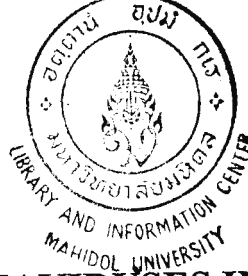


18 JUN 2003



**DETECTION OF ROTAVIRUSES IN WATER SAMPLES
BY REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED
POLYMERASE CHAIN REACTION**

SOM EKCHALOEMKIET
๒

With compliments

๑๑

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)
MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2003

ISBN 974-04-2965-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S693d
2003
c. 2

DETECTION OF ROTAVIRUSES IN WATER SAMPLES BY REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION.

SOM EKCHALOEMKIET 4336212 PHPH/M

M.Sc. (PUBLIC HEALTH) MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES

THESIS ADVISORS: LEERA KITTIGUL, Ph.D. (MICROBIOLOGY), KANOKRAT SIRIPANICHGON, M.P.H., DUSIT SUJIRARAT, M.Sc. (BIOSTATISTICS), FUANGFA UTRARACHKIJ, M.Sc. (PUBLIC HEALTH)

ABSTRACT

Rotaviruses are well recognised as one of the principal etiologic agents of acute diarrheal illness in human infants and young animals. Outbreaks of waterborne gastroenteritis caused by rotaviruses are reported. Since only a few virus particles are present in water samples, a concentration method and a highly sensitive technique were used in this study for detection of rotaviruses in environmental water samples. Detection limit of rotavirus determined by reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) was about 3.57×10^2 infectious forming units (IFU)/ml of phosphate-buffered saline and about 2.5×10^3 IFU/100 ml of water sample before virus concentration. No cross-reactivity was found in the presence of other enteric viruses. Water samples were collected from Chaopraya river, Klong Samsen, domestic sewage, and tap water in storage containers for domestic usage from the Rim-Klong Samsen congested community, Ratchathewi district, Bangkok. Of 119 water samples, 20 (16.81%) concentrated samples were positive for rotavirus RNA. It was detected in 8/30 (26.7%) of the canal, 10/39 (25.64%) of the sewage, and 2/10 (20%) of the river. Rotavirus RNA was not found in any tap water (0/40) samples. Sequence analysis of the product (VP7-346 bp fragment) obtained from 8 rotavirus-positive samples showed human rotavirus with 97-98% similarity in 2 samples, rotavirus G9 (94-99% similarity) in 5 samples and animal rotavirus (97% similarity) in one sample. PCR inhibitors were not observed in any concentrated water samples. Bacterial indicators (fecal coliforms and *E. coli*) in all water samples were determined using multiple tube fermentation method. Most of the water samples collected were highly contaminated with fecal coliforms and *E. coli*. Relationships between rotaviruses versus fecal coliforms and rotaviruses versus *E. coli* were demonstrated with statistical significance (*p*-value, 0.0164 and 0.0044, respectively). However, the degree of agreement in the presence of rotaviruses compared with the presence of fecal coliforms (κ , 0.0923) or *E. coli* (κ , 0.1275) was poor.

This study indicated that a combination of effective virus concentration method and RT-nested PCR was able to detect rotaviruses in environmental water samples. The presence of naturally occurring rotaviruses in Chaopraya river and Klong Samsen might pose a potential health risk for people using this water of being infected by rotavirus.

KEY WORDS: ROTAVIRUS/ WATER SAMPLES/ REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

การตรวจหาไวรัสโรตาในตัวอย่างน้ำโดยวิธี reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction
(DETECTION OF ROTAVIRUSES IN WATER SAMPLES BY REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED
POLYMERASE CHAIN REACTION)

สั้ม เอกเฉลิมเกียรติ 4336212 PPH/M

วท.ม. (สาขารวมสุขภาพ) สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ลีรา กิตติกุล Ph.D. (Microbiology), กนกรัตน์ ศิริพานิชกร, M.P.H.,
ดุสิต สุจิรัตน์, M.Sc. (Biostatistics), เฟื่องฟ้า อุตวรารักษ์กิจ, M.Sc. (Public Health)

บทคัดย่อ

ไวรัสโรตาเป็นสาเหตุสำคัญก่อโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในเด็กเล็ก และสัตว์ที่ยังเยาว์ มีรายงานการระบาดของโรคทางเดินอาหารอีกเสบสาเหตุจากไวรัสโรตาโดยมีน้ำเป็นสื่อ เนื่องจากในตัวอย่างน้ำมีไวรัสอยู่จำนวนน้อยในการศึกษานี้จึงใช้วิธีการทำให้ไวรัสเข้มข้น และตรวจหาไวรัสโรตาในตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมโดยใช้วิธี reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) ซึ่งพบว่ามีความไวในการตรวจหาไวรัสโรตาประมาณ 3.57×10^2 IFU/ml ของสารละลายบัฟเฟอร์ และมีความไวในการตรวจหาไวรัสโรตาที่เติมลงในตัวอย่างน้ำ 2.5×10^3 IFU/100 ml ก่อนการทำให้เข้มข้น ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสก่อโรคผ่านทางเดินอาหารอื่น ๆ ในการตรวจหาไวรัสโรตาในแหล่งน้ำต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา คลองสามเสน น้ำเสีย และน้ำประปาในภาชนะกักเก็บซึ่งใช้สำหรับอุปโภคในชุมชนริมคลองสามเสน เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร จากตัวอย่างน้ำจำนวน 119 ตัวอย่าง ตรวจพบอาร์เอ็นเอของไวรัสโรตาในตัวอย่างน้ำที่ถูกทำให้เข้มข้นแล้ว 20 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.81) เป็นน้ำจากน้ำคลอง 8 ใน 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26.7) น้ำเสีย 10 ใน 39 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.64) และแม่น้ำ 2 ใน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) ไม่พบไวรัสโรตาในตัวอย่างน้ำประปา (0 ใน 40 ตัวอย่าง) ในการวิเคราะห์ลำดับขั้นของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 346-bp ที่ได้จากการทำ RT-nested PCR ในตัวอย่างน้ำที่ตรวจพบไวรัสโรตา 8 ตัวอย่าง พบว่ามีลำดับขั้นของ VP7 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับขั้นของไวรัสโรตาของคน 2 ตัวอย่าง (คล้ายคลึงร้อยละ 97-98) ไวรัสโรตาซีโรทัยป์ G9 5 ตัวอย่าง (คล้ายคลึงร้อยละ 94-99) และไวรัสโรตาของสัตว์ 1 ตัวอย่าง (คล้ายคลึงร้อยละ 97) ไม่พบสารยับยั้งกระบวนการ PCR ในตัวอย่างน้ำที่เข้มข้น เมื่อวิเคราะห์ ฟิคัล โคลิฟอร์ม และ อี. โคไล ในตัวอย่างน้ำด้วยวิธี multiple tube fermentation method พบว่าตัวอย่างน้ำส่วนใหญ่ปนเปื้อนด้วย ฟิคัล โคลิฟอร์ม และ อี. โคไล สูง การตรวจพบไวรัสโรตากับ ฟิคัล โคลิฟอร์ม และไวรัสโรตากับ อี. โคไล มีความสอดคล้องกันอย่างมากมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value, 0.0164 และ 0.0044 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ระดับของความสอดคล้องในการตรวจพบไวรัสโรตาเปรียบเทียบกับ ฟิคัล โคลิฟอร์ม (K, 0.0923) หรือเปรียบเทียบกับ อี. โคไล (K, 0.1275) อยู่ในระดับต่ำ

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้วิธีทำให้ไวรัสเข้มข้นร่วมกับวิธี RT-nested PCR ที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจพบไวรัสโรตาได้ในตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม การที่มีเชื้อไวรัสโรตาในแม่น้ำเจ้าพระยา และคลองสามเสน อาจทำให้ประชากรที่ใช้น้ำเหล่านี้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสโรตา