complex evolutionary patterns of two rare human G3P[9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation. Infect Genet Evol 2013; 16: 103-12.
12. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, *et al.* Whole genomic analysis of an unusual human G6P[14] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea in Thailand: evidence for bovine-to-human interspecies transmission and reassortment events. PLoS One 2015; 10: e0139381.
13. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, *et al.* Identification and characterization of a human G9P[23] rotavirus strain from a child with diarrhoea in Thailand: evidence for porcine to human interspecies transmission. J Gen Virol 2017; 98: 532-8.
14. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, *et al.* Characterization of a G10P[14] rotavirus strain from a diarrheic child in Thailand: Evidence for bovine-to-human zoonotic transmission. Infect Genet Evol 2018; 63: 43-57.
15. Cunliffe NA, Nakagomi O. A critical time for rotavirus vaccines: a review. Expert Rev Vaccines 2005; 4: 521-32.
16. Aleksandra P, Vladimir V, Gordana K, *et al.* Detection and molecular characterization of rotavirus infections in children and adults with gastroenteritis from Vojvodina, Serbia. microorganisms 2022; 10: 2050.
17. Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, *et al.* Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. Epidemiol Infect 1992; 109: 303-12.
18. Wu H, Taniguchi K, Wakasugi F, *et al.* Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction. Epidemiol Infect 1994; 112: 615-22.

19. Esona MD, Armah GE, Geyer A, Steele AD. detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea. J Clin Microbiol 2004; 42: 441-4.
20. Chutoam P, Intamaso U. Estimates the evolution of G8P[8] rotaviruses in Thailand during 2012-2014. Trends in Sciences 2022; 19: 5812.
21. Intamaso U1, Poomipak W, Chutoam P, *et al.* Genotype distribution and phylogenetic analysis of rotaviruses in Thailand and emergence of uncommon genotypes Arch Clin Microbiol 2017; 8: 60.
22. Matsuno S, Hasegawa A, Mukoyama A, *et al.* A candidate for a new serotype of human rotavirus. J Virol 1985; 54: 623-4.
23. Theamboonlers A, Bhattarakosol P, Chongsrisawat V, *et al.* Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. Virus Genes 2008; 36: 289-98.
24. Santosham M, Nelson EA, Bresee JS. Implementing rotavirus vaccination in Asia. Vaccine 2007; 25: 7711-6.