ความชุกของฮิวแมนโรตาไวรัสกลุ่มเอจีโนไทป์ในเด็กอุจจาระร่วง ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์อาร์ทีพีซีอาร์

นางสาวกมลวรรณ คณานุรักษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF HUMAN ROTAVIRUS GROUP A GENOTYPE IN CHILDREN WITH DIARRHEA USING MULTIPLEX RT-PCR

Miss Kamonwan Khananurak

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Sciences
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของฮิวแมนโรตาไวรัสกลุ่มเอจีโนไทป์ในเด็กอุจจาระร่วงด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์อาร์ทีพีซีอาร์
โดย	นางสาว กมลวรรณ คณานุรักษ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วรนุช จงศรีสวัสดิ์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กมลวรรณ คณานุรักษ์ : ความชุกของฮิวแมนโรตาไวรัสกลุ่มเอจีโนไทป์ในเด็กอุจจาระร่วงด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์อาร์ทีพีซีอาร์. (PREVALENCE OF HUMAN ROTAVIRUS GROUP A GENOTYPE IN CHILDREN WITH DIARRHEA USING MULTIPLEX RT-PCR) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ 81 หน้า.

โรตาไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในทารกและเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ทั่วโลก ในแต่ละปีมีเด็กเสียชีวิตจากอาการของโรคนี้ประมาณ 527,000 คน โดย อัตราการตายส่วนใหญ่ถูกพบในประเทศกำลังพัฒนา ในประเทศไทย พบว่า หนึ่งในสามของผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ดังนั้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาความชุกและคุณลักษณะในระดับอณูชีวโมเลกุลของเชื้อโรตาไวรัสที่พบในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลสี่แห่งในประเทศไทย ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2550 – เดือนพฤษภาคม 2552 จากการศึกษาในตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วย 557 ตัวอย่าง ด้วยวิธี RT-PCR พบให้ผลบวกต่อโรตาไวรัส 158 ตัวอย่าง(28.4%) ซึ่งผลการแยกจีโนไทป์พบเป็น G1P[8](49.4%) มากที่สุด รองลงมา คือ G9P[8](22.2%), G2P[4](20.2%) และ G3P[8](0.6%) นอกจากนั้น ในการศึกษานี้ยังพบ G12P[8], G12P[6] และ G3P[9] ซึ่งเป็น uncommon strains ในประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างที่พบ ได้นำมาใช้ศึกษาลงลึกในระดับอณูชีวโมเลกุล และ Phylogenetic analysis เพื่อดูความสัมพันธ์ภายใน G และ P genotype ที่พบ และจากผลการศึกษาความชุก การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนา multiplex RT-PCR สำหรับตรวจแยกจีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบบ่อยในปัจจุบัน เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการศึกษาจีโนไทป์ด้วยวิธี monoplex RT-PCR ทั่วไป โดย วิธี multiplex RT-PCR ได้นำมาทดสอบกับตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อโรตาไวรัส พบว่า ให้ผลตรงกันกับการศึกษาความชุก 146 ตัวอย่าง (92.4%) และไม่พบ cross-reaction กับไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่น.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต...

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์...............................

5074862230 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : Rotavirus / Prevalence / Genotype / VP4 / VP7

KAMONWAN KHANANURAK : PREVALENCE OF HUMAN ROTAVIRUS GROUP A GENOTYPE IN CHILDEN WITH DIARRHEA USING MULTIPLEX RT-PCR. THESIS ADVISOR : PROF YONG POOVORAWAN, M.D., 81 pp.

Rotaviruses are the most common cause of severe diarrhea among infants and young children worldwide. Each year, rotavirus diarrhea results in an estimated 527,000 fatalities of children below 5 years of age, with the fatality rate highest in developing countries. In Thailand, rotavirus represents the major cause of diarrhea in infants and children, and is responsible for about one-third of diarrheal diseases in hospitalized patients. In this study, we have described the distribution and molecular characterization of rotaviruses circulating in infants and children with diarrhea admitted in four hospitals of Thailand between July 2007 and May 2009. Group A rotaviruses were detected in 158 (28.4%) of 557 specimens by RT-PCR. The G1P[8] was identified at high levels(49.4%) followed by G9P[8](22.2%), G2P[4](20.2%) and G3P[8](0.6%). The uncommon strains G12P[8], G12P[6] and G3P[9] were also detected. Molecular characterization and phylogenetic analysis of G and P genotypes were described. The multiplex RT-PCR was developed for rapid and cost-effective etiological diagnostic tool for rotavirus common G-genotypes. The performance of this assay was tested on isolates from this study and showed well correlated result of 92.4%(146) prevalence. No cross-reactivity was observed with other enteric viruses.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of Study : Medical Science Student's Signature Kamon Khanank

Academic Year : 2009 Advisor's Signature Yong Poov

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัยเพียบพร้อม ได้ชี้นำแนวความคิดของการเป็นนักวิจัยที่ดี พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาอันมีประโยชน์ และคุณค่ายิ่งต่องานวิจัยนี้มาโดยตลอด ตลอดจนให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนที่ให้ความร่วมมือ การเก็บรวบรวมตัวอย่างอุจจาระสำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของเจ้าหน้าที่แพทย์ พยาบาล และห้องปฏิบัติการ จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น โรงพยาบาลนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา และโรงพยาบาลอุ้มผาง จังหวัดตาก ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญามหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ ซึ่งมีค่า และประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เหน็ดเหนื่อยเพื่อให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรัก และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ
กิตติกรรมประกาศ... ฉ
สารบัญ... ช
สารบัญตาราง... ญ
สารบัญภาพ.. ฎ
คำย่อ... ฐ
บทที่ 1 บทนำ.. 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา... 2
คำถามงานวิจัย.. 3
วัตถุประสงค์งานวิจัย.. 3
สมมติฐานการวิจัย.. 4
ขอบเขตของงานวิจัย... 5
ข้อตกลงเบื้องต้น.. 5
ข้อจำกัดของงานวิจัย.. 5
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย... 5
คำสำคัญ.. 5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 5
วิธีดำเนินการวิจัย... 6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย.. 7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง... 8
แนวคิดและทฤษฎี.. 8
หลักการของ RT-PCR... 9
หลักการของ Multiplex RT-PCR... 10
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 10
การค้นพบ... 10
อนุกรมวิธาน.. 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	หน้า
โรตาไวรัส..	11
ลักษณะทางชีวโมเลกุลและโครงสร้างของโรตาไวรัส..	11
วงจรของโรตาไวรัส(Replication cycle)…………………………………………..	14
พยาธิกำเนิดและภูมิคุ้มกัน..	16
โรตาไวรัสจีโนไทป์..	17
การติดต่อ...	21
ลักษณะอาการทางคลินิก..	21
การตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อโรตาไวรัส...	21
การรักษา..	22
การป้องกัน..	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..	23
รูปแบบการวิจัย...	23
ประชากร..	23
การคำนวณขนาดตัวอย่าง..	23
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..	24
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย...	25
วิธีดำเนินการวิจัย..	27
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..	38
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..	38
การศึกษาความชุกของ Rotavirus……………………………………………..	38
พัฒนาการตรวจจีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบบ่อยด้วย Multiplex RT-PCR……….	57
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย..	61
สรุปผลและวิจารณ์ผลการศึกษาความชุก..	61
สรุปผลและวิจารณ์ผลการพัฒนา Multiplex RT-PCR……………………………	65
รายงานอ้างอิง...	68
ภาคผนวก..	72
ภาคผนวก ก..	73
ภาคผนวก ข..	75
ภาคผนวก ค..	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปคุณสมบัติและหน้าที่ของโรตาไวรัสโปรตีน...	13
2	แสดงความหลากหลายของ G/P combination ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อ Rotavirus…………………………………………………………….………	20
3	แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR…………………….………	29
4	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน VP4 และ VP7 gene ของ Rotavirus…………………………………………………….…………..	30
5	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ RT-PCR ของ Rotavirus ในส่วน VP4 และ VP7 gene...	30
6	แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ Multiplex RT-PCR……..…………..	33
7	แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR ในส่วน Rotavirus VP7 gene………………………………………………………………………………	33
8	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Multiplex RT-PCR ของ Rotavirus ในส่วน VP7 gene…………………………………………………………………..	34
9	แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับ Vector …………………….……	34
10	แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ In vitro transcription…………………...	35
11	แสดงการแปลผล G-genotype ในการทำ Multiplex RT-PCR ของ Rotavirus VP7 gene……………………………………………………………………..	37
12	แสดงผลการตรวจพบเชื้อ Rotavirus จากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยเด็กที่เข้าพักรักษาตัวด้วยอาการอุจจาระร่วงในโรงพยาบาลแต่ละจังหวัด..................	39
13	แสดงผลจากการจำแนก Genotype ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ VP4 และ VP7 gene……………………………………………………………………..	43
14	แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Rotavirus ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลแต่ละจังหวัด..	44
15	เปรียบเทียบผลการวินิจฉัยด้วย Multiplex RT-PCR กับผลในขั้นตอนการศึกษาความชุก..	60

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ขอบเขตการวิจัย.. 4

2 อนุภาคโรตาไวรัสในตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วย........................ 11

3 ภาพแสดงจีโนมของโรตาไวรัสและผลผลิตโปรตีน…………………………………… 12

4 วงชีวิตของโรตาไวรัส... 15

5 กลไกทางพยาธิกำเนิดของเชื้อโรตาไวรัส…………………………………………….. 16

6 Phylogenetic tree ของโรตาไวรัส P-genotype…………………………………….. 18

7 Phylogenetic tree ของโรตาไวรัส G-genotype…………………………………….. 19

8 แสดงขนาดของผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอ(RNA amplification) ของโรตาไวรัสในส่วนของ VP7 และ VP4 gene……………………………………………….. 38

9 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อโรตาไวรัสที่พบในแต่ละเดือน รวมสี่จังหวัด ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2550 ถึงพฤษภาคม 2552... 40

10 กราฟแท่งแสดงจำนวนการพบเชื้อโรตาไวรัสในแต่ละช่วงอายุของผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล รวมสี่จังหวัด………………………………………………….. 40

11 แสดงตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP4 gene ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST…………………………………………………………………………….. 41

12 แสดงตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 gene ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST…………………………………………………………………………….. 41

13 แสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST.............................. 42

14 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ VP7 gene ด้วยโปรแกรม Chromas………. 42

15 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeG1 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม............................. 47

16 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeG2 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม…………………….. 48

17 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeG3 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม…………………….. 49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ หน้า

18 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeG9 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม…………………….. 50
19 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeG12 เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม……………………..… 51
20 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeP[8] เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม…………………….. 53
21 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeP[6] เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม……………………. 54
22 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeP[4] เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม……………………. 55
23 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ GenotypeP[9] เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม……………………. 56
24 ผลการทดสอบ primer ในการเพิ่มจำนวน recombinant plasmid โดยการทำ Multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus……………………………………….. 57
25 ผลการทดสอบความไวของ multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus.............. 58
26 ตัวอย่างผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus……………………………………………………………………….. 59
27 กราฟเปรียบเทียบจีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบในช่วงปี พ.ศ.2541-2542, 2545-2547, 2547-2549 และผลจีโนไทป์ที่ได้จากการศึกษานี้ในช่วง 2550-2552......... 62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EtOH	Ethanol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IAA	Isoamyl alcohol
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	messenger ribonucleic acid
ml	Milliliter
NaOAc	Sodium acetate
NSP	Non-structural protien
nt	Nucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
Tm	Melting temperature
VP4	Viral protein 4
VP7	Viral protein 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

โรตาไวรัส (Rotavirus) เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในเด็กเล็กช่วงอายุน้อยกว่า 5 ปีทั่วโลก(1) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีอาการไข้ อาเจียน และถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ ติดต่อผ่านทางการกิน(fecal-oral route) การติดเชื้อพบบริเวณระบบทางเดินอาหารส่วนลำไส้เล็ก โดยเชื้อไวรัสจะเข้าไปเจริญแบ่งตัวในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้(villi) เซลล์ที่ติดเชื้อจะถูกทำลายและฝ่อไป ทำให้สูญเสียความสามารถในการดูดซึมน้ำและสารอาหาร ดังนั้นผู้ป่วยจึงมีภาวะขาดน้ำและสารอาหารร่วมด้วย ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอาจเกิดภาวะช็อค และเสียชีวิตได้(2) ในแต่ละปีมีเด็กเสียชีวิตด้วยโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ประมาณ 527,000 คน และพบว่ามากกว่า 85% ของเด็กที่เสียชีวิตอยู่ในประเทศที่มีรายได้น้อยในแถบทวีปแอฟริกา และเอเชีย จากผลการสำรวจอุบัติการณ์ของเชื้อโรตาไวรัสโดย WHO Surveillance Network ตั้งแต่ปี ค.ศ.2001-2008 ชี้ให้เห็นว่ากว่า 40% ของผู้ป่วยเด็กทั่วโลกที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วงมาจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่งในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้เฉลี่ยประมาณ 44%(1,3,4) และเนื่องจากการระบาดพบมากในช่วงฤดูหนาว และมีรายงานการพบเชื้อโรตาไวรัสในสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจที่เก็บจากผู้ป่วยเด็กที่มาพบแพทย์ด้วยอาการอุจจาระร่วงจากเชื้อไวรัสชนิดนี้(5) จึงมีผู้สันนิษฐานว่า เชื้อไวรัสชนิดนี้อาจติดต่อผ่านทางการหายใจได้ การรักษาโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสในปัจจุบันไม่มียารักษาที่จำเพาะ เป็นเพียงการรักษาเพื่อบรรเทาภาวะขาดน้ำเท่านั้น

การจำแนก genotype ของ rotavirus group A จำแนกตามลำดับเบสบน outer capsid VP7 และ VP4 genes ได้เป็น 20 G-genotypes และ 28 P-genotypes ตามลำดับ(6) สายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในปัจจุบันนี้ คือ G1, G2, G3, G4 และG9 ปัจจุบันได้มีการพัฒนา monovalent attenuated human rotavirus vaccine และ pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine เข้ามาใช้ โดยวัคซีนที่ได้รับการจดทะเบียนและใช้กันมากในปัจจุบันส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การป้องกัน human rotavirus group A G1, G2, G3, G4 และ P1A[8](7) ซึ่งเป็น genotype ที่พบได้บ่อย เมื่อมีการนำวัคซีนเข้ามาใช้เพื่อการป้องกันเพิ่มขึ้นอาจมีผลให้ genotype ของ human rotavirus group A ที่ระบาดในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น genotype ที่สามารถหลบหลีกวัคซีนได้เพิ่มขึ้น ดังเห็นได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า มี

อุบัติการณ์การเพิ่มขึ้นของ G2, G9 และ G12 เพิ่มสูงขึ้น(8-11) และมีการค้นพบ human rotavirus ที่มีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกับ animal rotavirus ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการนำวัคซีนเข้ามาใช้ในปัจจุบัน(12,13) และจากรายงานการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อโรตาไวรัสในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา พบว่า เชื้อโรตาไวรัสสายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทยในปัจจุบัน ได้แก่ G1P[8], G9P[8] และ G2P[4] (8,14-17)

ความก้าวหน้าทางด้านวิทยาการและเทคโนโลยีในปัจจุบัน ได้ผลักดันให้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค รวมถึงการพัฒนาการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ ทางด้านอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง เทคนิคนี้ได้ถูกนำเข้ามาใช้กันอย่างกว้างขวาง และเป็นหนึ่งในหลายๆเทคนิคที่ถูกดัดแปลงและพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยและแยกสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคต่างๆ รวมถึงเชื้อโรตาไวรัส

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบความชุกและชนิดจีโนไทป์ของ Human rotavirus group A ในเด็กอุจจาระร่วงที่อยู่ในเขตตัวเมือง ซึ่งมีโอกาสได้รับวัคซีนมากกว่าเด็กในชนบท โดยให้เด็กจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร และโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นตัวแทนเด็กในเขตตัวเมือง และเด็กในโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลอุ้มผาง จังหวัดตากเป็นตัวแทนเด็กในเขตชนบท และพัฒนาการตรวจจีโนไทป์ชนิด G-type ของเชื้อโรตาไวรัสสายพันธุ์ที่พบบ่อย ได้แก่ G1, G2 และ G9 ด้วยวิธี multiplex RT-PCR เพื่อลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการแยกจีโนไทป์จากการทำ monoplex RT-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อทั่วไป

คำถามงานวิจัย (Research questions)

1. ความชุกของเชื้อโรตาไวรัสในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้ามาพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในเขตตัวเมืองแตกต่างจากโรงพยาบาลในเขตชนบทหรือไม่ อย่างไร

2. จีโนไทป์ของเชื้อโรตาไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้ามาพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในเขตตัวเมืองแตกต่างจากโรงพยาบาลในเขตชนบทหรือไม่ อย่างไร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อโรตาไวรัสในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในเขตตัวเมืองเปรียบเทียบกับโรงพยาบาลที่อยู่ในเขตชนบท

2. เพื่อศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อโรตาไวรัสในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในเขตตัวเมืองเปรียบเทียบกับโรงพยาบาลที่อยู่ในเขตชนบท

3. เพื่อพัฒนาการตรวจจีโนไทป์ชนิด G –type ของเชื้อโรตาไวรัสสายพันธุ์ที่พบบ่อยในปัจจุบันด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

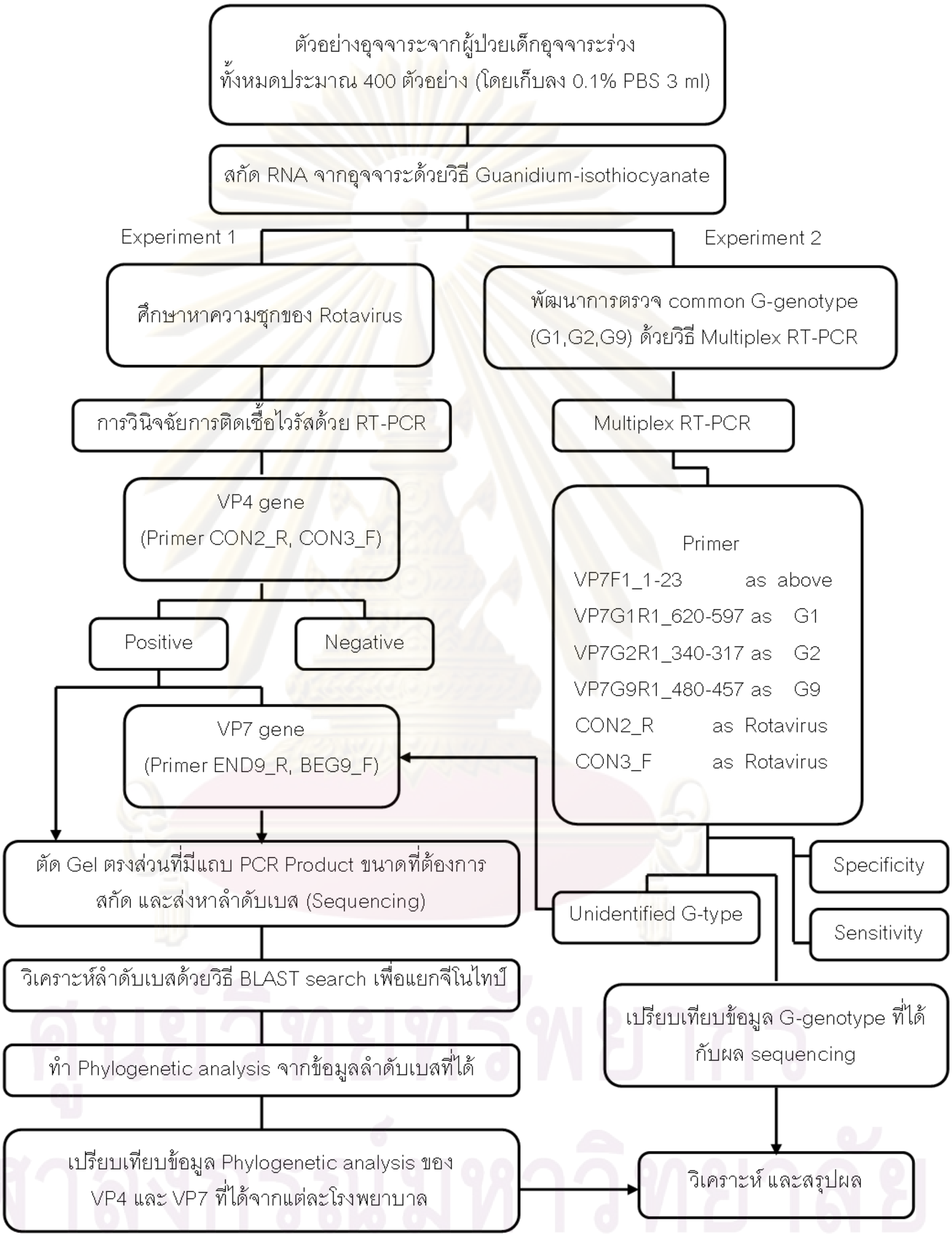
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

1. ความชุกของเชื้อโรตาไวรัสในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในเขตตัวเมืองแตกต่างจากโรงพยาบาลในเขตชนบท โดย ความชุกของเชื้อโรตาไวรัสที่พบในเขตตัวเมืองน่าจะต่ำกว่าในชนบท

2. จีโนไทป์ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบในเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในเขตตัวเมืองแตกต่างจากโรงพยาบาลในเขตชนบท โดย จีโนไทป์ที่พบในเขตตัวเมืองน่าจะมีอัตราส่วนของ G1P[8] ต่อจีโนไทป์อื่นๆ น้อยกว่าในชนบท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบเขตของการวิจัย



รูปที่1 ขอบเขตการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานตรวจบริการเพื่อหาการติดเชื้อโรตาไวรัส ดังนั้น ตัวอย่างที่สามารถทำการทดสอบได้บางตัวอย่างจึงมีปริมาณน้อยและไม่เพียงพอ เมื่อต้องทำการทดสอบซ้ำมากกว่า 2 ครั้ง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Genotype คือ การแบ่งกลุ่มของเชื้อโรตาไวรัส โดยวิธีการตรวจทางรหัสพันธุกรรม

Phylogenetic analysis คือ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Multiplex PCR คือ การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ต้องการตรวจหลายๆ เป้าหมายโดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการมากกว่า 1 คู่พร้อมกันในการทำปฏิกิริยา PCR เดียวกัน

คำสำคัญ

Rotavirus
Genotype
Prevalence
VP4
VP7

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบระบาดวิทยาของเชื้อโรตาไวรัสในประเทศไทย

2. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ เฝ้าระวัง และป้องกันโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อโรตาไวรัสได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการพิจารณาวางแผนเพื่อเลือกใช้ และพัฒนาวัคซีนต้านเชื้อโรตาไวรัสต่อไปในอนาคต

4. สามารถนำเทคนิค Multiplex RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในทางปฏิบัติ เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายจากการส่งตรวจ DNA sequencing เพื่อแยกจีโนไทป์ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัด RNA (RNA extraction) จากตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี Guanidium-isothiocyanate method

2. การศึกษาความชุกของ Rotavirus

2.1. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ Rotavirus ส่วน VP4 และ VP7 gene

2.2. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการทำ DNA sequencing

2.3. การวิเคราะห์ข้อมูล

2.4. เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

3. พัฒนาการตรวจจีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบบ่อยด้วย multiplex RT-PCR

3.1. เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ Rotavirus ด้วย multiplex RT-PCR

3.2. การ Cloning เพื่อใช้เป็น Positive Control ในการพัฒนา multiplex RT-PCR

3.3. การทำ In vitro transcription เปลี่ยน DNA เป็น RNA เพื่อใช้ในการทดสอบความไว

3.4. การทดสอบความไว (Sensitivity)

3.5. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

3.6. วิเคราะห์ผลการวินิจฉัยด้วย multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับผลในขั้นตอนการศึกษาความชุก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. การศึกษาความชุกของ Rotavirus

1.1. วิเคราะห์หาอัตราการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสในตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้

1.2. วิเคราะห์หาจีโนไทป์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ VP4 และ VP7 มาทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank หรือ BLAST search (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อหาจีโนไทป์

1.3. จัดกลุ่มโดย Phylogenetic analysis เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสที่มีรายงานจีโนไทป์ใน GenBank

1.4. เปรียบเทียบข้อมูลจีโนไทป์ที่พบในแต่ละโรงพยาบาลแต่ละช่วงเวลา เพื่อดูความแตกต่างของจีโนไทป์ที่พบในเขตตัวเมืองและชนบท

2. พัฒนาการตรวจจีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบบ่อยด้วย multiplex RT-PCR

2.1. ผลการทดสอบ primer ด้วย recombinant plasmids

2.2. ผลการทดสอบ sensitivity

2.3. ผลการทดสอบ specificity

2.4. ผลการวินิจฉัยด้วย multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับผลในขั้นตอนการศึกษาความชุก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรตาไวรัส (Rotavirus) เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ทั่วโลก ในแต่ละปีมีเด็กเสียชีวิตจากโรคนี้เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา และจากรายงานการศึกษาในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา พบว่า ในปัจจุบันสายพันธุ์ที่พบก่อโรคอุจจาระร่วงในเด็กมากที่สุดทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ได้แก่ G1P[8], G2P[4] และ G9P[8] (8,14-17)

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรตาไวรัสในผู้ป่วยอุจจาระร่วงมีด้วยกันหลายวิธี วิธีที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อตามห้องปฏิบัติการทั่วไป ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ latex agglutination ซึ่งอาศัยเทคนิคทาง Immunoassay ในการตรวจหาแอนติเจนจากเชื้อไวรัสโดยตรง สำหรับการตรวจแยกสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัส ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และนำไปย้อมด้วย silver stain เพื่อดู genomic RNA pattern (electropherogram) นั้นก็เป็นที่นิยมเช่นกัน แต่จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า วิธีดังกล่าวจะสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อเมื่อในสิ่งส่งตรวจมีปริมาณ RNA แต่ละ segment อย่างน้อย 300-400 pg ขึ้นไป(18) นอกจากนี้ การตรวจหาเชื้อโรตาไวรัสด้วยวิธี enzyme immunoassay (EIA) และ dot blot hybridization ก็ยังมีความไวที่ค่อนข้างต่ำ โดยสามารถตรวจพบเชื้อได้ในสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณไวรัสตั้งแต่ 10^5 อนุภาคขึ้นไป ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น PCR จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า PCR มีความไวในการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสสูงกว่า ELISA 1000 เท่า และสูงกว่า PAGE 10000 เท่า(19)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการทำ agarose gel electrophoresis เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation (20) จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน และใช้เวลาน้อยจนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาในเกือบทุกแห่ง และได้รับการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อใช้ในการ

ตรวจหาการติดเชื้อก่อโรคในผู้ป่วย โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของเชื้อที่ต้องการตรวจ ในขณะที่การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยที่ต้องการแยกว่าเป็นสายพันธุ์ใด ต้องใช้ไพรเมอร์หลายคู่ที่จำเพาะกับแต่ละสายพันธุ์ จึงมีการนำเทคนิค Multiplex PCR มาใช้ โดยการใส่ไพรเมอร์หลายคู่ใน PCR หลอดเดียวกัน เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย

ดังนั้น เพื่อลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัยแยกจีโนไทป์ชนิด G-type ของเชื้อโรตาไวรัส การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาการตรวจหาเชื้อ human rotavirus group A สายพันธุ์ที่พบบ่อยในปัจจุบันด้วยวิธี Multiplex RT-PCR

หลักการของ RT-PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสาย RNA ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย โดย ใช้เอ็นไซม์ Reverse transcriptase และ Reverse primer เปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA จากนั้นจึงใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase ในการสังเคราะห์เพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้ โดยใช้ primers 1 คู่ และสารเคมีดังต่อไปนี้

- DNA Polymerase เช่น Taq polymerase
- PCR buffer
- dNTP ได้แก่ dATP dTTP dCTP dGTP
- Forward primer
- Reverse primer
- Distilled water
- DNA ต้นแบบในการเพิ่มจำนวน

การทำปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน โดยทั้ง 3 ขั้นตอนทำหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

1. denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° C

2. annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 20-25 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบเข้าจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 55-60° C ขึ้นอยู่กับแต่ละ primer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3’ ของ primer ตามลำดับเบสบน DNA ที่เป็นต้นแบบ โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75^{o} C

หลักการของ Multiplex PCR

การใช้ primer ที่จำเพาะในแต่ละยีนที่ต้องการพร้อมกันหลายๆ คู่ ในการทำปฏิกิริยา PCR เดียวกัน โดยมีข้อจำกัด ดังนี้

1. primer ที่ใช้ใน Multiplex PCR ระบบเดียวกัน ต้องไม่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ primer ตัวอื่นๆ โดยเฉพาะด้านปลาย 3’ ซึ่งจะทำให้ primer จับกันเอง ทำให้ความไว (sensitivity) หรือความสามารถในการจับของ primer กับ DNA ต้นแบบลดลง

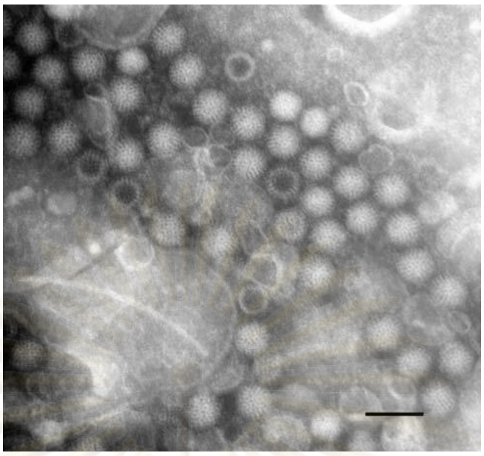
2. primer ทุกตัวควรมีอุณหภูมิสำหรับขั้น annealing ใกล้เคียงกัน

3. PCR product ของ primer แต่ละคู่ต้องมีขนาดที่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เมื่อทำ agarose gel electrophoresis โดยควรมีขนาดต่างกันอย่างน้อย 50 bp หรือมากกว่า

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การค้นพบ

ในสมัยที่เริ่มมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์เข้ามาใช้ การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคหลายชนิดรวมถึงเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงต่างๆจึงได้รับการสนใจ และถูกนำมาศึกษามากขึ้น แต่ในจำนวนนั้น พบว่า มีเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินอาหารบางชนิดที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้(21) จนกระทั่งกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนได้ถูกพัฒนาขึ้น มีรายงานการพบเชื้อโรตาไวรัสครั้งแรกในปี พ.ศ.2506 จากการสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบอนุภาคขนาด 75 nm ในตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากลิงและหนู โดยการค้นพบครั้งนั้นได้อธิบายลักษณะของเชื้อไวรัสที่มีลักษณะคล้ายล้อเกวียน ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ โรตาไวรัส (*Lat. rota* = wheel) หลังจากนั้น ในปี พ.ศ.2516 ได้มีรายงานการพบเชื้อโรตาไวรัสในมนุษย์เป็นครั้งแรก โดย Bishop และคณะได้พบอนุภาคลักษณะเดียวกันในอุจจาระของผู้ป่วยเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วงผ่านการสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน หลังจากนั้น ได้มีรายงานการศึกษาอีกหลายรายงานที่สนับสนุนว่า เชื้อไวรัสดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็ก (2,21)



รูปที่ 2 อนุภาคโรตาไวรัสในตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยมีลักษณะคล้ายล้อเกวียน เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน, calibration bar = 100 nm (21)

อนุกรมวิธาน

โรตาไวรัส ถูกจัดอยู่ใน Family *Reoviridae*, Genus *Rotavirus* ไวรัสก่อโรคในคนในแฟมิลีเดียวกัน ได้แก่ reovirus, bluetongue virus, Colorado tick fever virus (CTFV)

ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัสในแฟมิลีนี้ คือ อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60-80 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็น double stranded RNA (dsRNA) จำนวน 10-12 segments ในแต่ละ segment มี polarity ทั้งบวกและลบ มี icosahedral nucleocapsid ซึ่งมีลักษณะเฉพาะคือ มีแคปซิด 3 ชั้น ไม่มี envelope (2,21)

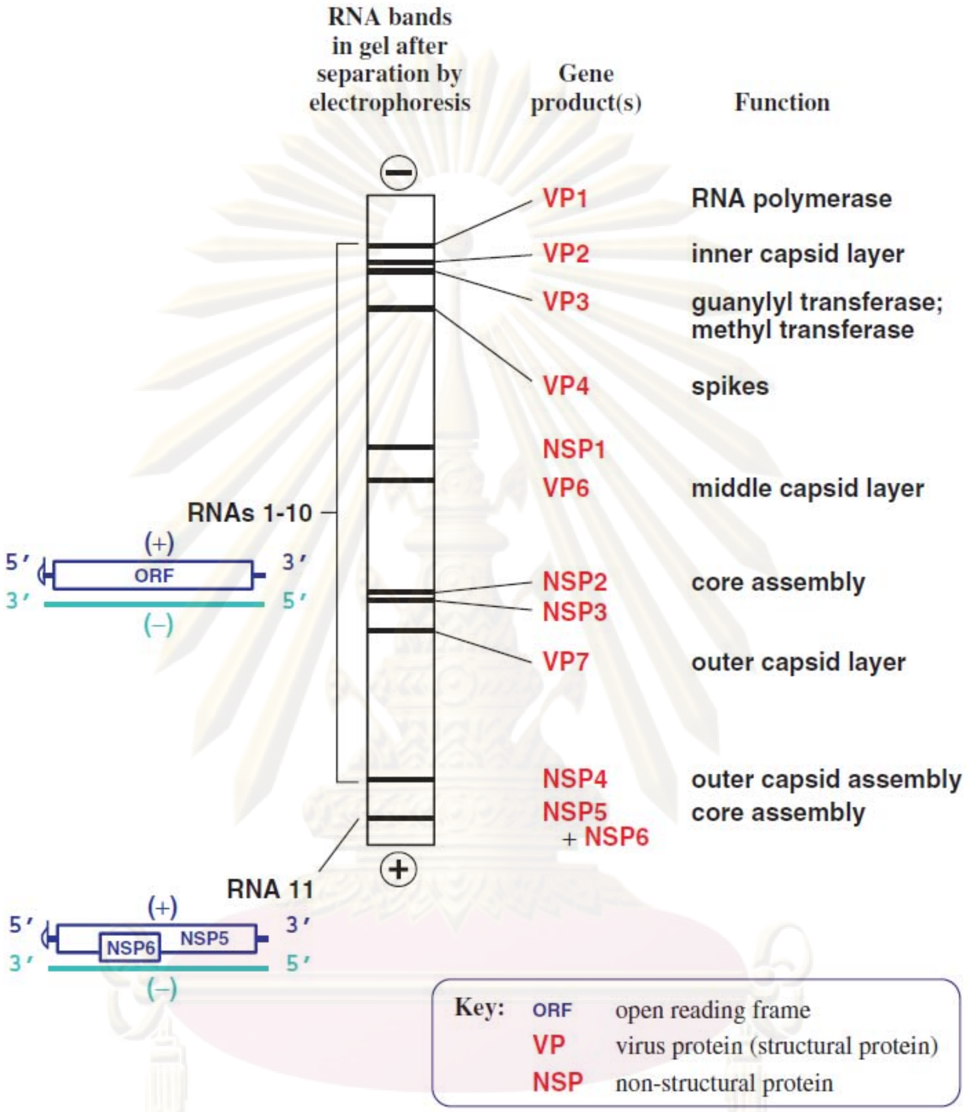
โรตาไวรัส

โรตาไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปีทั่วโลก ซึ่งสามารถนำไปสู่การเสียชีวิตจากภาวะร่างกายขาดน้ำ (dehydration) ในแต่ละปีมีเด็กเสียชีวิตจากการติดเชื้อนี้ประมาณ 527,000 คน โดยผู้ป่วยที่เสียชีวิตส่วนใหญ่อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา

ลักษณะทางชีวโมเลกุลและโครงสร้างของโรตาไวรัส

โรตาไวรัสมีอนุภาคขนาด 65-75 nm ลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ Icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope) ประกอบด้วย capsid 3 ชั้น หุ้มรอบสารพันธุกรรมซึ่งเป็น dsRNA ทั้งหมด 11 segments โดยแต่ละ segment สามารถถอดรหัสได้เป็นโปรตีน 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โปรตีนที่ประกอบเป็นส่วนโครงสร้างของตัวไวรัส หรือ Viral Protein (VP) และโปรตีนที่ทำหน้าที่

เป็นเอนไซม์ และมีความสำคัญในกระบวนการ replication ของไวรัส หรือ Non-Structural Protein (NSP)(22)



รูปที่ 3 ภาพแสดงจีโนมของโรตาไวรัสและผลผลิตโปรตีนที่ได้ ปลาย 5′ ของอาร์เอ็นเอสายบวกของแต่ละยีนทั้ง 11 segments จะถูกแคปเอาไว้ โดยแต่ละยีนจะมีหนึ่ง Open reading frame (ORF) ยกเว้น ยีน segment ที่ 11 จะมีสอง ORF ซึ่งจะถูกอ่านในเฟรมที่ต่างกันได้เป็นโปรตีนสองชนิด ได้แก่ NSP5 และ NSP6 จากภาพเป็น pattern ของ dsRNA segments ทั้ง 11 segments ที่ถูกแยกตามขนาดของแต่ละยีนด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis และผลผลิตโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสของแต่ละ segment (23)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สรุปคุณสมบัติและหน้าที่ของโรตาไวรัสโปรตีน (7,23)

โปรตีน	หน้าที่
VP1	RNA-dependent RNA polymerase; การจับกันของ ssRNA; รวมเป็นเอ็นไซม์คอมเพล็กซ์กับ VP3
VP2	ส่วนโครงสร้างภายในของแคปซิด (core); มีความสำคัญในการกระตุ้น replicase activity ของ VP1
VP3	Guanylyltransferase และ methyltransferase; เป็นส่วนหนึ่งในการรวมตัวเป็น transcription complex กับ VP1
VP4	spike โปรตีนอยู่ในส่วนแคปซิดชั้นนอก; P-type-specific neutralization antigen; haemagglutinin; มีความสำคัญในขั้นตอน cell attachment; ถูกตัดโดยเอ็นไซม์ trypsin เป็น VP8* และ VP5* ช่วยเพิ่มความสามารถในการติดเชื้อ
NSP1	สัมพันธ์กับส่วนโครงสร้าง; สามารถกดการกระตุ้น INF-α ของ host
VP6	ไวรัสโปรตีนหลัก; เป็นโครงสร้างแคปซิดส่วนกลาง; ใช้ในการแบ่ง subgroup; จำเป็นในขั้นตอน transcription
NSP3	Homodimer; จับที่ 3' end ของโรตาไวรัส mRNA;จับกับ elongation factor; มีความสำคัญในขั้นตอนการ translation
NSP2	NTPase และ Helicase; จับกับ NSP5 และ VP1; เป็นส่วนสำคัญในการสังเคราะห์ dsRNA
VP7	ไกลโคโปรตีนในแคปซิดส่วนนอก; G-type neutralization antigen; จับกับแคลเซียมใน RER transmembrane
NSP4	Viral enterotoxin; receptor สำหรับการ budding ของ double layer particle ผ่าน ER membrane; ไกลโคโปรตีน; รักษาระดับแคลเซียมในเซลล์ และในขั้นตอน RNA replication; เป็นผลิตผลที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ที่ติดเชื้อ
NSP5	ทำงานร่วมกับ NSP2 และ NSP6; รวมตัวเป็น homomultimer; O-linked glycosylation; hyperphosphorelated; จับกับ ssRNA; เป็นส่วนประกอบของ viroplasm; มีความสำคัญในกระบวนการ replication
NSP6	เป็นผลิตผลของ second open reading frame ทำงานร่วมกับ NSP5 พบอยู่ภายใน viroplasm

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วงชีวิตของโรตาไวรัส (Replication cycle)(23)

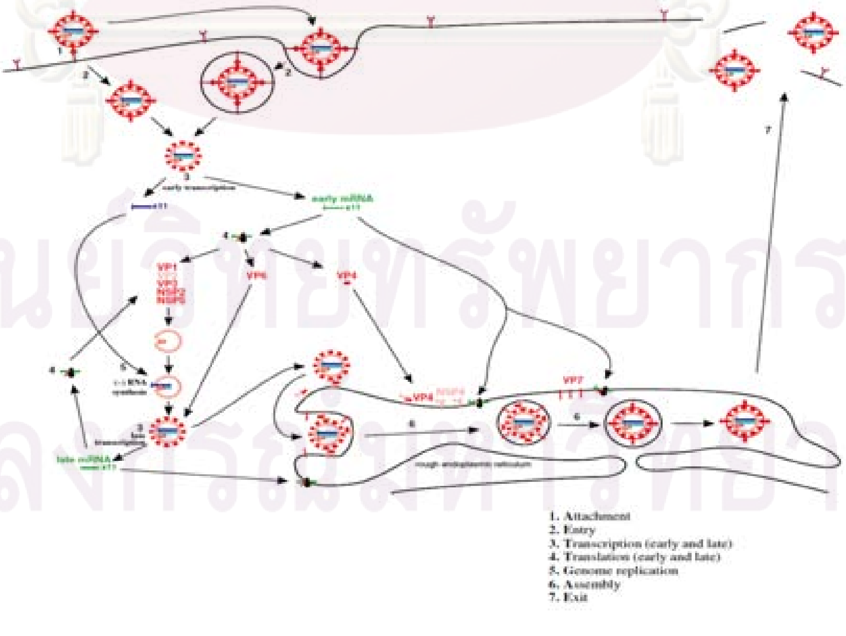
Replication cycle ของเชื้อโรตาไวรัสเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมของ Intestinal epithelial cells (villi) ภายในลำไส้เล็ก โดย เมื่อ Triple layer particles ของโรตาไวรัสเข้าสู่ร่างกายในระบบทางเดินอาหาร ส่วน spike protein(VP4)ของไวรัสจะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน (protease) เช่น trypsin ได้เป็น VP5* และ VP8* ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อ โดย VP5* และ VP7 (outer capsid glycoprotein) จะไปจับกับ integrin ที่อยู่บนผิวของเซลล์เป้าหมาย คือ intestinal epithelial cells (villi) ทำให้เกิด endocytosis นำไวรัสเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ เชื้อไวรัสสามารถ penetrate เข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง โดยอาศัยส่วน hydrophobic region ของ VP5* และจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า หาก VP4 ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ย่อยโปรตีนเป็น VP5* และ VP8* เชื้อไวรัสจะไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งเป็นผลให้ไม่มีการติดเชื้อ

ในขณะที่เชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ส่วนเยื่อหุ้มชั้นนอกจะหลุดออก กลายเป็น double layer particles ซึ่งเป็นผลให้เอ็นไซม์ที่อยู่ภายในอนุภาคของไวรัสเริ่มทำงาน กระตุ้นให้เกิด early transcription โดย VP1 (RNA-dependent RNA polymerase) ทำหน้าที่สังเคราะห์ (+)RNA จากยีนทั้ง 11 segments หลังจากนั้น VP3 จะเข้ามาเติม cap ให้กับ RNA สายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น โดยนิวคลีโอไทด์สำหรับการสังเคราะห์ RNA สายใหม่จะถูกส่งเข้าสู่อนุภาคไวรัสผ่านทาง channels ในส่วนชั้นโปรตีนของ double layer particles และ (+)RNA ที่ได้จากการ transcription จะถูกส่งออกจากอนุภาคไวรัสเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ผ่านทาง channels เดียวกัน โดย (+)RNA ที่ได้นี้ไม่มีสาย poly A ติดอยู่ จากนั้น VP2, VP3 และ NSP5 จะเข้ามาทำหน้าที่ในส่วน post-translation โปรตีนที่ได้จากการ translation จะถูกสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึม บริเวณที่มีโปรตีนของไวรัสสะสมอยู่นี้ เรียกว่า Viroplasm ซึ่งการเกิด viroplasm formation จำเป็นต้องอาศัย NSP2 และ NSP5 เป็นส่วนประกอบสำคัญ

ใน Viroplasm โปรตีน VP1, VP2 และ VP3 จะเข้ามาประกอบกันเป็นส่วน core ของอนุภาคไวรัส (single layer particles) และ (+)RNA สายใหม่จะเข้าสู่ส่วน core ในขั้นตอนนี้ โรตาไวรัสมีกระบวนการในการคัดเลือก และตรวจสอบว่า แต่ละ core ได้รับ (+)RNA ของยีนทั้ง 11 segments ครบหรือไม่ เมื่อ (+)RNA เข้ามาสู่ส่วน core การสังเคราะห์ (-)RNA จะเริ่มขึ้นทันที โดย VP1 ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ RNA polymerase อีกครั้ง เพื่อให้ได้เป็น dsRNA segments จากนั้น VP6 จะถูกเติมเข้าไปยังผิวด้านนอกของ core โดย ประกอบกันเป็นส่วนแคปซิดชั้นที่สอง ทำให้อนุภาคของไวรัสเป็น double layer particles

การ transcription ที่เกิดขึ้นภายใน double layer particles ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้ เรียกว่า late transcription ซึ่งแตกต่างจาก early transcription ตรงที่ (+)RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่จาก double layer particles ตัวใหม่นี้จะไม่ถูก cap ซึ่งในเซลล์ที่ติดเชื้อโรตาไวรัส พบว่ากลไกการ translation ปกติของเซลล์ที่ติดเชื้อเปลี่ยนแปลงไป โดย เซลล์เปลี่ยนไปเลือก translate โปรตีนจาก mRNA ที่ถูก cap มากกว่า mRNA ที่ไม่มีการติด cap เป็นผลให้การสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์หยุดชะงัก ในขณะที่การสังเคราะห์โปรตีนของไวรัสในส่วนของ early transcription ยังดำเนินต่อไป

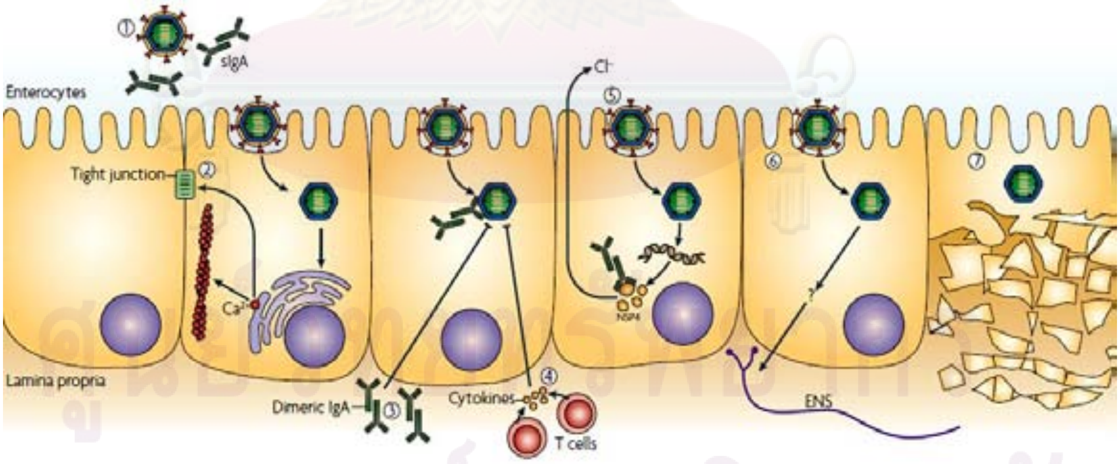
ในระยะสุดท้ายของการรวมตัวเป็นอนุภาคไวรัสเป็นการเติมโปรตีนส่วนแคปซิดชั้นนอก และ spike โปรตีน โดย VP7 และ NSP4 ถูกสังเคราะห์ และ N-glycosylated อยู่บน membrane ของ rough endoplasmic reticulum (RER) ซึ่ง NSP4 จะมีส่วน binding sites ต่อทั้ง VP4 และ double-layers particles หลังการจับกันของส่วนประกอบทั้งสาม อนุภาคไวรัสจะ budding ผ่าน membrane เข้าสู่ vesicle ภายใน endoplasmic reticulum โดย vesicle membrane ที่มี VP7 ฝังอยู่จะประกอบเป็น envelope ชั่วคราวของอนุภาคไวรัส หลังจากนั้น VP7 โมเลกุลจะแตกออก และปล่อยออกมาจาก membrane เพื่อประกอบเป็นส่วนชั้นนอกสุดของอนุภาคไวรัส และ VP4 จะถูกเติมเข้าไปหลังจากนั้น เพื่อประกอบเป็นส่วน spikes ได้เป็น triple layer particles จากนั้น อนุภาคไวรัสจะถูกปล่อยออกจากเซลล์ผ่าน cell lysis หรือ exocytosis ดังสรุปในรูปที่ 4



รูปที่ 4 วงชีวิตของโรตาไวรัส (23)

พยาธิกำเนิดและภูมิคุ้มกัน(7)

กลไกการเกิดโรคจากเชื้อโรตาไวรัสในมนุษย์ยังไม่สามารถเข้าใจได้อย่างแน่ชัด เนื่องจากกลไกการเกิดโรคมีความแปรผันไปตาม species ของสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งผลการทดลองส่วนใหญ่เป็นผลที่ได้จากการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคในสัตว์ฟันแทะ(rodent) โดยพบว่า เมื่อเชื้อโรตาไวรัสเข้าสู่ร่างกาย neutralizing antibodies ต่อ VP4 และ VP7 ของเชื้อไวรัสจะถูกสร้างขึ้นเพื่อป้องกันการติดเชื้อ โดย antibodies นี้จะไปยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส หากเชื้อไวรัสสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันและเข้าสู่เซลล์ได้ การ replication ของไวรัสภายในเซลล์จะส่งผลให้ความสามารถในการดูดซึมน้ำและสารอาหารของเซลล์เสียไป ผู้ป่วยจึงมีภาวะขาดน้ำและสารอาหารร่วมด้วย ยิ่งไปกว่านั้น การเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ในเซลล์ที่ติดเชื้อยังมีผลทำลายโครงสร้างของเซลล์และ tight junction ส่งผลให้ paracellular permeability ของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ในขั้นตอน intracellular replication ของเชื้อไวรัสนี้ พบว่า sIgA ต่อ VP6 และ cytokine ที่สร้างจาก rotavirus-specific T cells สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปเพื่อยับยั้งขั้นตอนนี้ หากไม่สามารถยับยั้ง intracellular replication ของไวรัสได้ NSP4 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น enterotoxin ที่ถูกสร้างขึ้นจะหลั่งออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ และไปจับกับ receptor บนผิวเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียงเกิด cascade signals ชักนำให้เกิดการหลั่ง Cl^{-} ออกจากเซลล์จำนวนมหาศาลเป็นผลให้เกิด diarrhea ตามมา ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า โรตาไวรัสยังสามารถชักนำให้เกิด diarrhea ผ่านการกระตุ้น enteric nerveous system (ENS) ซึ่งรายละเอียดของการเหนี่ยวนำยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด



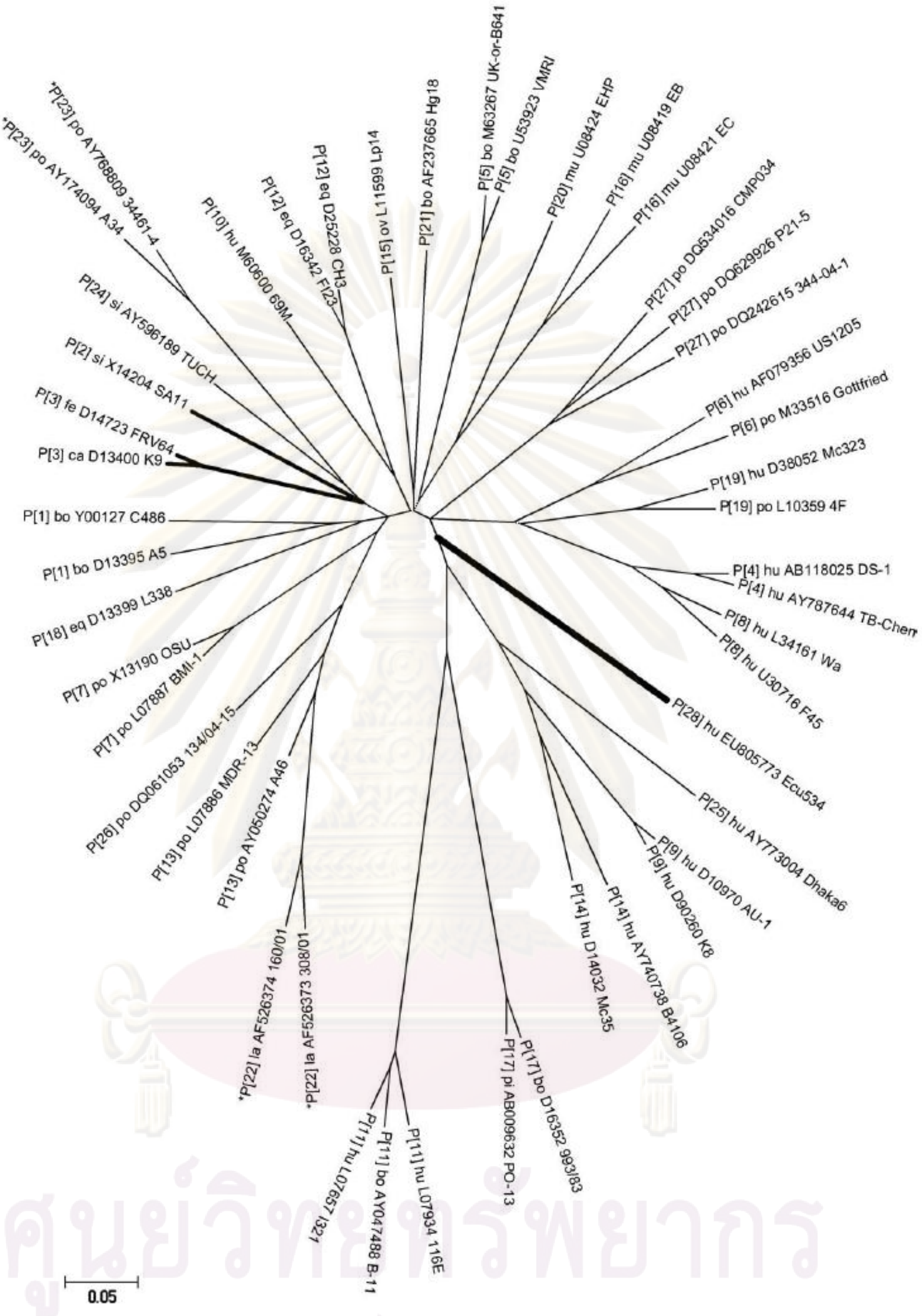
รูปที่ 5 กลไกทางพยาธิกำเนิดของเชื้อโรตาไวรัส (7)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โรตาไวรัสจีโนไทป์

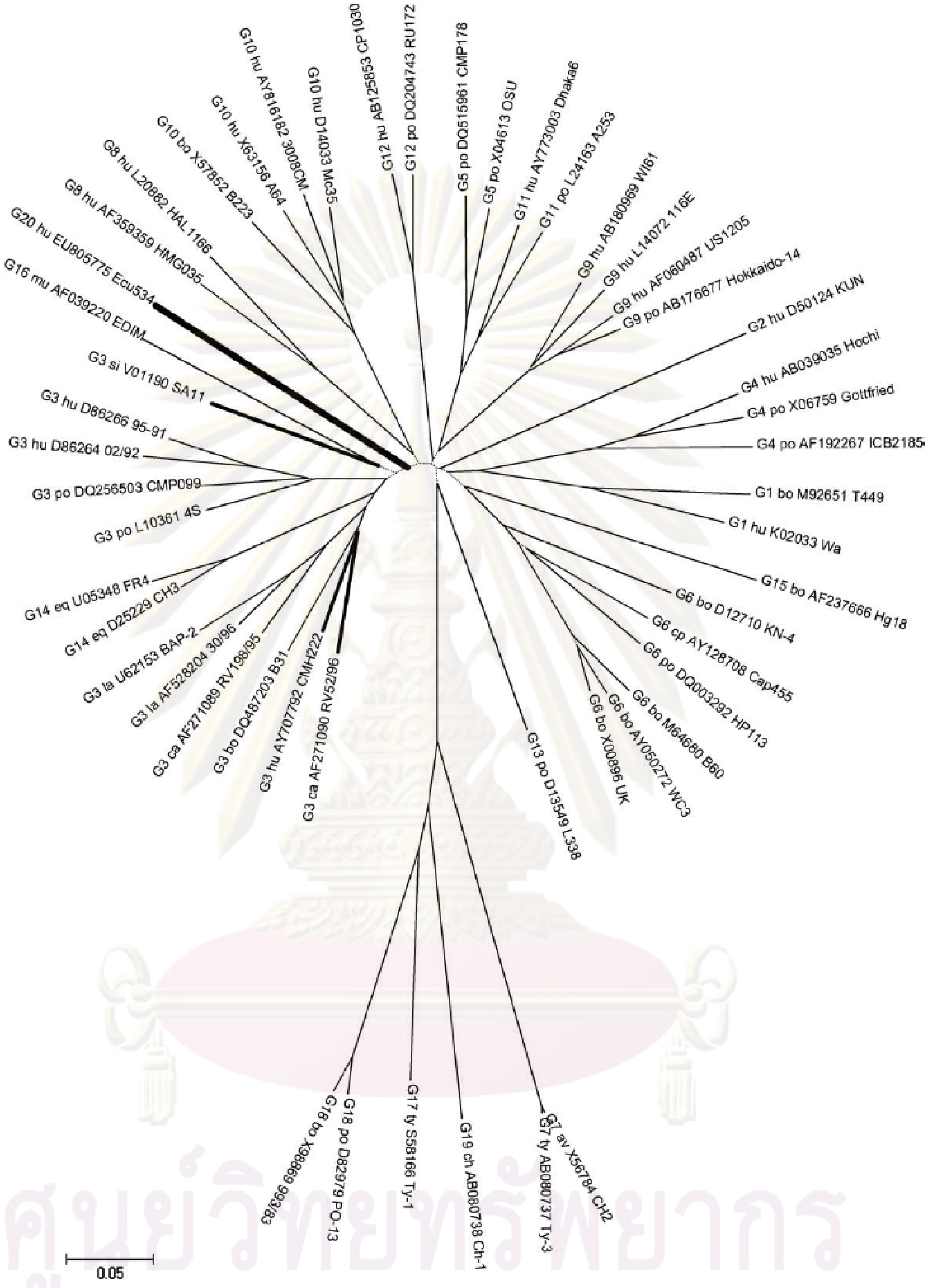
โรตาไวรัสแบ่งตามโปรตีนในส่วนของ middle capsid หรือ VP6 ซึ่งเป็น serogroup antigen ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม (A-G) กลุ่มที่พบมีการติดต่อสู่คน ได้แก่ A, B และ C โดยพบเป็น Group A rotavirus มากที่สุด รองลงมา คือ Group B rotavirus ซึ่งพบว่าสามารถก่อโรคได้ในผู้ใหญ่(22,24) และเนื่องจากโปรตีนในส่วน outer capsid ของโรตาไวรัสมีคุณสมบัติเป็น neutralization antigens การจำแนก serotype ของไวรัสชนิดนี้จึงจำแนกตามโปรตีนในส่วนของ outer capsid ประกอบด้วย VP7 (G-type antigen) ซึ่งเป็น glycoprotein และ VP4 (P-type antigen) ซึ่งเป็น spike protein และมีคุณสมบัติไวต่อเอ็นไซม์ protease การจำแนกชนิดของ rotavirus นั้น ใช้หลัก binary system เช่นเดียวกันกับ influenza virus คือ ควบคู่กันไปทั้ง VP7 และ VP4 เนื่องจาก serotype และ genotype ของ G-type antigen ตามปกติมีลักษณะที่ตรงกันจึงใช้สัญลักษณ์แสดง serotype เพียงอย่างเดียว เช่น G1, G2, G3 แตกต่างจาก P-type antigen ที่ genotype มีความหลากหลายมากกว่า serotype จึงใช้สัญลักษณ์แสดง genotype ซึ่งมีเครื่องหมาย [-] เป็นหลัก เช่น P[4], P[6], P[8] (25) ซึ่งในปัจจุบัน จีโนไทป์ของโรตาไวรัสสามารถจำแนกตามลำดับเบสบน outer capsid VP7 และ VP4 genes ได้เป็น 20 G-genotypes และ 28 P-genotypes ตามลำดับ(6) ดังรูปที่ 6-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 Phylogenetic tree ของโรตาไวรัส P-genotype P[1]-P[28](6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 Phylogenetic tree ของโรตาไวรัส G-genotype G1-G20(6)

คุณสมบัติตามธรรมชาติของโรตาไวรัสที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ โรตาไวรัสต่างสายพันธุ์กันสามารถแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกัน(gene reassortment) เมื่อมีการติดเชื้อภายในเซลล์เดียวกัน(co-infection)ได้(26) จากการศึกษาในอดีตจีโนไทป์ของโรตาไวรัสที่แยกได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผู้ป่วย ได้แก่ G1P[8], G2P[4], G3P[8] และG4P[8] แต่ในปัจจุบันจีโนไทป์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความหลากหลายเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความหลากหลายของ G/P combination ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อโรตาไวรัส

Rotavirus genotype	Possible derivation of human rotavirus strains
G1P[8] G2P[4] G3P[8] G4P[8]	Common human genotypes
G1P[4] G2P[8] G4P[4]	Reassortment among common human genotypes
G1P[9] G4P[6] G9P[8] G12P[8]	Reassortment between animal and human genotypes
G9P[6] G9P[11] G10P[11] G12P[6]	Possible Zoonotic introduction

นอกจากนี้ คุณสมบัตินี้ถูกนำไปใช้ในการพัฒนาและผลิต human-animal reassortant rotavirus vaccine เพื่อนำมาใช้ในการป้องกัน และลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่งวัคซีนที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ monovalent attenuated human rotavirus vaccine เป็น human rotavirus genotype G1P[8] ที่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์และ pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine ซึ่งใช้หลักการ gene reassortment โดยใช้ bovine rotavirus strain WC3 เป็นโครงสร้างและใช้ส่วน neutralization VP4 หรือ VP7 antigens เป็นของ human rotavirus (G1, G2, G3, G4 และ P[8]) จากการศึกษาการระบาดของเชื้อโรตาไวรัสในประเทศบราซิลภายหลังนำวัคซีนชนิด monovalent เข้ามาใช้ พบว่า ผู้ป่วยอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสมีอัตราลดลง แต่มีอัตราการพบเชื้อ genotype G2P[4] ซึ่ง P และ G-genotype ไม่ตรงกับสายพันธุ์วัคซีน (G1P[8]) เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นไปได้ว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภายหลังการนำวัคซีนเข้ามาใช้ อาจส่งผลให้ genotype ของเชื้อโรตาไวรัสที่ระบาดในปัจจุบัน เปลี่ยนแปลงไปเป็นสายพันธุ์ที่หลบหลีกวัคซีนได้เพิ่มขึ้น(27)

การติดต่อ

เชื้อโรตาไวรัสกลุ่มเอ เป็นเชื้อที่พบการติดต่อในคนมากที่สุด สามารถพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ในทุกประเทศทั่วโลกทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว และประเทศที่กำลังพัฒนา โดยการติดเชื้อโรตาไวรัสมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในฤดูหนาว การติดต่อผ่านทาง fecal-oral route โดย เชื้อโรตาไวรัสจะถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระของผู้ป่วย และถ่ายทอดโรคไปยังผู้อื่นโดยการรับประทานเอาเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร หรือน้ำดื่ม เข้าสู่ร่างกาย และเนื่องจาก มีรายงานการพบเชื้อไวรัสในสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงมีผู้สันนิษฐานว่า การติดเชื้ออาจสามารถติดต่อผ่านทางการหายใจ (airborne)ได้ (5)

การติดเชื้อโรตาไวรัสนั้นสามารถพบได้ในทุกช่วงอายุ แต่มักจะไม่แสดงอาการในผู้ใหญ่ ซึ่งอาการติดเชื้ออย่างรุนแรงพบได้ในเด็กอายุ 6 เดือน ถึง 2 ปี และในผู้สูงอายุเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ไม่สมบูรณ์

ลักษณะอาการทางคลินิก

ระยะฟักตัวของโรคอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อโรตาไวรัสใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน หลังได้รับเชื้อ ผู้ป่วยอาจมีไข้ และอาการทางระบบทางเดินหายใจนำมาก่อน และส่วนมากอาการของผู้ป่วยคลื่นไส้ อาเจียน ตามมาด้วยการถ่ายเหลว หรือถ่ายเป็นน้ำ ผู้ป่วยส่วนมากจะมีอาการขาดน้ำร่วมด้วยซึ่งเป็นผลให้เด็กเสียชีวิตในที่สุด โดยทั่วไป อาการของโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสสามารถหายได้เองภายใน 4-7 วัน

การตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อโรตาไวรัส

โรคอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อโรตาไวรัส มีอาการทางคลินิกที่คล้ายกันกับโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อไวรัส และแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ จึงไม่สามารถวินิจฉัยโรคจากอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียวได้ ดังนั้น จึงต้องมีวิธีการตรวจอื่นๆร่วมด้วย ได้แก่

1. การตรวจหาเชื้อหรือแอนติเจนในอุจจาระโดยตรง เป็นวิธีวินิจฉัยโรคที่ได้ผลรวดเร็ว เพราะเชื้อโรตาไวรัสจะถูกขับออกมากับอุจจาระเป็นจำนวนมากใน 2-3 วันแรก สามารถ

ตรวจหาเชื้อในอุจจาระได้ โดย ตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งจากลักษณะรูปร่างที่เป็นเอกลักษณ์ของเชื้อนี้สามารถให้การวินิจฉัยได้อย่างชัดเจน แต่เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก และต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง จึงไม่เป็นที่นิยม วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อโรตาไวรัสในปัจจุบัน เป็นการตรวจหาแอนติเจนด้วยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), reverse passive hemagglutination(RPHA) และ latex agglutination นอกจากนี้ การตรวจลงลึกในระดับอณูชีววิทยาเพื่อหาจีโนมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE), dot hybridization และ reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสได้

2. การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม โดยเจาะเลือด 2 ครั้ง ห่างกัน 2-4 สัปดาห์ โดย ตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิด sIgA, ในสารคัดหลั่ง และในอุจจาระ ด้วยวิธี ELISA และ complement fixation test

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจาก เชื้อโรตาไวรัสที่พบในคนเพาะเลี้ยงได้ยาก จึงไม่นิยมใช้วิธีนี้ในการเพาะเลี้ยงแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

การรักษา

การรักษาโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสไม่มียารักษาที่เฉพาะเจาะจง เป็นเพียงการรักษาตามอาการเพื่อบรรเทาผลกระทบที่เกิดจากภาวะขาดน้ำและขาดสารอาหาร โดยการให้ผู้ป่วยดื่มสารละลายเกลือแร่ทดแทน

การป้องกัน

การป้องกันทำได้โดย รักษาสุขอนามัยส่วนบุคคลเพื่อลดอัตราเสี่ยงของการติดเชื้อ และการให้ oral active immunization เพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่เด็กในช่วงอายุ 2-6 เดือน โดย วัคซีนที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ monovalent attenuated human rotavirus vaccine(Rotarix®, GlaxoSmithKline) และ pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine(RotaTeq®, Merck)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว

ประชากร

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาจากตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่เก็บจากประชากรเด็กไทยอายุตั้งแต่ 1 เดือน จนถึง 10 ปี ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วง จากโรงพยาบาลทั้งหมด 4 แห่ง โรงพยาบาลตัวแทนเขตเมือง 2 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร และโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา และโรงพยาบาลตัวแทนชนบท 2 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และ โรงพยาบาลอุ้มผาง จังหวัดตาก ซึ่งตัวอย่างอุจจาระที่ทางโรงพยาบาลส่งมาเพื่อตรวจบริการหาการติดเชื้อโรตาไวรัสในเด็กถูกเก็บในรูปของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยตัวอย่างดังกล่าวถูกนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ปั่นแยกตะกอน และเก็บสารละลายบัฟเฟอร์ส่วนบนมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งตัวอย่างสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยในช่วงเดือนกรกฎาคม 2550 – พฤษภาคม 2552 ได้ถูกเก็บไว้ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก

<u>การคำนวณขนาดตัวอย่าง</u>

คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้อัตราการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยเด็กที่มาเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วง ดังแสดงในสูตรการคำนวณนี้

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n = \frac{Z^2PQ}{d^2}$$

โดย : Z ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.96

: อัตราการตรวจพบเชื้อ Rotavirus ในประเทศไทย (P) = 0.44

: Q = 1 – P = 0.56

: ค่าความคลาดเคลื่อน (d) = 5% ของอัตราการตรวจพบเชื้อ Rotavirus ในเด็กที่มาพักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$\therefore \quad n = \frac{(1.96)^2(0.44)(1-0.015)}{(0.05*0.015)^2} = 379 \text{ คน}$$

สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดเป็นจำนวน

- โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น	จำนวน	269 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร	จำนวน	236 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา	จำนวน	40 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลอุ้มผาง จังหวัดตาก	จำนวน	12 ตัวอย่าง

รวมทั้งสิ้น 557 ตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดละลายอยู่ในสารละลาย 0.1% Phosphate buffered saline (PBS) ซึ่งถูกนำมาปั่นแยก และเก็บรักษาสารละลายส่วนบนไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถูกนำมาใช้ในการตรวจแยกจีโนไทป์ของเชื้อโรตาไวรัส โดยพิจารณาจากลำดับเบสในส่วนของ VP4 และ VP7 gene

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1 .เครื่องมือ

1.1 Pipet tip: 10 µl, 200 µl และ 1,000 µl (Elkay, Ireland)

1.2 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)

1.3 Polypropylene conical tube:15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)

1.4 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500ml, 1000 ml (Pyrex ,USA)

1.5 Flask: 250 ml, 500 ml , 1000ml (Pyrex,USA)

1.6 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran,USA)

1.7 Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.8 Pipette rack (Eppendorf, Germany)

1.9 Thermometer (Precision, Germany)

1.10 Parafilm (American Nation Can,USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.11 Plastic wrap

1.12 Stirring-magnetic bar

1.13 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

2. อุปกรณ์

2.1 Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (5-20 µl), P100 (20-100 µl), P1000 (100-1,000 µl) (Eppendorf, Germany)

2.2 Vortex mixer (Scientific industry, USA)

2.3 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)

2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

2.5 Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)

2.6 Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)

2.7 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)

2.8 Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany)

2.9 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

2.10 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)

2.11 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)

2.12 Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)

2.13 Freezer-20°C (Sanyo, Japan)

2.14 Freezer–70°C (Forma Scientific, USA)

2.15 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

2.16 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

2.17 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.สารเคมีทั่วไป

1.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)

1.2 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)

1.3 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 Sucrose (USB, Hongkong)

1.5 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)

2.สารเคมีสำหรับการสกัด RNA (RNA EXTRACTION)

2.1 Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)

2.2 Guadinine thiocyanate

2.3 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

2.4 Glycogen (USB, Ohio)

2.5 Isopropanal (Sigma, Singapore)

2.6 Sodium acetate (Sigma, Singapore)

2.7 Phenol (Pierce, USA)

2.8 Chloroform (Sigma, Singapore)

3.สารเคมีสำหรับการทำ PCR

3.1 Superscript™ III platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, CA, USA)

4.สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

4.1 HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

4.2 Isopropanal (Sigma, Singapore)

5.สารเคมีสำหรับการทำโคลนนิ่ง

5.1 Amplicillin (Phamacia, Hong kong)

5.2 Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside: IPTG (Bio Basic, Germany)

5.3 Magnesium sulfate (Sigma, Singapore)

5.4 Sodium chloride (Sigma, Singapore)

5.5 Tryptone (Giboco BRL, USA)

5.6 Yeast extract (Giboco BRL, USA)

5.7 5-bromo-4-chloro-3-inodlyl-β-D-galactopyranoside:X-gal (Bio Basic, Germany)

5.8 pGEM-T Easy Vector System I (Promega, USA)

5.9 Glucose (Giboco BRL, USA)

6.สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด

6.1 HiYield^{TM} Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

7.สารเคมีสำหรับทำ In vitro transcription

7.1 RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA)

7.2 RNA polymerase T7 (Roche, USA)

7.3 RNA polymerase SP6 (Roche, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. **การสกัด** RNA (RNA extraction) **จากตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี** Guanidium-isothiocyanate method

Positive control

ได้ตัวอย่างจากสารละลายอุจจาระของผู้ป่วย และได้รับการตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อโรตาไวรัส

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างสารละลายอุจจาระ 150 µl

↓

เติม Guadinine thiocyanate (GTC+2 ME) 500µl/ Tube

(GTC 9000 µl: 2 ME 70 µl)

↓

Mix โดยการ invert นาน 15 วินาที แล้วนำไป vortex นาน 15 วินาที

↓

เติม 2M Sodium Acetate 50 µl

Phenol 500 µl, $CHCl_3$: IAA (49:1) 100 µl

↓

Mix โดย invert 10 วินาที, vortex นาน 15 วินาที

↓

บ่มทิ้งไว้ที่ -20 $^{\circ}C$, 15 นาที

↓

Centrifuge 13,500 rpm, อุณหภูมิ 4$^{\circ}C$ 30 นาที

↓

เตรียม tube ใหม่ ขนาด 1.5 ml ใส่ Glycogen 4 µl

↓

แล้วนำส่วนใสด้านบนที่ได้จากการ centrifuge มาใส่ Tube ที่เตรียมไว้

↓

เติม Isopropanol 600 µl

↓

Mix โดยการ invert, incubate over night -20 $^{\circ}C$

หรือ ที่ -70 $^{\circ}C$, 1 ชั่วโมง

↓

Centrifuge 13,500 rpm, อุณหภูมิ 4$^{\circ}C$ 30 นาที

↓

เทสารละลายออกให้เหลือเฉพาะ pellet

↓

ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol 500 µl

Mix โดยการ invert

↓

Centrifuge 13,500 rpm , 2 นาที

↓

เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง และดูด 70% EtOH ออกเหลือแต่ pellet

↓

ทำให้ pellet แห้ง ด้วยระบบสุญญากาศนาน 5 นาที

↓

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 12 µl (DEPC)

↓

เก็บที่อุณหภูมิ -70$^{\circ}C$

เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความชุก และการพัฒนา multiplex RT-PCR ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาความชุกของ Rotavirus

Positive control

ได้ตัวอย่างจากสารละลายอุจจาระของผู้ป่วย และได้รับการตรวจด้วยวิธี PCR พบเชื้อโรตาไวรัส

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ Rotavirus ส่วน VP4 และ VP7 gene ด้วยวิธี 1 step Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)(17)

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR

Gene	Primers	Type	Sequence (5’---> 3’)	Product size
VP4	CON3_F	Forward	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	876 bp
	CON2_R	Reverse	ATTTCGGACCATTTATAACC	
VP7	BEG9_F	Forward	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1062 bp
	END9_R	Reverse	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	

ปิเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ RT-PCR ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน VP4 และ VP7 gene ของ Rotavirus

สารเคมี	ปริมาตร(volume/tube)
Distilled water	12 µl
2x Reaction Mix buffer	10 µl
Enzyme mix (SuperScript^{TM} + *Taq*)	0.3 µl
Forward primer	0.5 µl
Reverse primer	0.5 µl
RNA template	1 µl
Total volume	24.3 µl

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ RT-PCR ของ Rotavirus ในส่วน VP4 และ VP7 gene

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)		เวลา (นาที)	
	VP4 gene	VP7 gene		
Reverse transcription	50	50	30	
Pre-denaturation	95	95	2	
Denaturation	94	94	1	ทำซ้ำ 40 รอบ
Annealing	50	55	1	
Extention	72	72	1.30	
Post extention	72	72	10	

2.2 **การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์** (DNA sequencing)

- หาขนาด PCR Product ที่ต้องการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose gel ในการแยกขนาดของ PCR Product ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ เพื่อตรวจสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนาดของ cDNA ที่ต้องการ และย้อมดูแถบ cDNA ที่ต้องการด้วยสารละลาย Ethidium bromide นาน 15 นาที

- ตัด gel โดยเลือกตัดในตำแหน่งที่มีแถบ PCR Product ขนาดที่ต้องการ ดังนี้
  - VP4 gene ได้ PCR Product ขนาด 876 bp
  - VP7 gene ได้ PCR Product ขนาด 1062 bp
- สกัด PCR Product จาก gel ที่ตัดออกมาให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit
- หาลำดับเบสโดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD (Malaysia)

ทำการอ่านผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

2.3 **การวิเคราะห์ข้อมูล** (Data analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม

- Clustal X เพื่อทำการเปรียบเทียบ sequence ที่เราได้มาจากการทำ DNA sequencing กับ sequence ที่เป็นตัวอ้างอิง (references)
- Chromas เป็นโปรแกรมที่ใช้ดู chromagram ที่ได้จากการทำ sequencing
- Oligos เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับ sequence ที่เกิดจากการใช้ reverse primer
- Bioedit เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบ primers
- MEGA เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree
- Seqman เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการประกอบสายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมากกว่า 1 สายเข้าด้วยกัน

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ VP4 และ VP7

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast

- ทำการจำแนก genotype โดยการ เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของโรตาไวรัสแต่ละ genotype ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และ โปรแกรม MEGA version 4.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ทำการเปรียบเทียบความเหมือน หรือ ความต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ

กรดอะมิโน ด้วยวิธี Cluster Analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X Version 1.83 และ BioEdit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรตาไวรัสที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

- สร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรตาไวรัสที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

2.4 เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ Program Sequin version 7.25 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3. **พัฒนาการตรวจ** common G-genotype **ด้วย** 1 step multiplex RT-PCR

Positive control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ พลาสมิด จากการ cloning ชิ้นส่วนของยีน VP4 และ VP7 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัสจากผู้ป่วยเด็กที่ตรวจพบว่า ติดเชื้อโรตาไวรัส G–genotype สายพันธุ์ G1 G2 และ G9

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ RNA ที่ใช้ในการทดลอง

การออกแบบ primer

ทำการดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรตาไวรัส VP7 gene จีโนไทป์ G1 – G15 ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) จากนั้นใช้โปรแกรม Clustal X Version 1.83 ในการเปรียบเทียบหาส่วนเหมือนของลำดับเบส (conserve region) เพื่อเลือกใช้ในการออกแบบ primer โดย primer ที่ใช้ในระบบเดียวกัน ต้องให้ PCR product ที่มีขนาดต่างกันมากกว่า 50 bp เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างชัดเจน เมื่อทำ agarose gel electrophoresis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 **เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ** Rotavirus **ด้วย** multiplex RT-PCR

ตารางที่ 6 แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ Multiplex RT-PCR

Gene	Primers	Type	Sequence (5'---> 3')
Above	VP7F1_1-23	Forward	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCG
G1	VP7G1R2_620-597	Reverse	GATATCCACTTATTTGATTCTCCC
G2	VP7G2R1_340-317	Reverse	TGCGATAGAGTATTTTCCCATTC
G9	VP7G9R1 _480-457	Reverse	CTAGCTCTAACGTTGAATCATAC
VP4	CON3_F	Forward	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA
	CON2_R	Reverse	ATTTCGGACCATTTATAACC

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมสารเคมีในปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR ในส่วน Rotavirus VP7 gene

สารเคมี	ปริมาตร(volume/tube)
Distilled water	10 µl
2x Reaction Mix buffer	10 µl
Enzyme mix (SuperScript™ + *Taq*)	0.3 µl
Mg2+	0.25 µl
dNTP	0.25 µl
Primers	
VP7F1_1-23	1.0 µl
VP7G1R2_620-597	0.5 µl
VP7G2R1_340-317	0.5 µl
VP7G9R1_480-457	0.5 µl
CON3_F	0.5 µl
CON2_R	0.5 µl
RNA template	2 µl
Total volume	26.8 µl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Multiplex RT-PCR ของ Rotavirus ในส่วน VP7 gene

PCR cycle	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
Reverse transcription	50	30	
Pre-denaturation	95	2	
Denaturation	94	1	ทำซ้ำ 45 รอบ
Annealing	52	1	
Extention	72	1.30	
Post-extention	72	10	

3.2 การ Cloning เพื่อใช้เป็น Positive Control ในการพัฒนา multiplex RT-PCR

นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์ และทราบ G genotype จากการศึกษาความชุกแล้วมาทำการเชื่อมต่อกับ vector โดยใช้ pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) โดยผสมสารดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับ vector โดยใช้ pGEM®-T Easy Vector System I

สารเคมี	ปริมาตร(volume/tube)
pGEM®-T Easy Vector	1 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
2x Rapid Ligation Buffer,	5 μl
Purified PCR Product	3 μl
total	10 μl

นำส่วนผสมที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการ transform เข้าสู่ competent cell (E.coli strain DH5-α) และทำการคัดเลือก clone ดังนี้

นำ competent cell 50 μl ผสมกับ vector ที่ผ่านการ ligate แล้ว 5 μl

↓

Incubate ในน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำมา incubate ที่อุณหภูมิ 42°C 40-50 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งอีก 2 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

↓

เติม soc media 950 µl นำไป incubate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง 30 นาที

↓

นำมา spread ลงใน LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plate โดยใช้ปริมาณ 100 µl

↓

Incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

หลังจาก Incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ครบเวลาจะพบโคโลนีสีขาว และ สีฟ้า เลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงต่อใน LB broth/ampicillin จากนั้น Incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการสกัด plasmid ด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR และส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (DNA sequencing)

3.3 การทำ *In vitro* transcription เปลี่ยน DNA เป็น RNA เพื่อใช้ในการทดสอบความไว

นำ plasmid ที่ได้จากการ cloning มาเพิ่มจำนวน DNA ด้วย primer M13 จากนั้นทำการสกัด PCR Product จาก gel ที่ตัดออกมาให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) จากนั้นนำมาทำ *In vitro* transcription เปลี่ยน DNA เป็น RNA โดย แยกเป็น 2 ชุด ใช้ RNA polymerase T7 (Roche) ในการสร้าง RNA สายลบ และ RNA polymerase SP6 (Roche) ในการสร้าง RNA สายบวก ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ *In vitro* transcription

สารเคมี	ปริมาตร(volume/tube)
5x transcription buffer	4 µl
ATP	1.5 µl
GTP	1.5 µl
CTP	1.5 µl
UTP	1.5 µl
Enzyme Mix T7 or SP6	2 µl
Nuclease Free water	7 µl
PCR-M13 product	1 µl
total	20 µl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำส่วนผสมที่ได้ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการย่อย DNA จาก PCR product ที่เหลือ ด้วย RQ1 RNase-Free DNase (Promega) จากนั้น incubate ต่อที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจการย่อย DNA ว่าสมบูรณ์หรือไม่ โดยทำ PCR ด้วย primer M13 จากนั้นสกัด RNA ที่ได้ ด้วยวิธี Guanidium-isothiocyanate method

การทดสอบความไว (Sensitivity)

1. นำ RNA ที่สกัดได้จากการทำ *In vitro* transcription มาทำการวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer
2. นำค่า OD ที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณ RNA เป็น copies/µl

ตามสูตรดังนี้

$$\text{Copies number (copies/µl)} = \frac{X \text{ g/µl DNA} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{RNA length (bp)} \times 340}$$

X = ปริมาณ RNA ที่อ่านได้จากการวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (g/µl)

3. ทำการจำลองรูปแบบ dsRNA โดยนำ RNA สายบวก และ RNA สายลบที่ได้จากการทำ *In vitro* transcription ที่ dilute ให้มีความเข้มข้นจำนวน copies/µl เท่ากันแล้ว มาใส่รวมกันใน microtube จากนั้น incubate ที่ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที (annealing)
4. ทำการ dilute dsRNA ให้มีความเข้มข้นเป็น 10^{10} copies/µl

ตามสูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นของ RNA เริ่มต้น (µg/µl)

V_1 = ปริมาตรของ RNA เริ่มต้น (µl)

C_2 = ความเข้มข้นของ RNA ที่ต้องการ (µg/µl)

V_2 = ปริมาตรของ RNA ที่ต้องการ (µl)

5. จากนั้นทำ serial dilution จากปริมาณ RNA เป็น 10^{10} copies/µl จนถึง 10^{1}copies/µl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. นำ RNA ทุกๆ ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{10} copies/µl จนถึง 10^{1} copies/µl มาทำ multiplex PCR โดยใส่เป็น RNA template ในการทำ multiplex PCR ปริมาณ 1 µl แล้วทำการเปรียบเทียบว่าความเข้มข้นของ RNA ที่น้อยที่สุดที่ PCR สามารถเพิ่มจำนวนได้มีค่าเท่าใด

3.4 **การทดสอบความจำเพาะ** (Specificity)

หลังจากได้ระบบ multiplex PCR ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน RNA ทุกยีนแล้ว จากนั้นจึงนำมาทดสอบว่ามีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการเท่านั้น โดยสกัด DNA/RNA ของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในเด็กที่พบในห้องปฏิบัติการศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ได้แก่ Adenovirus, Human Bocavirus และ Astrovirus

3.5 **วิเคราะห์ผลการวินิจฉัยด้วย** multiplex RT-PCR **เปรียบเทียบกับผลในขั้นตอนการศึกษาความชุก**

เลือกตัวอย่างที่พบเชื้อโรตาไวรัสที่ทราบ G-genotype จากขั้นตอนการศึกษาความชุกมาทำการทดสอบ หาขนาด PCR Product ที่ต้องการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose gel ในการแยกขนาดของ PCR Product และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของ cDNA ที่ต้องการ และย้อมดูแถบ cDNA ที่ต้องการด้วย Ethidium bromide แปลผล G-genotype ตามขนาดของ PCR Product ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงการแปลผล G-genotype ในการทำ Multiplex RT-PCR ของ Rotavirus VP7 gene

Product size	Rotavirus	G1	G2	G9	Negative
876 bp	+	+	+	+	
620 bp		+			
480 bp				+	
340 bp			+		

ในกรณีที่ Rotavirus VP7 gene ให้ผลบวก แต่ไม่สามารถแยก G-genotype ได้จะทำการทดสอบ ด้วยวิธี RT-PCR ในขั้นตอนการศึกษาความชุกเพื่อศึกษาในระดับอณูชีวโมเลกุลต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาความชุกของ Rotavirus

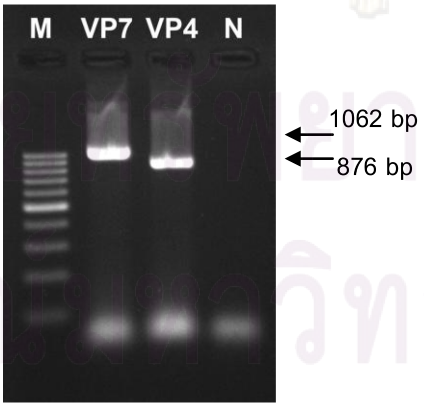
จากการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลทั้ง 4 แห่ง ทั้งหมด 557 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างจาก

- โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น 269 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 236 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 40 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลอุ้มผาง จังหวัดตาก 12 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้

1.1. ผลการตรวจเชื้อโรตาไวรัสในอุจจาระที่เก็บได้จากผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลรวมสี่จังหวัด

จากการทำ PCR ในส่วนของ VP4 และ VP7 gene ด้วย วิธี 1 step RT-PCR โดยใช้ primer Con2, Con3 ในการเพิ่มจำนวน VP4 gene และ primer Beg9, End9 ในการเพิ่มจำนวน VP7 gene เพื่อหาการติดเชื้อโรตาไวรัสได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 1062 bp และ 876 bp ตามลำดับ



รูปที่ 8 แสดงขนาดของผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอ (RNA amplification) ของโรตาไวรัสในส่วนของ VP7 และ VP4 gene, N คือ negative control

จากการตรวจสอบด้วยวิธี 1 step RT-PCR เพิ่มจำนวน VP4 และ VP7 gene จากตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด ได้ผลบวกต่อเชื้อโรตาไวรัส 158 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.37% ดังตารางที่ 12

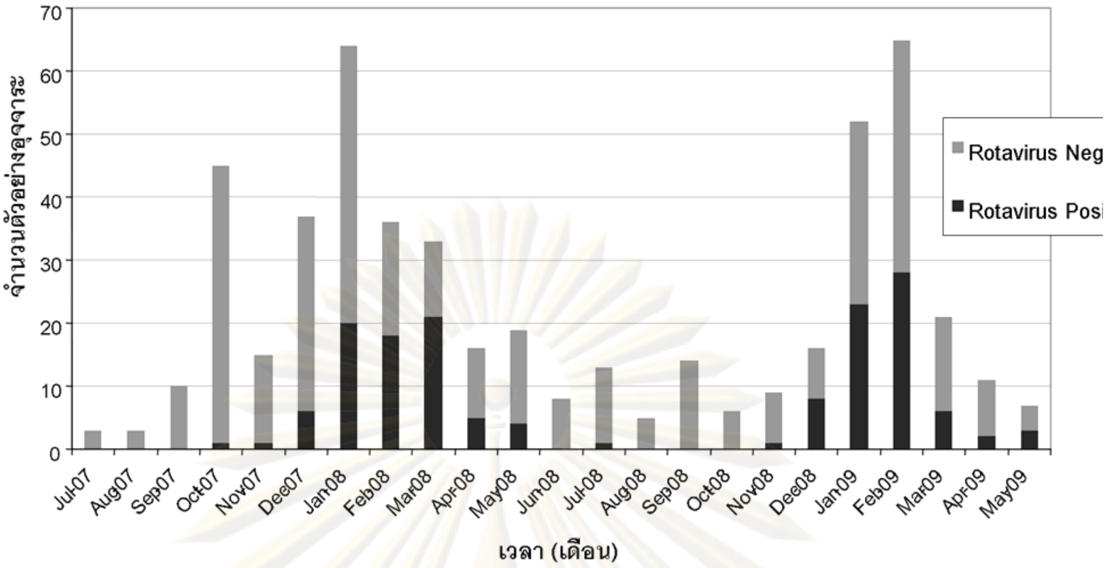
ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสจากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยเด็กที่เข้าพักรักษาตัวด้วยอาการอุจจาระร่วงในโรงพยาบาลแต่ละจังหวัด

จังหวัด	**จำนวนสิ่งส่งตรวจ**	**จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ** PCR	%
กรุงเทพมหานคร	236	52	22.03
ขอนแก่น	269	81	30.11
นครราชสีมา	40	15	37.50
ตาก	12	10	83.33
รวม	557	158	28.37

จากตารางที่ 12 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 158 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างได้ทำการใส่ Code ด้วย รหัสตัวอย่าง ตามด้วย รหัสจังหวัดและปี ค.ศ.ที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก ข

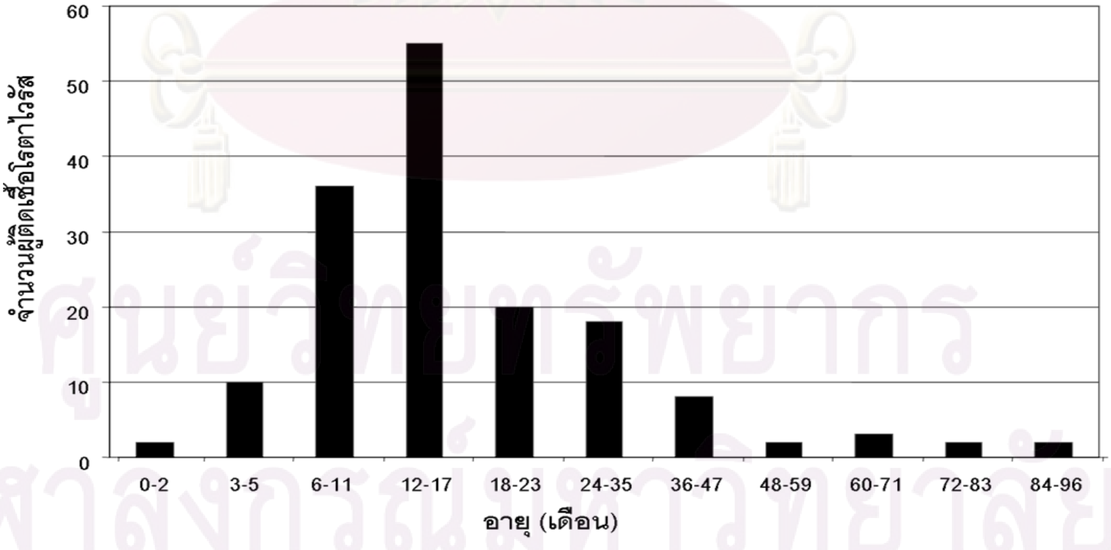
จากการวิเคราะห์ข้อมูลการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสแยกตามระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างรวมทั้งสี่โรงพยาบาลตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2550 ถึง พฤษภาคม 2552 พบว่า มีการพบเชื้อโรตาไวรัสเพิ่มสูงขึ้นระหว่างเดือนมกราคม ถึง มีนาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาวของประเทศไทย ดังรูปที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อโรตาไวรัสที่พบในแต่ละเดือนรวมสี่จังหวัดตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2550 ถึง พฤษภาคม 2552

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสในแต่ละช่วงอายุของผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลทั้งสี่แห่งตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 10 ปี ในการศึกษานี้ พบว่า อายุน้อยที่สุดที่ตรวจพบเชื้อ คือ 1 เดือน และอายุมากที่สุด คือ 8 ปี โดยช่วงอายุระหว่าง 12-17 เดือน เป็นช่วงอายุที่มีการตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสมากที่สุด คิดเป็น 34.81% (55/158) ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 กราฟแท่งแสดงจำนวนการพบเชื้อโรตาไวรัสในแต่ละช่วงอายุของผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลรวมสี่จังหวัด

1.2. ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อแยกจีโนไทป์

จากการนำนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ VP4 และ VP7 gene ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรตาไวรัสกลุ่มเอทุกตัวอย่าง ดังรูปที่ 11-12

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ713738.1	Human rotavirus A strain JP-8056 truncated outer capsid protein VP	698	698	99%	0.0	98%
FJ713732.1	Human rotavirus A strain JP-8053 truncated outer capsid protein VP	698	698	99%	0.0	98%
FJ713722.1	Human rotavirus A strain JP-8012 truncated outer capsid protein VP	698	698	99%	0.0	98%
EU045226.1	Human rotavirus A strain Pv00469 outer capsid protein VP4 (VP4) g	698	698	99%	0.0	98%
EF077342.1	Human rotavirus A clone KMR058 VP4 mRNA, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
AY629561.1	Human rotavirus A isolate 3084375 outer capsid protein VP8* gene,	698	698	99%	0.0	98%
AJ605318.1	Human rotavirus A partial VP4 gene for outer capsid protein VP4, ge	698	698	99%	0.0	98%
AJ605313.1	Human rotavirus A partial VP4 gene for outer capsid protein VP4, ge	698	698	99%	0.0	98%
AJ605312.1	Human rotavirus A partial VP4 gene for outer capsid protein VP4, ge	698	698	99%	0.0	98%
DQ236011.1	Rotavirus A isolate CU92P8 VP4 (VP4) gene, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
DQ235978.1	Rotavirus A isolate CU90P8 VP4 (VP4) gene, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
DQ235968.1	Rotavirus A isolate CU79P8 VP4 (VP4) gene, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
DQ235967.1	Rotavirus A isolate CU65P8 VP4 (VP4) gene, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
DQ235965.1	Rotavirus A isolate CU106P8 VP4 (VP4) gene, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
DQ235955.1	Rotavirus A isolate CU132P8 VP4 (VP4) gene, partial cds	698	698	99%	0.0	98%
AM397930.1	Human rotavirus P[8]G12 partial VP4 gene for outer capsid spike pr	689	689	98%	0.0	98%
GQ117010.1	Human rotavirus A isolate Nov08-3404 outer capsid protein VP4 (VF	692	692	99%	0.0	98%
GQ117008.1	Human rotavirus A isolate Nov08-3281 outer capsid protein VP4 (VF	692	692	99%	0.0	98%
FJ915096.1	Human rotavirus A isolate Nov08-3123 outer capsid protein VP4 (VF	692	692	99%	0.0	98%
FJ713740.1	Human rotavirus A strain JP-8048 outer capsid protein VP4 gene, pa	692	692	99%	0.0	98%
FJ713734.1	Human rotavirus A strain JP-8036 outer capsid protein VP4 gene, pa	692	692	99%	0.0	98%

รูปที่ **11** แสดงตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP4 gene ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Human rotavirus A ส่วน VP4 gene

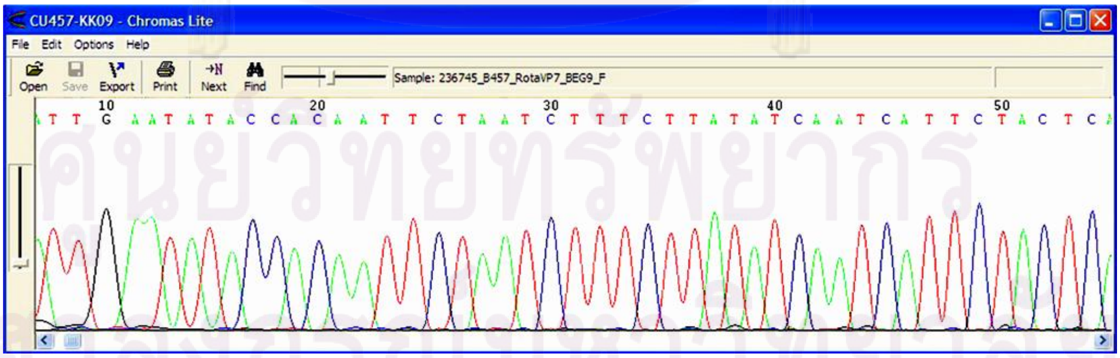
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU708570.1	Human rotavirus G1 strain E050 outer capsid protein VP7 mRNA, co	817	817	88%	0.0	95%
EU708572.1	Human rotavirus G1 strain Z678 outer capsid protein VP7 mRNA, co	812	812	88%	0.0	95%
EU679392.1	Human rotavirus A isolate CAU 164 VP7 gene, complete cds	812	812	88%	0.0	95%
EU708571.1	Human rotavirus G1 strain R833 outer capsid protein VP7 mRNA, co	806	806	88%	0.0	95%
DQ512998.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-87 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
DQ512997.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-84 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
DQ512995.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-78 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
DQ512994.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-77 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
DQ512993.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-75 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
DQ512992.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-74 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
DQ512991.1	Human rotavirus G1 isolate Chi-73 outer capsid protein VP7 gene, c	800	800	88%	0.0	95%
AF260943.1	Human rotavirus strain 97'H9 outer capsid protein VP7 gene, compl	800	800	88%	0.0	95%
DQ512989.1	Human rotavirus G1 isolate J-4825 outer capsid protein VP7 gene, c	794	794	88%	0.0	94%
DQ512987.1	Human rotavirus G1 isolate J-4692 outer capsid protein VP7 gene, c	794	794	88%	0.0	94%
DQ512986.1	Human rotavirus G1 isolate J-4689 outer capsid protein VP7 gene, c	794	794	88%	0.0	94%
DQ512985.1	Human rotavirus G1 isolate J-4688 outer capsid protein VP7 gene, c	794	794	88%	0.0	94%
DQ512983.1	Human rotavirus G1 isolate J-4576 outer capsid protein VP7 gene, c	794	794	88%	0.0	94%
AF260950.1	Human rotavirus A strain 98'SH53 outer capsid protein VP7 gene, co	794	794	88%	0.0	94%
AF260952.1	Human rotavirus A strain 97'SZ29 outer capsid protein VP7 gene, co	794	794	88%	0.0	94%
AF260947.1	Human rotavirus strain 97'S45 outer capsid protein VP7 gene, comp	794	794	88%	0.0	94%
AF260941.1	Human rotavirus strain 98'G10 outer capsid protein VP7 gene, comp	794	794	88%	0.0	94%

รูปที่ 12 แสดงตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 gene ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูป

พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Human rotavirus A ส่วน VP7 gene

```
>gb|AF183848.1|  Human rotavirus A strain CH9 VP7 protein (VP7) gene, complete
cds
Length=1007

 Score =  811 bits (439),  Expect = 0.0
 Identities = 459/469 (97%), Gaps = 0/469 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  2    ATGGTATTGAATATACCACAATTCTAATCTTTCTTATATCAATCATTCTACTCAACTATA  61
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  25   ATGGTATTGAATATACCACAATTCTAATCTTTCTGATATCAATCATTCTACTCAACTATA  84

Query  62   TATTGAAATCAGTGACTCGAATAATGGACTACATTATATATAGATTTTTGTTAATTTCTG  121
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  85   TATTAAAATCAGTGACTCGAATAATGGACTACATTATATATAGATTTTTGTTAATTTCTG  144

Query  122  TAGCATTATTTGCTTTGACTAAAGCTCAGAACTATGGACTCAATATACCAATAACAGGAT  181
            ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct  145  TAGCATTATTTGCCTTGACTAAAGCTCAGAACTATGGACTTAATATACCAATAACAGGAT  204

Query  182  CAATGGATACTGTATACTCCAACTCTACTCAAGAAGGAATATTTCTAATATCCACATTAT  241
            |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| |||||||||||
Sbjct  205  CAATGGATACTGTATACTCCAACTCTACTCGAGAAGGAATATTTCTAACATCCACATTAT  264

Query  242  GTTTGTATTATCCAACTGAAGCAAGTACTCAAATCAGTGATGGTGAATGGAAAGACTCAT  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  265  GTTTGTATTATCCAACTGAAGCAAGTACTCAAATCAGTGATGGTGAATGGAAAGACTCAT  324

Query  302  TATCACAAATGTTTCTTACAAAAGGTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTATT  361
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  325  TATCGCAAATGTTTCTTACAAAAGGTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTATT  384

Query  362  CAAACATCGTTGATTTTTCCGTTGACCCACAATTATATTGTGATTATAACTTAGTACTAA  421
            |||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  385  CAAATATTGTTGATTTTTCCGTTGACCCACAATTATATTGTGATTATAACTTAGTACTAA  444

Query  422  TGAAGTATGATCAAAATCTTGAATTAGATATGTCAGAGTTAGCTGATTT  470
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||
Sbjct  445  TGAAGTATGATCAAAATCTTGAATTAGATATGTCAGAATTAGCTGATTT  493
```

รูปที่ 13 แสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปจะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย



รูปที่ 14 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ VP7 gene ด้วยโปรแกรม Chromas

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อแยกจีโนไทป์พบว่า สามารถแยกจีโนไทป์ชนิด P-type (VP4 gene) ได้เป็น P[4], P[6], P[8] และ P[9] และชนิด G-type (VP7 gene) ได้เป็น G1, G2, G3, G9 และ G12 ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลจากการจำแนกจีโนไทป์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ VP4 และ VP7 gene

genotypes	จำนวนสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบ (%)				รวม
	P[4]	P[6]	P[8]	P[9]	
G1	-	-	78 (49.4)	-	78 (49.4)
G2	32 (20.3)	-	-	-	32 (20.3)
G3	-	-	1 (0.6)	1 (0.6)	2 (1.3)
G9	-	-	35 (22.2)	-	35 (22.2)
G12	-	1 (0.6)	10 (6.3)	-	11 (6.7)
รวม	32 (20.3)	1 (0.6)	124 (78.5)	1 (0.6)	158 (100.0)

1.3. เปรียบเทียบข้อมูลจีโนไทป์ที่พบในแต่ละโรงพยาบาลเพื่อดูความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์ที่พบในโรงพยาบาลในเขตตัวเมือง กับ โรงพยาบาลในเขตชนบท

จากผลการแยกจีโนไทป์ในจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลแต่ละจังหวัด พบว่า G-genotype G1, G3, G9 และ G12 ส่วนใหญ่จับคู่กับ P-genotype P[8] ในขณะที่ G2 จับคู่กับ P[4] เท่านั้น โดยพบ Uncommon strain 10 ตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ G3P[9], G12P[6] และ G12P[8] ดังตารางที่ 14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลแต่ละจังหวัด

จังหวัด	จำนวนสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบ (%)							จำนวนที่พบเชื้อทั้งหมด
	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G3P[9]	G9P[8]	G12P[6]	G12P[8]	
กรุงเทพมหานคร	20 (38.46)	19 (36.54)	-	-	12 (23.08)	-	1 (1.92)	52
ขอนแก่น	53 (65.43)	12 (14.81)	1 (1.23)	1 (1.23)	13 (16.05)	-	1 (1.23)	81
นครราชสีมา	3 (20.00)	1 (6.67)	-	-	10 (66.67)	1 (6.67)	-	15
ตาก	2 (20.00)	-	-	-	-	-	8 (80.00)	10

จากตารางที่ 14 พบว่า จีโนไทป์ที่พบในโรงพยาบาลที่เป็นตัวแทนเขตตัวเมืองทั้งสองแห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลในจังหวัดกรุงเทพมหานคร และโรงพยาบาลในจังหวัดนครราชสีมา พบเป็น G1P[8] 34.33%(23/67), G9P[8] 32.88%(22/67), G2P[4] 29.85%(20/67), G12P[6] 1.49%(1/67) และ G12P[8] 1.49%(1/67) ในขณะที่จีโนไทป์ที่พบในโรงพยาบาลตัวแทนเขตชนบท ได้แก่ โรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลในจังหวัดตาก พบเป็น G1P[8] 60.44%(55/91), G9P[8] 14.29%(13/91), G2P[4] 13.19%(12/91), G12P[8] 9.89%(9/91), G3P[8] 1.10%(1/91) และ G3P[9] 1.10%(1/91)

จากผลที่ได้ พบว่า อัตราส่วนจีโนไทป์ G1P[8] ในโรงพยาบาลในเขตตัวเมือง มีอัตราส่วนที่ต่ำกว่าโรงพยาบาลในเขตชนบท

1.4. **ผลการจัดกลุ่มโดย** Phylogenetic analysis **เปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานจีโนไทป์ใน** GenBank

จากการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อโรตาไวรัสในส่วนของ VP4 และ VP7 gene ทั้งหมด 158 ตัวอย่าง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรมในส่วน 5' และ 3' มาประกอบเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Seqman เพื่อให้ได้ gene ครบเส้น พบว่า มีจำนวน 103 ตัวอย่าง ที่สามารถรวมสายรหัสพันธุกรรมในส่วนของ VP4 และ VP7 gene ได้ยาวตั้งแต่ 800 bp และ 900 bp ขึ้นไป ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพื่อให้ได้ผลในการจัดกลุ่มทาง Phylogenetic analysis ที่ชัดเจนที่สุด จึงคัดเลือก 103 ตัวอย่าง ที่ได้กล่าวข้างต้น มาใช้ในการศึกษา โดย สุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรมเพื่อนำมาเปรียบเทียบ ได้แก่

VP7 gene

Genotype G1: AB018697, AF260952, DQ377599, AF480293, DQ512969, DQ512974, DQ512968, DQ512979, DQ207389, DQ512981, AY631049, AY098670, DQ512980, DQ512982, DQ236055, DQ674881, DQ674873, DQ674883, DQ377567, DQ377593, DQ377574, DQ377587, DQ377573, DQ377570, DQ377571, AF183859, AF043678, U26377, U26364, D16326, K02033, D16344, D16320, D16328, M64666, D16325, M92651, L24164, L24165

Genotype G2: A01028, AF401754, AJ293722, AY653300, AY653298, AY653299, AF480275, AY707784, AF106299, EU839924, AY261350, AY787646, AF106283, AF106281, AB118023, AY261338, AF044338, AF106280, AY261347, AY261341, AF450292, U73955, U37956, AY766085, DQ534015, D50124, D50125, D50114, D50117, X95371, X95370 X95273

Genotype G3: DQ904504, EU708578, DQ440622, DQ955490, EU708575, EU708586, EU708580, DQ904501, AY707794, AY707790, AY707793, AY870661, AY165009, AF386915, AB081594, AY603153, EF672602, AB180974, EU708961, AJ311739, EU708588, AY707792, DQ923801, DQ923797, D86278, D86271, D86281, D86183, D86279, D86276, D86272, K02028

Genotype G9: DQ236060, AF501580, AY184813, AY307087, DQ490173, DQ236067, DQ236068, DQ236065, DQ236058, AY487856, AB091747, AY699304, AY879296, AB091752, AB091750,

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DQ056300, AY699290, AY699302, AF438228, DQ647423, AY866503, AY866505, AJ250543, AJ250277, AF060487, AJ250275, EF197980, EU153554, AB091778, AB180970, D38053, D38055, L14072, AB180969

Genotype G12: DQ099754, DQ099747, DQ146654, DQ017649, DQ146687, DQ490550, DQ146643, AB269689, DQ062125, AF508734, DQ062129, DQ099749, DQ146665, AB436818, EU496257, AB071404, AB125852, DQ204743, EF672595

VP4 gene

Genotype P[4]: AB118025, GQ117018, EU839950, EF077354, M32559, EF672591, AJ278256, X82323, AF401755

Genotype P[6]: AF079356, EF033340, EU839948, AJ311737, AJ278253, EF554085, AB271687, AJ621506, AF529876, DQ146663, EU839953, EU839952, FJ183356, DQ070470, M88480, L20877, EF077348, EF672612, U16299

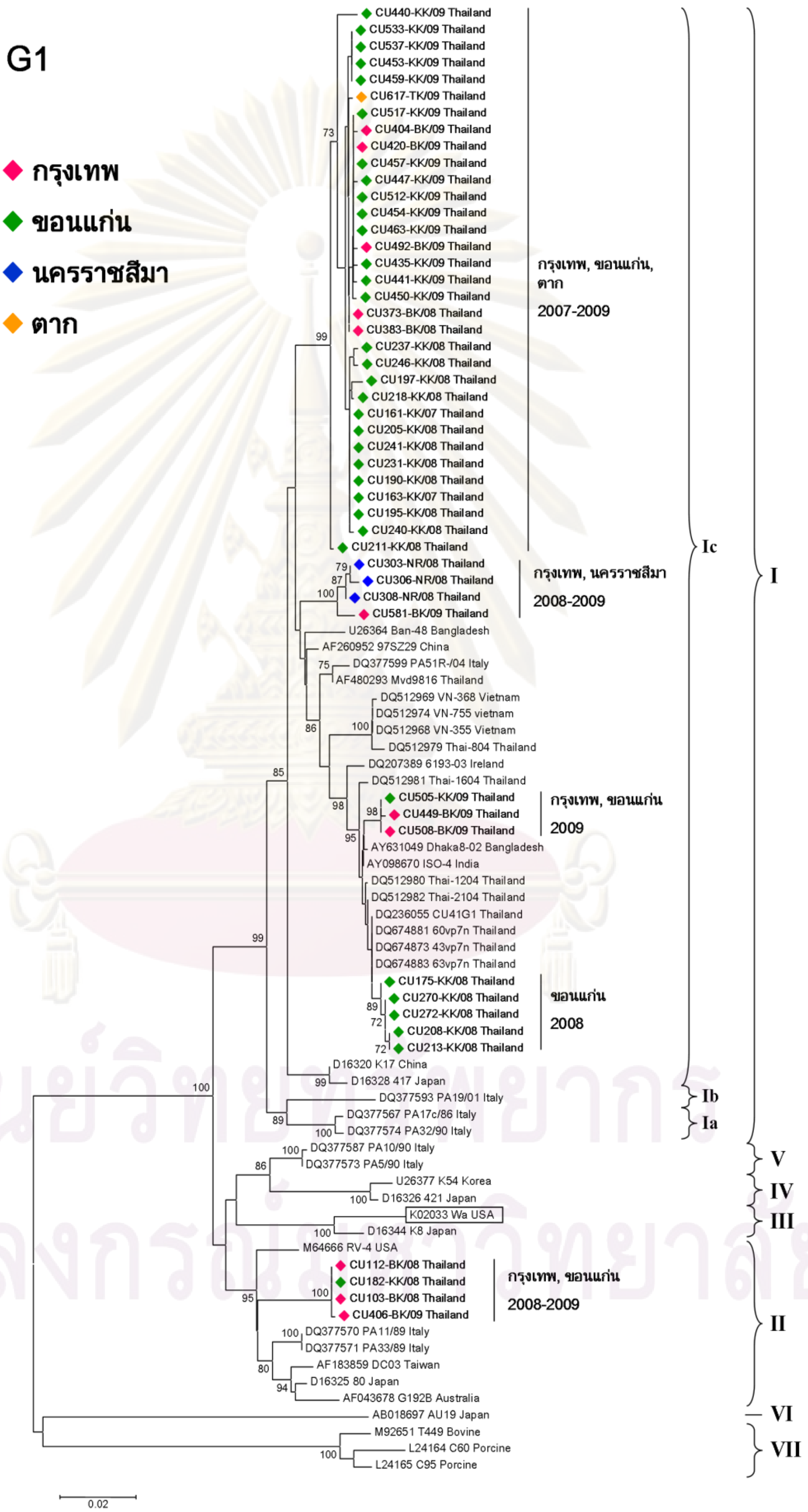
Genotype P[8]: L34161, AJ605315, AJ540229, AB039943, AB039942, AJ302146, AJ3021524, AB008285, AJ302143, AJ302151, AB008273, DQ235955, AB039944, AB008278, AY509910, AF052449, DQ235978, AY856445, DQ146652, DQ235978, AY856444, EU045229, EU839960, DQ675004, DQ146641

Genotype P[9]: D90260, DQ923802, DQ923798, D10970, AB008289, EU708574, EU708959, AJ488138, EU513176, EF672605, AB077766, EU513175

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการจำแนกจีโนไทป์ในบริเวณ VP7 และ VP4 gene ด้วยการสร้าง phylogenetic tree แสดงไว้ดังรูป ที่ 15-23

VP7 gene

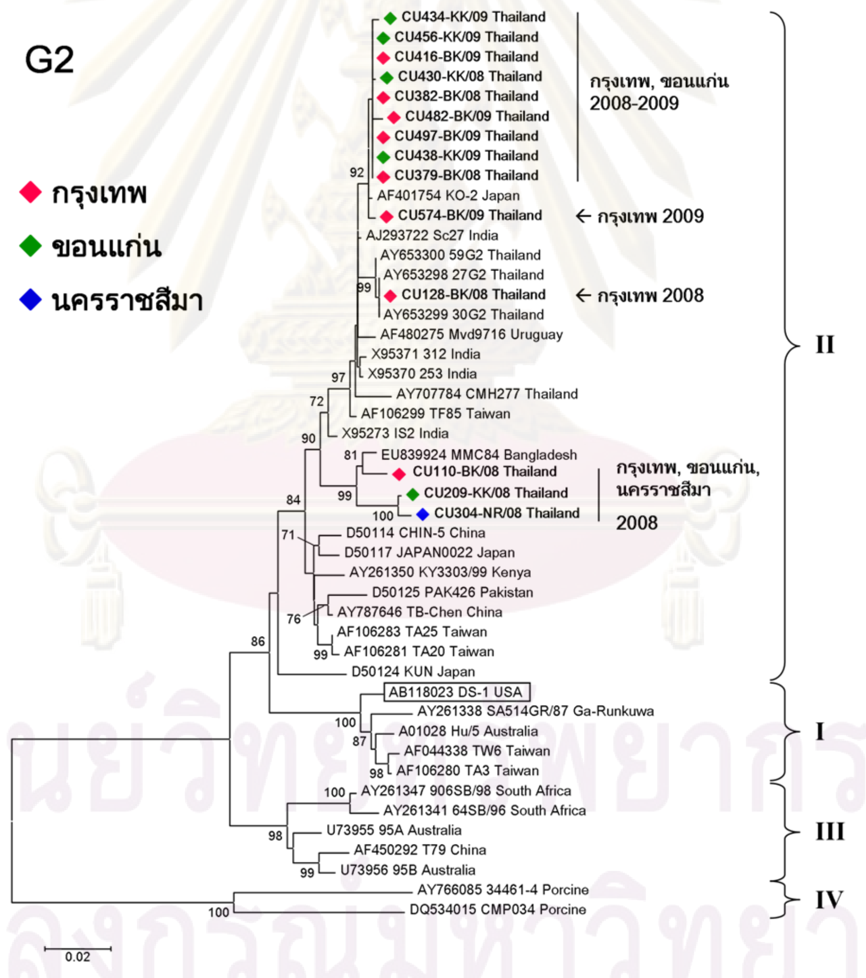


รูปที่ 15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ Genotype G1 ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

จากรูป พบว่า G1 ที่พบในการศึกษานี้ส่วนใหญ่จำแนกอยู่ในอยู่ใน Lineage I, sublineage Ic ซึ่งสายพันธุ์ที่อยู่ใน Lineage นี้ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศแถบทวีปเอเชีย โดยมีค่า % nucleotide similarity เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ใน Lineage I มากกว่า 96.0% และมี 4 ตัวอย่าง (กรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง และขอนแก่น 1 ตัวอย่าง) จำแนกอยู่ใน Lineage II โดยทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความคล้ายกันกับ PA11/89 และ PA33/89 ที่พบในอิตาลีด้วยค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 97.0-97.1%

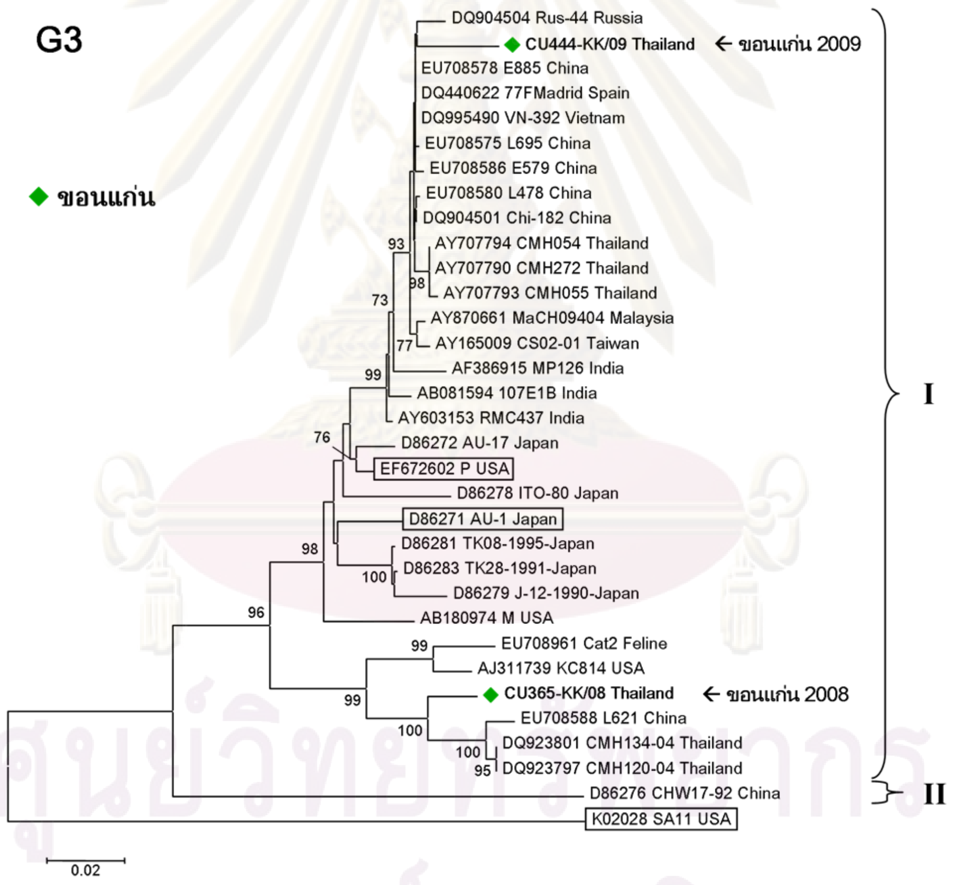


รูปที่ 16 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ Genotype G2 ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

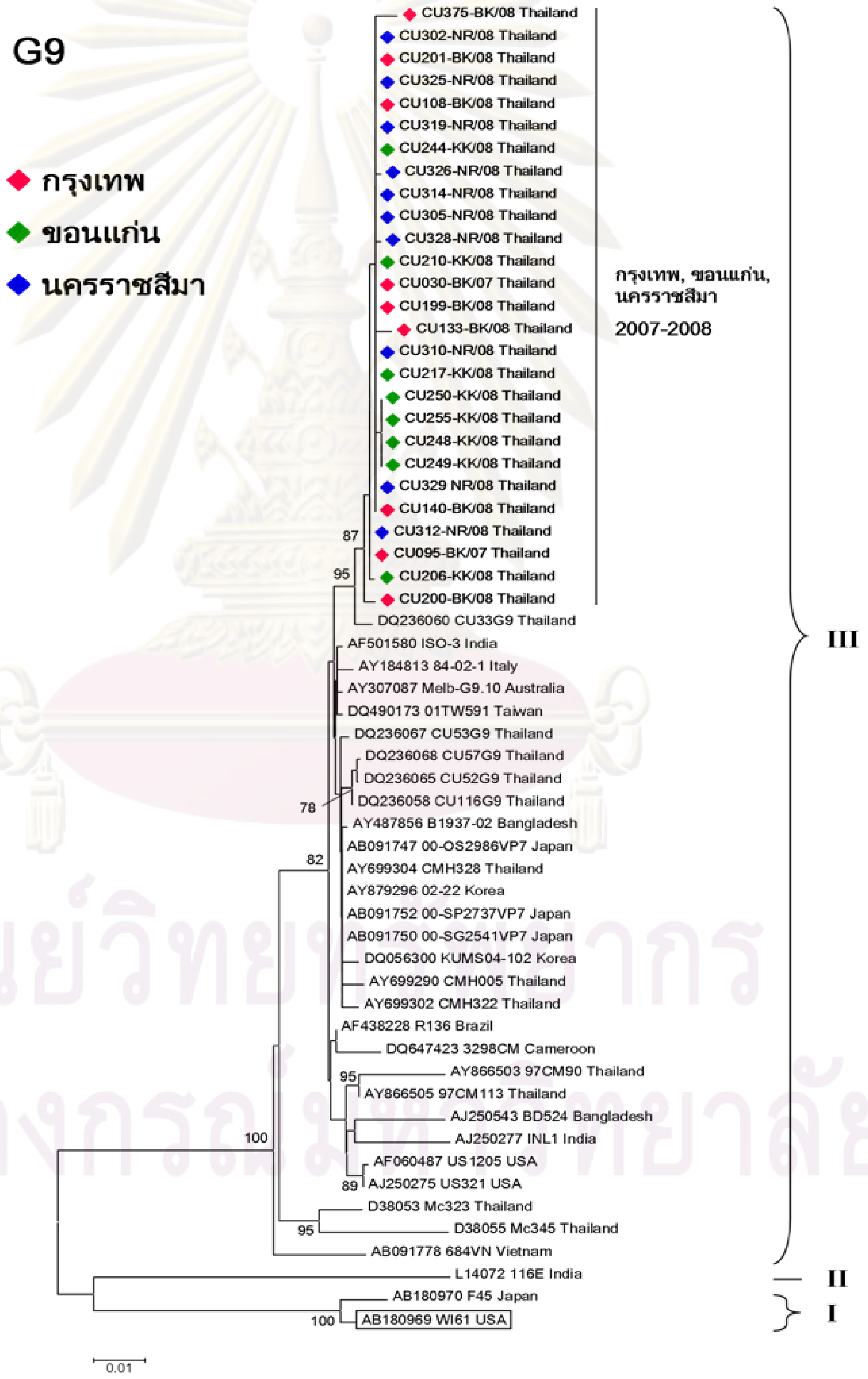
จากรูปที่ 16 พบว่า G2 ที่พบในการศึกษานี้ทุกตัวอย่างจำแนกอยู่ใน Lineage II โดยมี 10 ตัวอย่าง (กรุงเทพมหานคร 6 ตัวอย่าง และขอนแก่น 4 ตัวอย่าง) จำแนกอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ KO-2 ที่พบในประเทศญี่ปุ่นด้วย % nucleotide similarity สูงถึง 99.5-99.8% และมี 1 ตัวอย่างจากกรุงเทพมหานคร พ.ศ.2551 อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย พ.ศ. 2547 นอกจากนี้พบว่า มี 3 ตัวอย่างที่พบในปี พ.ศ.2551 (กรุงเทพมหานคร 1 ตัวอย่าง, ขอนแก่น 1 ตัวอย่าง และนครราชสีมา 1 ตัวอย่าง) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ MMC84 ที่พบในบังคลาเทศ ปี พ.ศ.2548



รูปที่ 17 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ Genotype G3 ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 17 พบว่า G3 ที่พบในการศึกษานี้ทุกตัวอย่างจำแนกอยู่ใน Lineage I และตัวอย่างทั้งหมด 2 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น โดยพบว่า CU365-KK/08 ที่พบในปี พ.ศ.2551 เป็นสายพันธุ์ที่คล้ายกันกับ CMH134-04 และ CHM120-92 ที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ในปี พ.ศ.2547 ในขณะที่ CU444-KK/09 ที่พบในปี พ.ศ.2552 มีความคล้ายกันกับ E885 ที่พบในประเทศจีน โดยมีค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 96.8% และ 97.9% ตามลำดับ

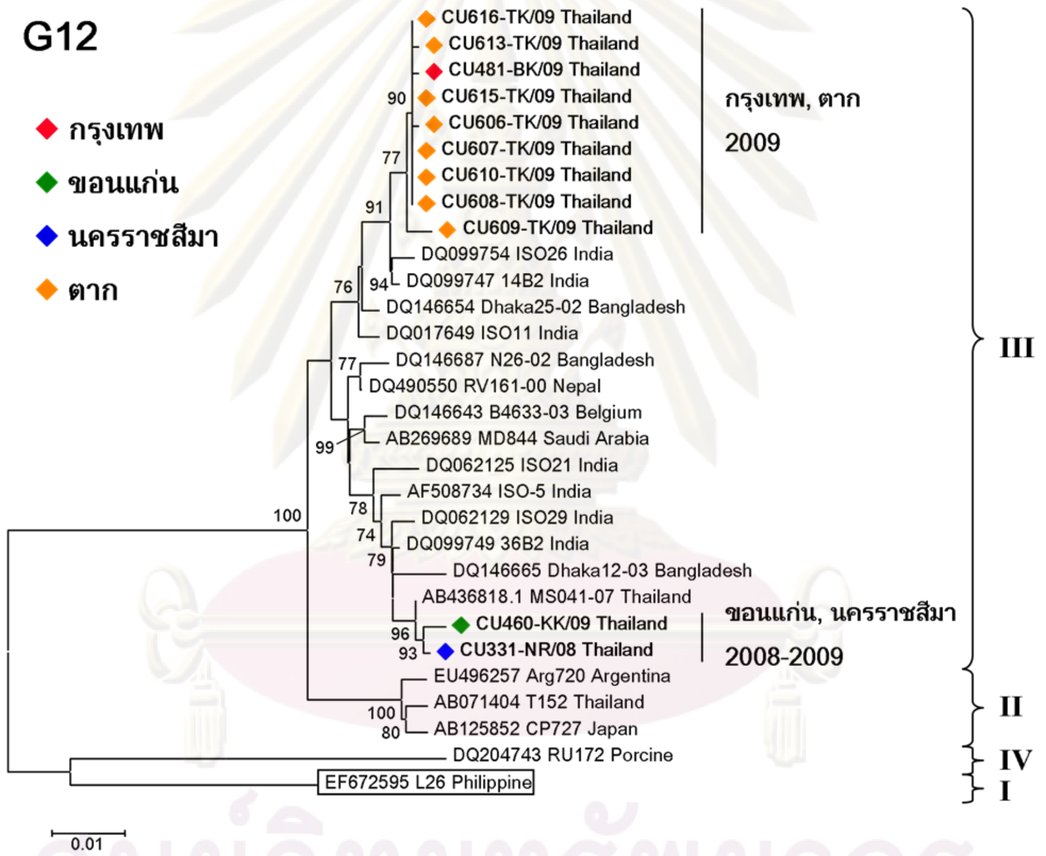


รูปที่ 18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ Genotype G9 ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

จากรูปที่ 18 พบว่า G9 ที่พบในการศึกษานี้ทุกตัวอย่างจำแนกอยู่ใน Lineage III โดยอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์ CU33G9 ที่พบประเทศไทย ด้วยค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 98.8-99.3%



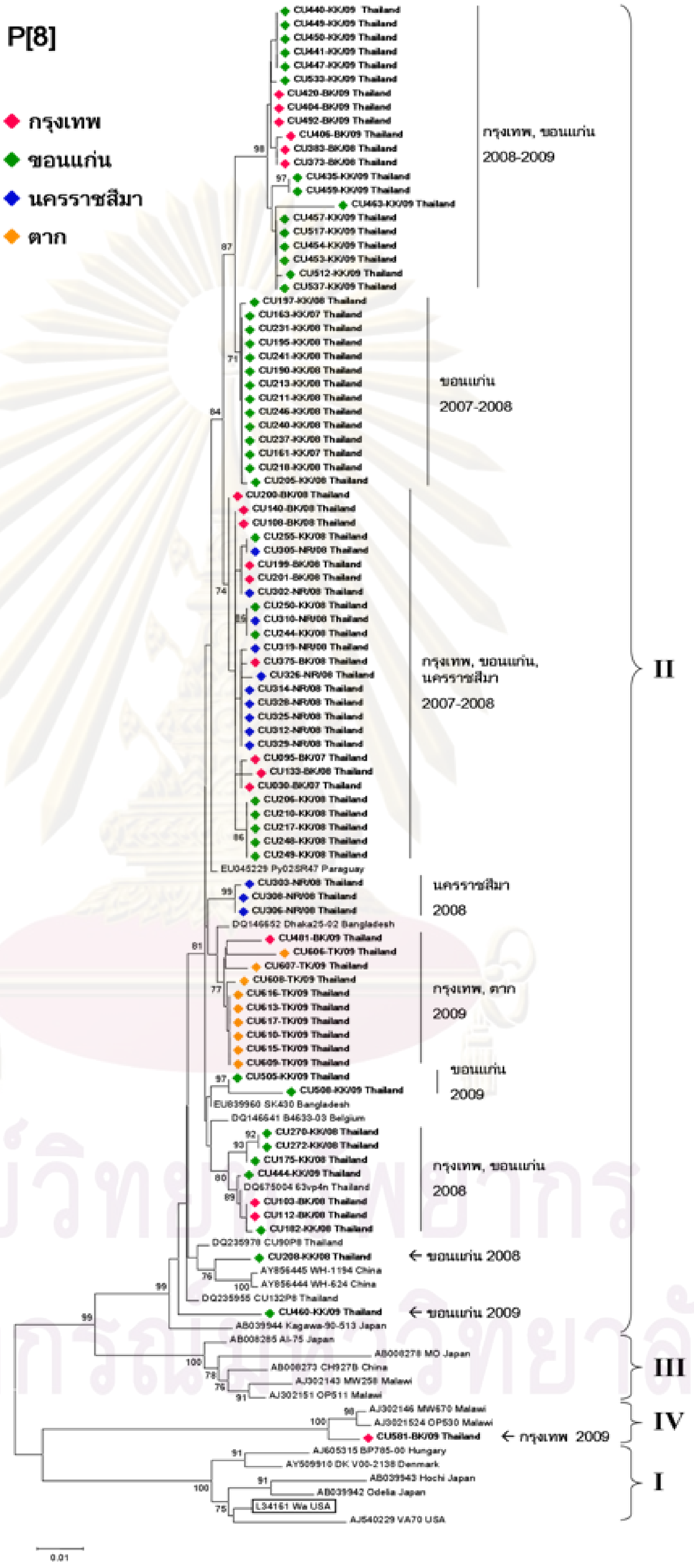
รูปที่ 19 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP7 gene ของ Genotype G12 ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

จากรูปที่ 19 พบว่า G12 ที่พบในการศึกษานี้ทุกตัวอย่างจัดอยู่ใน Lineage III โดยตัวอย่างที่พบในโรงพยาบาลในจังหวัดตาก 8 ตัวอย่างและโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร 1

ตัวอย่างถูกจำแนกอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศอินเดียด้วยค่า % nucleotide similarity สูงถึง 99.0-99.6% ในขณะที่ G12 ที่พบในจังหวัดขอนแก่นและนครราชสีมาจำนวน 2 ตัวอย่างถูกจำแนกอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ MS041-07 ที่พบในประเทศไทย พ.ศ.2550 ด้วยค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 99.6-99.8%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VP4 gene

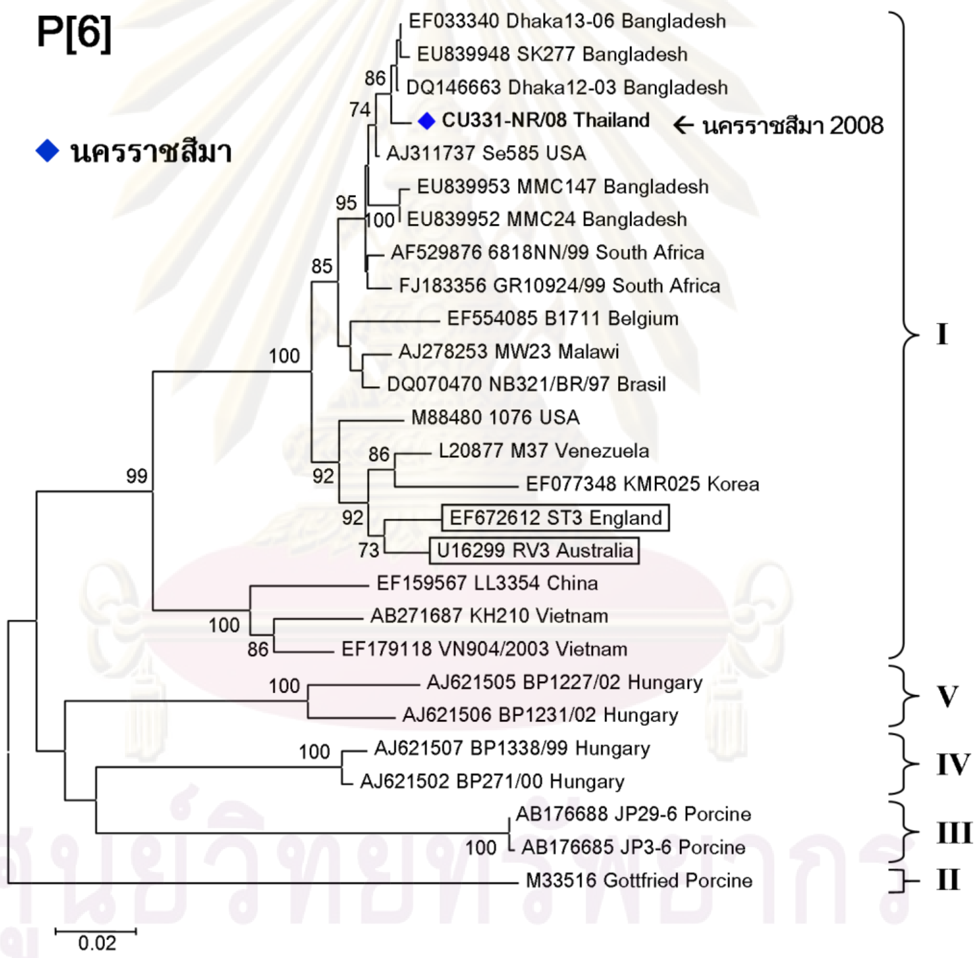


รูปที่ 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP4 gene ของ Genotype P[8] ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

พบว่า P[8] ที่ใช้ในการศึกษา Phylogenetic analysis ทั้งหมด 87 ตัวอย่าง มี 86 ตัวอย่าง จัดอยู่ใน Lineage II โดย มีหนึ่งตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ามาพักรักษาตัวในโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร พ.ศ.2552 ถูกจำแนกอยู่ใน Lineage IV และมีความคล้ายกันกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศมาลาวี โดยมีค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 98.4%

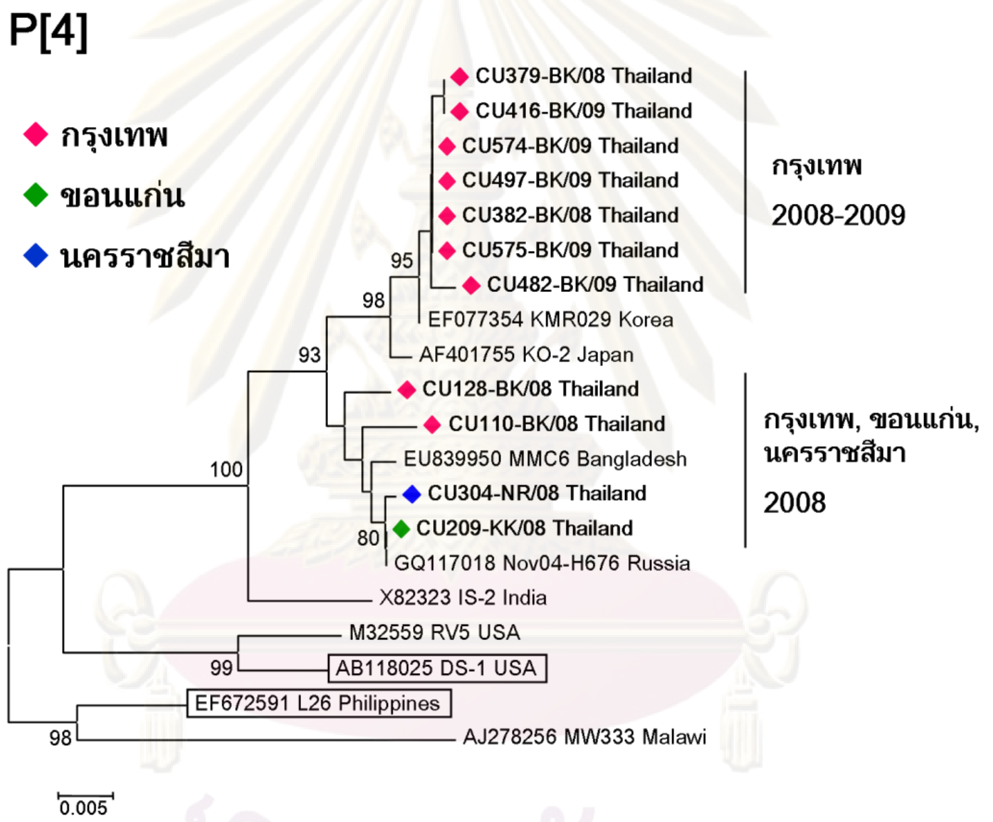


รูปที่ 21 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP4 gene ของ Genotype P[6] ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic tree พบว่า P[6] ที่พบในการศึกษานี้ถูกจำแนกอยู่ใน Lineage I และมีความเหมือนกันกับสายพันธุ์ที่พบในบังคลาเทศ โดยมีค่า % nucleotide similarity สูงถึง 99.7%

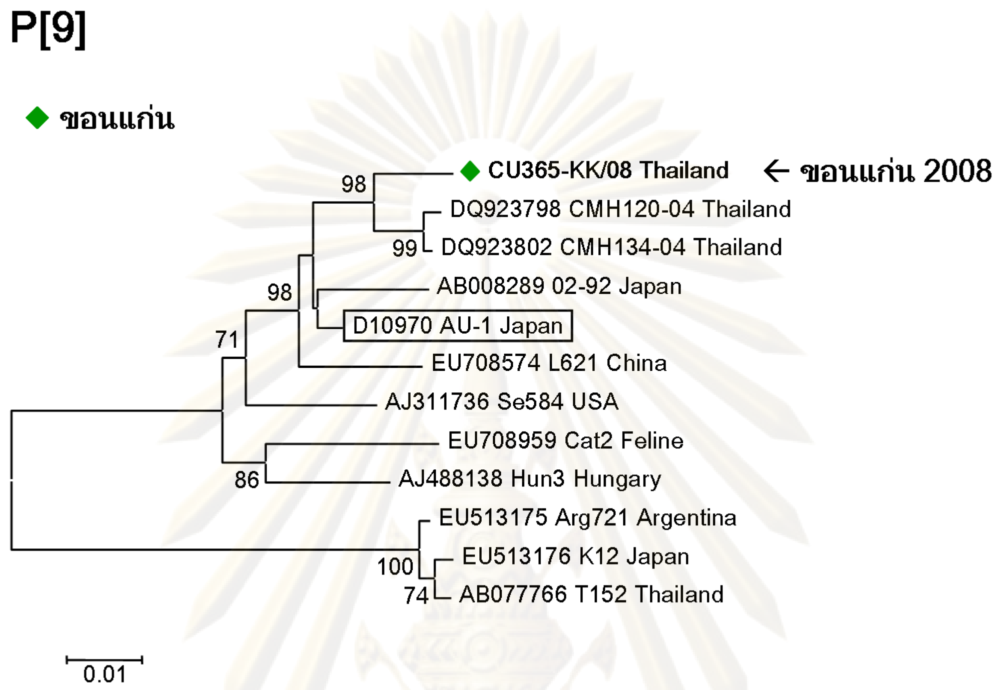
จากการศึกษาข้อมูลการจำแนก Lineage ของ Genotype P[4] และ P[9] จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ทั้ง 2 P-genotypes มีข้อมูลที่ไม่ชัดเจน ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูล Phylogenetic tree ในการศึกษา 2 P-genotypes นี้ จึงทำโดยจัดกลุ่มและหาค่า % nucleotide similarity เท่านั้น



รูปที่ 22 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP4 gene ของ Genotype P[4] ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

จากรูปที่ 22 พบว่า P[4] ที่พบในการศึกษานี้จำนวน 7 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ถูกจำแนกในกลุ่มเดียวกันกับ KMR029 ที่พบในประเทศเกาหลี โดยมีค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 99.6-99.9% และอีก 4 ตัวอย่างโดยเป็น

ตัวอย่างที่พบใน กรุงเทพมหานคร 2 ตัวอย่าง นครราชสีมา 1 ตัวอย่าง และขอนแก่น 1 ตัวอย่าง พบว่า ทั้ง 4 ตัวอย่างมีความคล้ายกันกับ MMC6 ที่พบในบังคลาเทศและ H676 ที่พบในรัสเซีย โดยมีค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 99.2-99.9%



รูปที่ 23 Phylogenetic tree แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน VP4 gene ของ Genotype P[9] ที่พบจากโรงพยาบาลในสี่จังหวัดเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม, สัญลักษณ์ ◆ แสดง ตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้, กรอบสี่เหลี่ยม แสดง prototype strain

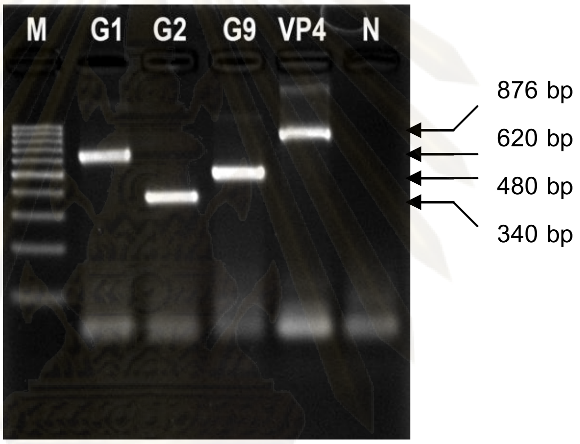
เมื่อทำการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic tree พบว่า P[9] ที่พบในการศึกษานี้ถูกจำแนกในกลุ่มเดียวกันกับ CMH134/04 และ CMH120/04 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ G3P[9] ที่พบในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ.2547 โดยมีค่า % nucleotide similarity เท่ากับ 98.0-98.2%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **พัฒนาการตรวจจีโนไทป์ชนิด** G-type **ที่พบบ่อยด้วย** multiplex RT-PCR

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาการตรวจแยกจีโนไทป์ชนิด G-type ของเชื้อ Human rotavirus group A ที่พบบ่อย ได้แก่ G1 G2 และ G9 ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดยการใช้ primer ที่จำเพาะต่อ VP7 gene แต่ละจีโนไทป์ ร่วมกับการตรวจหา VP4 gene ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งบอกการพบเชื้อโรตาไวรัสภายในระบบเดียวกัน แล้วทดสอบ primer ด้วย recombinant plasmids ที่ได้จากการ cloning สารพันธุกรรมของเชื้อโรตาไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น VP4 gene และ VP7 gene จีโนไทป์ G1 G2 G9

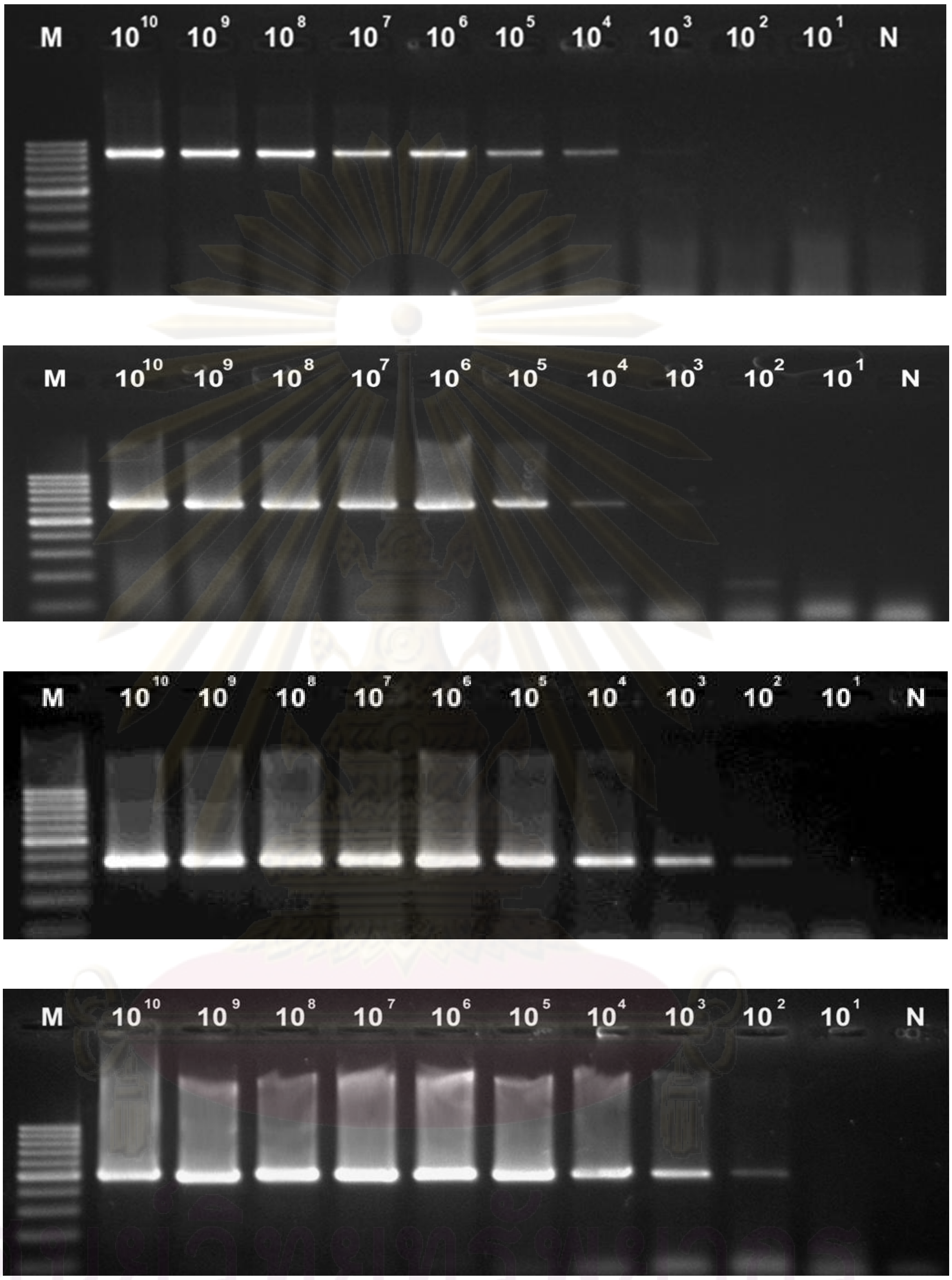
2.1. **ผลการทดสอบ** primer **ด้วย** recombinant plasmids



รูปที่ 24 ผลการทดสอบ primer ในการเพิ่มจำนวน recombinant plasmid โดยการทำ multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus, M คือ 100 bp DNA Marker, G1 G2 G9 และ VP4 คือ recombinant plasmids ของยีน G1 G2 G9 และ VP4 gene ตามลำดับ, N คือ Negative control(DW)

2.2. **ผลการทดสอบ** sensitivity

ผลการทดสอบความไวโดยใช้ dsRNA ที่จำลองจาก RNA ที่ได้จากการทำ *In vitro* transcription ของ VP4 gene, G1, G2 และ G9 พบว่า multiplex RT-PCR มีความไวในการเพิ่มจำนวน dsRNA เป็น 10^3, 10^3, 10^2 และ 10^2 copies/µl ตามลำดับ ดังรูปที่ 25

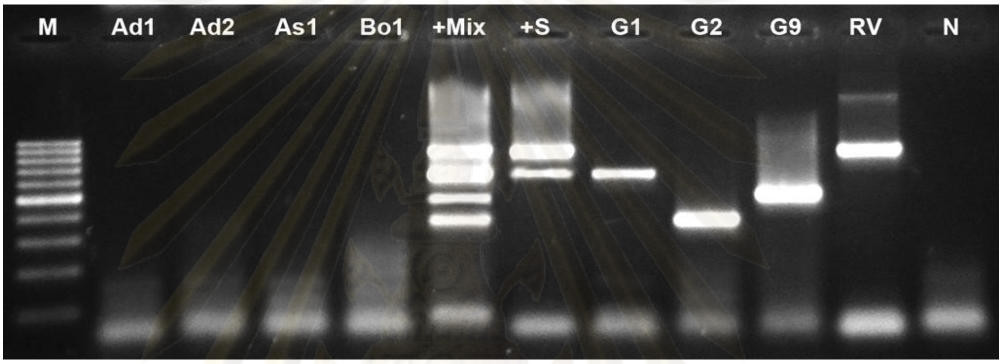


รูปที่ 25 ผลการทดสอบความไวของ multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus ของ a) Rotavirus (VP4 gene), b) G1, c) G2, และ d) G9 โดยใช้ dsRNA จาก *In vitro* transcription ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{10} จนถึง 10^{1} copies/µl, M คือ 100 bp DNA Marker, N คือ Negative control(DW)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3. **ผลการทดสอบ** specificity

ทดสอบด้วยเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในเด็กที่พบในห้องปฏิบัติการศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก โดยสกัด DNA/RNA ของเชื้อไวรัส ได้แก่ Adenovirus, Human Bocavirus และ Astrovirus จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย โดยสุ่มตัวอย่างอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อโรตาไวรัสจากการศึกษาความชุกมาสกัดพร้อมกันเพื่อเป็น positive control พบว่า ไม่มีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสดังกล่าว ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 ตัวอย่างผลการทดสอบความจำเพาะของ multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus โดยใช้ DNA/RNA จากเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินอาหารในเด็ก, M คือ 100 bp DNA Marker, Ad1-Ad2 คือ Adenovirus, As1 คือ Astrovirus, Bo1 คือ Human Bocavirus, +Mix คือ dsRNA จาก *In vitro* transcription ของ G1 G2 G9 และ VP4 gene ผสมกัน, +S คือ Positive control (dsRNA ของเชื้อโรตาไวรัสจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย), G1 G2 G9 และ RV คือ positive control plasmids ของ G1 G2 G9 และ VP4 gene ตามลำดับ, N คือ Negative control (DW)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4. ผลการวินิจฉัยด้วย multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับผลในขั้นตอนการศึกษาความชุก

ทำการทดสอบ multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus กับ dsRNA ของเชื้อโรตาไวรัสที่สกัดจากตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่พบเชื้อโรตาไวรัสและทราบจีโนไทป์จากการศึกษาความชุก จำนวน 158 ตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบผลการวินิจฉัยด้วย multiplex RT-PCR กับผลในขั้นตอนการศึกษาความชุก

จีโนไทป์	ผลการศึกษาความชุก	ผล multiplex RT-PCR G1 G2 G9 Rotavirus (%)					
		G1	G2	G9	Rotavirus	Negative	Unidentified
G1	78	74 (94.87)	-	-	-	1 (1.28)	3 (3.85)
G2	32	-	27 (84.37)	-	-	1 (3.12)	4 (12.5)
G3	2	-	-	-	2 (100.00)	-	-
G9	35	-	-	32 (91.43)	-	1 (2.86)	2 (5.71)
G12	11	-	-	-	11 (100.00)	-	-

จากผลการทดสอบ พบว่า ผลการตรวจแยกจีโนไทป์ด้วย multiplex RT-PCR ต่อ G1 G2 G9 ให้การแปลผลตรงกับการศึกษาความชุกจำนวน 146 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.04% โดยให้ผลเป็น false negative 3 ตัวอย่าง (1.90%) และไม่สามารถแปลผลได้ 9 ตัวอย่าง (5.69%)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลและวิจารณ์ผลการศึกษาความชุก

ในประเทศไทย พบว่า เชื้อโรตาไวรัสมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กเล็กมานานกว่า 30 ปี จากรายงานการศึกษาอุบัติการณ์การพบเชื้อโรตาไวรัสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา โดย ในระหว่างปี พ.ศ.2541-2542, 2544-2545, 2545-2547 และ 2547-2549 พบอุบัติการณ์การเกิดโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสเป็น 50.6%, 43.0%, 33.3% และ 42.3% ตามลำดับ (15-17,28) ซึ่งจากผลการศึกษาในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลทั้งสี่แห่งของการศึกษานี้ทั้งหมด 557 ตัวอย่าง ด้วยวิธีทาง RT-PCR พบให้ผลบวกต่อเชื้อโรตาไวรัส 158 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.4% โดย พบในโรงพยาบาลในจังหวัดกรุงเทพมหานคร 22.0% โรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น 30.1% และโรงพยาบาลในจังหวัดนครราชสีมา 37.5% ส่วนผลการพบเชื้อที่ได้จากจังหวัดตากนั้น พบสูงถึง 83.3% ซึ่งผลที่ได้จากโรงพยาบาลในจังหวัดนี้ไม่สามารถเชื่อถือได้ เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บได้มีจำนวนน้อยเกินไป

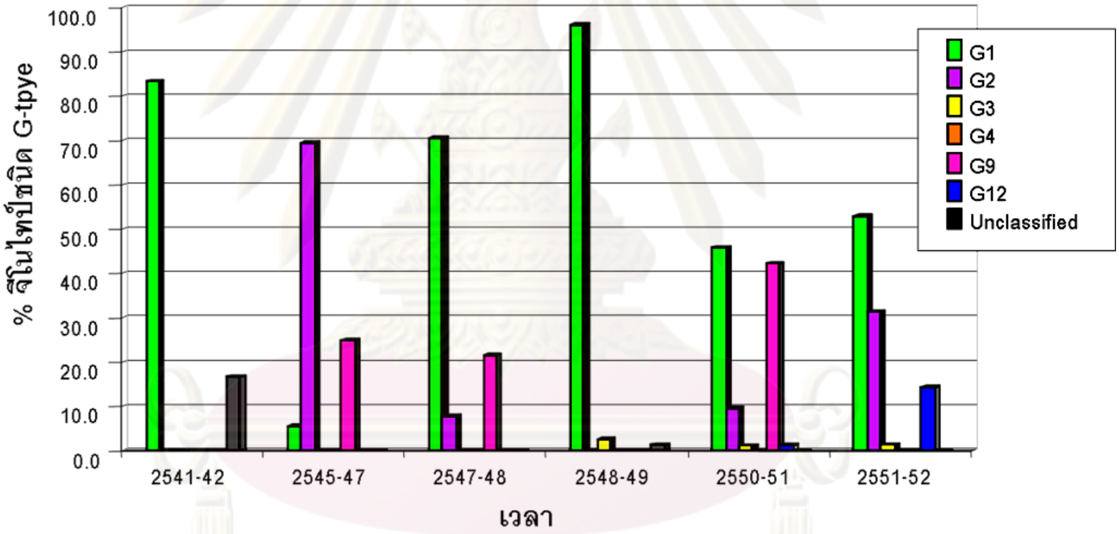
อุบัติการณ์ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบ เมื่อนำมาวิเคราะห์แยกตามเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2550 – พฤษภาคม 2552 พบว่า ช่วงเดือนธันวาคม-มีนาคมซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาวของประเทศไทย มีผู้ป่วยเด็กที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วงเพิ่มสูงขึ้น โดย พบอาการอุจจาระร่วงสาเหตุจากเชื้อโรตาไวรัสเฉลี่ยในช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม ปี พ.ศ.2551 และ 2552 เป็น 41.3% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในหลายประเทศที่พบว่าอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสสัมพันธ์กับอุณหภูมิ โดยจะพบอุบัติการณ์ของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่มีอากาศหนาวเย็น (15,29-31)

จากการวิเคราะห์ผลการตรวจพบเชื้อแยกตามอายุของผู้ป่วย พบว่า ช่วงอายุที่มีการติดเชื้อโรตาไวรัสมากที่สุด คือ 12-17 เดือน (34.8%) รองลงมา คือ 6-11 เดือน (22.8%) ในขณะที่ช่วงอายุตั้งแต่ 0-5 เดือน พบการติดเชื้อเพียง 7.6% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเด็กในช่วงอายุนี้ส่วนใหญ่ได้รับภูมิคุ้มกันจากมารดา ทั้งจากภูมิคุ้มกันที่ได้รับตอนอยู่ในครรภ์ และภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากการดื่มนมมารดา

จากผลการจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อโรตาไวรัสในการศึกษานี้ในภาพรวม พบว่า จีโนไทป์ที่พบในการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นจีโนไทป์เดียวกับที่พบในประเทศอื่นทั่วโลก(G1, G2 และ G9) โดย จีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบเป็น G1 มากที่สุด คิดเป็น 49.4% รองลงมา คือ G9, G2,

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

G12 และ G3 คิดเป็น 22.2%, 20.3%, 6.7% และ 1.3% ตามลำดับ โดย P-type ที่พบมากที่สุด คือ P[8] คิดเป็น 78.5% รองลงมา คือ P[4], P[6] และ P[9] คิดเป็น 20.3%, 0.6% และ 0.6% ตามลำดับ โดย G1 และ G9 มีการจับคู่กับ P[8], G2 จับคู่กับ P[4], G3 จับคู่กับ P[8] และ P[9], G12 จับคู่กับ P[6] และ P[8] ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับการศึกษาในรอบ 10 ปี ที่ผ่านมา พบว่า จีโนไทป์ชนิด G-type ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา โดยใน ปี พ.ศ.2541-2542 พบอุบัติการณ์ของ G1 สูงที่สุด(28) ต่อมาในปี พ.ศ.2545-2547 อุบัติการณ์ ของ G1 ลดลง ในขณะที่ G2 กลายเป็นจีโนไทป์ที่พบก่อโรคมากที่สุดในช่วงปีนั้น(16) และจาก การศึกษาต่อมาในปี พ.ศ.2547-2549 (17) พบอุบัติการณ์ของ G1 เพิ่มสูงขึ้นอีกครั้ง ในขณะที่ อุบัติการณ์ของ G2 กลับลดลงและหายไปในช่วงปี พ.ศ.2548-2549 และจากผลการศึกษานี้ พบว่า ในช่วงปี พ.ศ. 2550-2551 มีการระบาดร่วมกันของ G1 และ G9 ซึ่งต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2551-2552 G9 กลับหายไป และกลายเป็น G2 ที่เพิ่มสูงขึ้น โดย มีการระบาดร่วมกันกับ G1 ดัง สรุปในรูปที่ 27



รูปที่ 27 กราฟเปรียบเทียบจีโนไทป์ชนิด G-type ที่พบในช่วงปี พ.ศ.2541-2542(28), 2545-2547(16), 2547-2549(17) และผลจีโนไทป์ที่ได้จากการศึกษานี้ในช่วง 2550-2552

จากข้อมูลการศึกษาในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา รวมถึงข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้ง นี้สามารถสรุปได้ว่า ในประเทศไทย G1 เป็นจีโนไทป์หลักที่พบเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอุจจาระ ร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสมากที่สุด

ในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาวัคซีนเพื่อต้านเชื้อโรตาไวรัสเข้ามาใช้ โดย วัคซีนที่ ได้รับการจดทะเบียนและใช้กันในหลายประเทศทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย ได้แก่ Rotarix (GlaxoSmithKline, Belgium) ซึ่งเป็นวัคซีนชนิด monovalent attenuated human G1P[8]

rotavirus vaccine และ RotaTeq (Merck, USA) ซึ่งเป็น pentavalent human-bovine(WC3) reassortant rotavirus vaccine วัคซีนทั้งสองชนิดถูกนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 โดย Rotarix ได้รับความนิยมและถูกนำเข้ามาใช้ด้านการค้าในทวีปเอเชียและอเมริกาใต้ รวมถึง ประเทศไทย(32) เนื่องจาก Rotarix มีการให้เพียง 2 dose ก็สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเทียบกับ RotaTeq ที่ต้องให้ถึง 3 dose และ เนื่องจากสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน Rotarix เป็นสายพันธุ์ RIX4414 ซึ่งพัฒนามาจากสายพันธุ์ 89-12 ที่พบในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสในอเมริกาปี พ.ศ. 2532 โดยพบว่า ภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นต่อเชื้อสายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อข้ามสายพันธุ์(cross-reaction)(7,33) และมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อสายพันธุ์ที่พบบ่อยในปัจจุบัน เช่น G1P[8], G2P[4] และ G9P[8] ได้ แต่จากรายงานการศึกษาในประเทศบราซิล กลับพบว่า ภายหลังการนำวัคซีนชนิดนี้เข้ามาใช้ วัคซีนมีประสิทธิภาพในการลดอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรตาไวรัสได้จริง แต่ในขณะเดียวกัน สายพันธุ์ที่พบเป็นสาเหตุของโรคกลับมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น G2P[4] ซึ่ง G/P combination ไม่ตรงกับสายพันธุ์ของวัคซีนเพิ่มสูงขึ้น(11) ดังนั้น จึงเกิดการตั้งคำถามของการเลือกสายพันธุ์วัคซีนให้ตรงกับสายพันธุ์ที่ระบาดในแต่ละท้องถิ่นขึ้น

จากการนำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดจีโนไทป์ของโรตาไวรัสในเด็กอุจจาระร่วงที่อยู่ในเขตตัวเมือง ซึ่งมีโอกาสได้รับวัคซีนมากกว่าเด็กในชนบท โดยให้เด็กจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร เป็นตัวแทนเด็กในเขตตัวเมือง และเด็กในโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่นเป็นตัวแทนเด็กในเขตชนบท จากผลการศึกษา พบว่า จีโนไทป์ที่พบในโรงพยาบาลตัวแทนเขตตัวเมือง กับโรงพยาบาลตัวแทนเขตชนบทมีความแตกต่างกัน โดยอัตราส่วนจีโนไทป์ G1P[8] ในโรงพยาบาลในเขตตัวเมือง มีอัตราส่วนที่ต่ำกว่าโรงพยาบาลในเขตชนบท ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ G1P[8] เป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อวัคซีนจึงทำให้มีอัตราการพบเชื้อ G1P[8] ในเขตตัวเมืองต่ำ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในโรงพยาบาลในจังหวัดกรุงเทพมหานคร พบว่า มีอุบัติการณ์ของจีโนไทป์ G1P[8](38.5%) และ G2P[4](36.5%) ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่า สายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบในเขตชนบทมีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากกว่าในเขตตัวเมือง โดย ในตัวอย่างที่แยกได้จากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่นนั้น มีการพบ uncommon strains G3P[9] ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันกับโรตาไวรัสสายพันธุ์ที่พบในแมวด้วย

จากการทำ phylogenetic analysis พบว่า จีโนไทป์ G1 ที่พบในประเทศไทย มี 2 Lineage ด้วยกัน โดยส่วนใหญ่ที่พบถูกจัดอยู่ใน Lineage I, sublineage Ic ซึ่งพบได้ในประเทศแถบเอเชีย และ Lineage II ซึ่งใน lineage II นี้ เป็น G1 ที่พบในโรงพยาบาลในจังหวัด

กรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น 1 ตัวอย่าง โดยทั้ง 4 ตัวอย่างพบว่าความคล้ายกันกับ G1 ที่พบในประเทศอิตาลี สำหรับ G2 พบว่า เป็น lineage II ทั้งหมด โดยพบว่า ส่วนใหญ่มีความคล้ายกันกับ G2 ในประเทศญี่ปุ่น และมี 3 ตัวอย่างซึ่งพบจากโรงพยาบาลในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ขอนแก่น และ นครราชสีมา ในปี 2551 โดย พบว่ามีความคล้ายกันกับ G2 ที่พบในบังคลาเทศ ในการศึกษานี้ พบอุบัติการณ์ของ G3 ในอัตราที่ต่ำ โดย G3 ที่พบทั้งหมดจัดอยู่ใน Lineage I ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลในจังหวัดขอนแก่น โดยพบว่า CU365-KK/08 ที่พบในปี พ.ศ.2551 เป็นสายพันธุ์ที่คล้ายกันกับ CMH134-04 และ CHM120-92 ที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ ในขณะที่ CU444-KK/09 ที่พบในปี พ.ศ.2552 มีความเหมือนกันกับ E885 ที่พบในประเทศจีน

G9 ถูกพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย ซึ่งต่อมาภายหลังได้มีการแพร่ระบาดไปยังหลายประเทศทั่วโลก และในปัจจุบัน G9 ถูกจัดให้เป็น common strain จีโนไทป์ที่ 5 ของโลก จากการศึกษานี้ พบอุบัติการณ์ของ G9 ในโรงพยาบาลที่เป็นตัวแทนเขตตัวเมือง (33.9%) สูงกว่าโรงพยาบาลตัวแทนเขตชนบท (14.3%) ซึ่งจากผลการทำ phylogenetic analysis พบว่า G9 ที่พบจัดอยู่ใน Lineage III โดยมีความเหมือนกันกับ G9 ที่มีรายงานในประเทศไทยทุกตัวอย่าง

G12 ถูกพบครั้งแรกในประเทศฟิลิปปินส์ในปี พ.ศ.2523 และมีรายงานการพบ จีโนไทป์นี้ในประเทศไทยเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2543 โดยพบเป็น G12P[9] ในปัจจุบัน โรตาไวรัส G12P[6] และ G12P[8] ได้ถูกจัดให้เป็นสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัสอีกสายพันธุ์หนึ่งที่พบได้บ่อย (common strain) ในประเทศอินเดีย และจากรายงานการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อโรตาไวรัสในหลายประเทศทั่วโลก พบอุบัติการณ์ของจีโนไทป์ G12 เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในประเทศอินเดีย เนปาล และบังคลาเทศ ซึ่งต่อไปในอนาคตจีโนไทป์ G12 อาจถูกจัดให้เป็น common strain จีโนไทป์ที่ 6 ของโลกเช่นเดียวกันกับ G9 จากการศึกษานี้ G12 ส่วนใหญ่ถูกพบในตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลอุ้มผางซึ่งเป็นโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดตาก และจากผลทาง phylogenetic analysis พบว่าจีโนไทป์ G12 ที่พบทั้งหมดจัดอยู่ใน Lineage III โดย G12 ที่พบในจังหวัดตากนั้น มีความเหมือนกันกับ G12 ที่พบในประเทศอินเดียถึง 99.0-99.6% นอกจากนี้ ยังพบว่า P[8] ที่พบในจังหวัดตากมีความเหมือนกันกับจีโนไทป์ที่พบในบังคลาเทศ ซึ่งผลที่ได้นี้สนับสนุนความคิดที่ว่า G12 ที่พบในประเทศไทยอาจเป็น G12 ที่ได้รับมาจากสายพันธุ์ของประเทศในแถบอินเดีย และบังคลาเทศ เนื่องจากประเทศในแถบนั้นมีอุบัติการณ์ของจีโนไทป์ G12 ที่สูง จึงมีความเป็นไปได้ว่า อาจมีการถ่ายทอดเชื้อโรตาไวรัสสายพันธุ์นี้ส่งต่อกันมา และอาจถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยผ่านทางประเทศพม่า เนื่องจากจังหวัดตากเป็นจังหวัดที่อยู่ติดกับชายแดน

ไทย-พม่า ดังนั้น การอพยพย้ายถิ่นของแรงงานต่างด้าว จึงอาจมีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์ของการพบเชื้อโรตาไวรัสจีโนไทป์ G12 ในจังหวัดนี้

P[8] เป็น P-genotype ที่พบมากที่สุดทั่วโลก รวมถึง ประเทศไทย จากการศึกษานี้พบ P[8] 78.5% และผลจาก phylogenetic analysis พบว่า P[8] ที่พบในโรงพยาบาลทั้งสี่จังหวัดถูกจัดอยู่ใน Lineage II โดยมี 1 ตัวอย่าง ซึ่งพบในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ปี พ.ศ.2552 จัดอยู่ใน Lineage IV โดยมีความคล้ายกันกับจีโนไทป์ที่พบในทวีปแอฟริกาใต้ สำหรับ P[6] ที่พบในการศึกษานี้ พบว่าจัดอยู่ใน Lineage I โดยมีความคล้ายกันกับ P[6] ที่พบในประเทศบังคลาเทศ จีโนไทป์ P[4] และ P[9] นั้น ไม่สามารถแยก Lineage เนื่องจากรายงานการศึกษาในระดับอณูชีววิทยาของทั้ง 2 จีโนไทป์นี้มีน้อย ไม่สามารถระบุ Lineage ที่ชัดเจนได้ ดังนั้น การวิเคราะห์ข้อมูลทาง phylogenetic analysis จึงเป็นการวิเคราะห์ โดย จัดกลุ่ม และเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน โดยพบว่า P[4] ที่พบสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน โดย กลุ่มที่พบในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานครช่วงปี พ.ศ.2551-2552 มีความเหมือนกันกับจีโนไทป์ที่พบในประเทศเกาหลี ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งมีความเหมือนกันกับ P[4] ที่พบในประเทศบังคลาเทศและรัสเซีย สำหรับ P[9] ที่พบในการศึกษานี้ พบว่า มีความเหมือนกันกับสายพันธุ์ CMH134-04 และ CHM120-04 ที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2547 ซึ่งสัมพันธ์กับผลของ G-genotype

จากการนำผลทาง phylogenetic analysis ของทั้งสองยีนมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่า ในตัวอย่างเดียวกันพบ VP4 และ VP7 ที่ไม่สอดคล้องกัน ตัวอย่างเช่น CU581-BK/09 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร ปี พ.ศ.2552 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 gene เหมือนกันกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศบังคลาเทศ ในขณะที่ VP4 gene เหมือนกันกับสายพันธุ์ที่พบในทวีปแอฟริกาใต้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการแลกเปลี่ยนยีน (reassortment) ระหว่างโรตาไวรัสสองสายพันธุ์ที่พบในต่างพื้นที่กัน

สรุปผลและวิจารณ์ผลการพัฒนา Multiplex RT-PCR

ในปัจจุบัน มีวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรตาไวรัสด้วยกันหลายวิธี ซึ่งการตรวจหาเชื้อทางด้านอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่า เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง และ เนื่องจากการศึกษาความชุกของเชื้อโรตาไวรัสเพื่อแยกจีโนไทป์ด้วย monoplex RT-PCR ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการปัจจุบัน พบว่า ค่าใช้จ่าย และเวลาส่วนหนึ่งต้องสูญเสียไปกับการทำ sequencing และจากผลการศึกษาในปี พ.ศ.2551 ในช่วงของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษานี้ พบว่า จีโนไทป์ชนิด G-type ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบเป็น G1P[8], G2P[4] และ G9P[8] ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน common genotype ที่พบในประเทศอื่นๆ ดังนั้น เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย การศึกษานี้จึงได้พัฒนา 1 step multiplex RT-PCR ต่อ common G-genotype ได้แก่ G1 G2 และ G9 ขึ้น โดยใช้ primer ต่อ VP4 gene เป็นตัวบ่งชี้ผลบวกต่อ Rotavirus โดยอาศัยผลที่ได้จากการศึกษาความชุกเป็นพื้นฐาน เนื่องจากโรตาไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็น dsRNA ดังนั้น การทดสอบ sensitivity และ specitivity ของ 1 step multiplex RT-PCR จึงเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก โดยผู้วิจัยได้สังเคราะห์ RNA สายบวก และสายลบ โดยใช้เอ็นไซม์ T7 RNA polymerase และ SP6 RNA polymerase ตามลำดับ เพื่อใช้ในการจำลอง dsRNA ของเชื้อโรตาไวรัส จากผลการทดสอบ sensitivity พบว่า multiplex RT-PCR นี้มีค่า sensitivity ต่อการเพิ่มจำนวน dsRNA ของ VP4 , G1, G2 และ G9 เป็น 10^3, 10^3, 10^2 และ 10^2 copies/µl ตามลำดับ และจากผลการทดสอบ specificity ต่อเชื้อไวรัสที่พบในระบบทางเดินอาหารที่มีเก็บอยู่ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ได้แก่ Astrovirus, Adenoverus และ Human Bocavirus ไม่พบการเกิด cross reaction แต่อย่างใด

หลังจากการทดสอบ sensitivity และ specificity ของ Multiplex RT-PCR ต่อ common G-genotype นี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบกับ dsRNA ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโรตาไวรัสในขั้นตอนศึกษาความชุกทั้งหมด 158 ตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบเมื่อนำมาเปรียบกับผลที่ได้ในขั้นตอนการศึกษาความชุกพบว่า ให้ผลตรงกันคิดเป็น 92.04% , false negative 1.90% และไม่สามารถแปลผลได้ 5.69% โดย ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็น false negative นั้นอาจเกิดจาก dsRNA ในตัวอย่างมีปริมาณน้อย หรือ การสกัด RNA ไม่ดีพอ เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรตาไวรัสเป็นตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่ปั่นเอาตะกอนออกแล้ว ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบเพื่อหา House keeping gene เพื่อใช้เป็น internal control ของตัวอย่างนั้นๆได้ สำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถแปลผลได้นั้น เนื่องจากพบ band ที่ใช้ในการบอก genotype G1 G2 G9 อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ไม่พบ band ที่ตำแหน่งของ VP4 gene ซึ่งใช้ในการบ่งชี้ผลบวกต่อเชื้อโรตาไวรัส แต่เมื่อผู้วิจัยทำการตัดเจลที่มีขนาดผลิตผลที่ต้องการไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ให้ผลจีโนไทป์ที่ตรงกันกับการศึกษาความชุก ซึ่งความผิดพลาดที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากการทดสอบ sensitivity ของ VP4 gene มีความไวที่ 10^3 ในขณะที่ G1 G2 และ G9 มีความไวที่สูงกว่า ซึ่งจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาให้การตรวจแต่ละจีโนไทป์มีความไวที่เท่ากันต่อไปในอนาคต

จากการเพิ่มขึ้นของเชื้อโรตาไวรัสจีโนไทป์ G12 และ uncommon genotypes ต่างๆ ที่พบในขั้นตอนการศึกษาความชุก แสดงให้เห็นว่า การพัฒนา multiplex RT-PCR ต่อจีโน

ไทป์ของเชื้อโรตาไวรัสสายพันธุ์ที่พบบ่อย เช่น G1, G2 และ G9 นั้นอาจไม่เพียงพอ ดังนั้น การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยจีโนไทป์ที่หลากหลายจึงเป็นสิ่งจำเป็น และควรคำนึงถึง ไม่เพียงแต่การพัฒนาการตรวจด้วยวิธีทาง multiplex RT-PCR เท่านั้น นอกจากนี้ การพัฒนาวัคซีนเพื่อต้านเชื้อโรตาไวรัสอาจจำเป็นต้องคำนึงถึงความหลากหลายทางสายพันธุ์ และการเกิดโรตาไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ดื้อต่อวัคซีน ซึ่งจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวัง และศึกษาต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

(1) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rotavirus surveillance-worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008 Nov 21;57(46):1255-7.

(2) Estes MK and Kapikian AZ, Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM and Griffin DE, Editors, *Virology* (4 th ed.), Lippincott. Williams and Wilkins, Philadelphia, PA (2001):1787-1833.

(3) Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):304-6.

(4) Nelson EA, Bresee JS, Parashar UD, Widdowson MA, Glass RI; Asian Rotavirus Surveillance Network. Rotavirus epidemiology: the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Vaccine*. 2008 Jun 19;26(26):3192-6.

(5) Fragoso M, Kumar A, Murray DL. Rotavirus in nasopharyngeal secretions of children with upper respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:87-8.

(6) Solberg OD, Hasing ME, Trueba G, Eisenberg JN. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus.*Virology*. 2009 Mar 1;385(1):58-67.

(7) Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jul;5(7):529-39.

(8) Khamrin P, et al. Changing pattern of rotavirus G genotype distribution in Chiang Mai, Thailand from 2002 to 2004: decline of G9 and reemergence of G1 and G2. *J Med Virol*. 2007 Nov;79(11):1775-82.

(9) Samajdar S, et al. Increase in prevalence of human group A rotavirus G9 strains as an important VP7 genotype among children in eastern India. *J Clin Virol.* 2008 Nov;43(3):334-9.

(10) Rahman M, et al. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jan;13(1):18-24.

(11) Carvalho-Costa FA, et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jan;15(1):95-7.

(12) Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Sinha M, Naik TN, Kobayashi N. Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P[14] and G10P[14] strains. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2751-3.

(13) Martella V, et al. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology*. 2005 Jun 20;337(1):111-23.

(14) Maneekarn N, Ushijima H. Epidemiology of rotavirus infection in Thailand. *Pediatr Int*. 2000 Aug;42(4):415-21. Review.

(15) Jiraphongsa C, et al; Rotavirus Surveillance Project Thailand Study Group. Epidemiology and burden of rotavirus diarrhea in Thailand: results of sentinel surveillance. *J Infect Dis*. 2005 Sep 1;192 Suppl 1:S87-93.

(16) Theamboonlers A, Veravigrom M, Yambangyang O, Trairatvorakul P, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. The incidence of rotavirus a isolates of G genotype in Thailand in 2002-2004. *Acta Virol*. 2005;49(2):111-5.

(17) Theamboonlers A, Bhattarakosol P, Chongsrisawat V, Sungkapalee T, Wutthirattanakowit N, Poovorawan Y. 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 Apr;36(2):289-98.

(18) Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*. 1982 Sep;16(3):473-7.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(19) Husain M, Seth P, Broor S. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in feces from children with acute gastroenteritis. *Arch Virol*. 1995;140(7):1225-33.

(20) Shampo MA, Kyle RA. Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Mayo Clin Proc*. 2002 Jul;77(7):606.

(21) Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gómara M, Gray J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. *Br Med Bull*. 2009;90:37-51.

(22) Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev*. 1989 Dec;53(4):410-49.

(23) Carter JB and Saunders VA. Reoviruses (and other dsRNA viruses). In: *Virology: Principles and Applications*, John Wiley and Sons Ltd, England (2007):147-156.

(24) Krishnan T, Sen A, Choudhury JS, Das S, Naik TN, Bhattacharya SK. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India. *Lancet*. 1999 Jan 30;353(9150):380-1.

(25) Gray J, et al. Rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 May;46 Suppl 2:S24-31.

(26) Komoto S, Sasaki J, Taniguchi K. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4646-51.

(27) Patel MM, de Oliveira LH, Bispo AM, Gentsch J, Parashar UD. Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 May;14(5):863-5.

(28) Noppornpanth S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Predominant human rotavirus genotype G1P[8] infection in infants and children in Bangkok, Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2001 Mar;19(1):49-53.

(29) Dey SK, et al. Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep;9(5):955-61

(30) Mishra V, Awasthi S, Nag VL, Tandon R. Genomic diversity of group A rotavirus strains in patients aged 1-36 months admitted for acute watery diarrhoea in northern India: a hospital-based study. *Clin Microbiol Infect*. 2009 May 16.

(31) Dey SK, et al. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh.*Emerg Infect Dis*. 2009 Jan;15(1):91-4.

(32) Santosham M, Nelson EA, Bresee JS. Implementing rotavirus vaccination in Asia. *Vaccine*. 2007 Nov 1;25(44):7711-6.

(33) Ward RL, et al. Reductions in cross-neutralizing antibody responses in infants after attenuation of the human rotavirus vaccine candidate 89-12. *J Infect Dis*. 2006 Dec 15;194(12):1729-36.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris–base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	กรัม
1 x TBE	200	มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4.0 $^{\circ}$c

5. DEPC water

DEPC	0.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำไป incubate ที่ 37 $^{\circ}$c นาน 12 ชั่วโมง แล้ว นำไป autoclave

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plate

Agar	1.5	กรัม
Tryptone	1.0	กรัม
Yeast Extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch^2, 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น จากนั้นเติม ampicillin 100 mg/ml 100 µl เทใส่ plate ละ 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จน media แข็ง เติม IPTG 250 mg/ml 4 µl และ X-Gal 50 mg/ml 15 µl spread ให้ทั่ว plate จนแห้ง

7. LB broth/ampicillin

Tryptone	1.0	กรัม
Yeast Extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch^2, 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น จากนั้นเติม ampicillin 100 mg/ml 100 µl

8. Soc medium

Tryptone	2.0	กรัม
Yeast Extract	0.5	กรัม
1 M NaCl	1.0	กรัม
1 M KCl	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch^2, 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็น จากนั้นเติม 2M Mg^{2+} 1 มิลลิลิตร และ 2M glucose 1 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

รายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

No.	Code	Gender	Collection Date	Age	Genotype	
					G	P
1	CU030-BK/07	M	Oct-07	1 ปี	G9	P[8]
2	CU095-BK/07	M	Nov-07	1 ปี	G9	P[8]
3	CU098-BK/07	F	Dec-07	1 ปี	G9	P[8]
4	CU103-BK/08	F	Jan-08	1 ปี	G1	P[8]
5	CU108-BK/08	M	Jan-08	7 เดือน	G9	P[8]
6	CU109-BK/08	M	Jan-08	4 เดือน	G9	P[8]
7	CU110-BK/08	M	Jan-08	5 ปี	G2	P[4]
8	CU112-BK/08	M	Jan-08	2 ปี	G1	P[8]
9	CU121-BK/08	M	Jan-08	7 เดือน	G9	P[8]
10	CU128-BK/08	M	Jan-08	1 ปี	G2	P[4]
11	CU133-BK/08	F	Jan-08	1 ปี	G9	P[8]
12	CU140-BK/08	M	Jan-08	6 เดือน	G9	P[8]
13	CU159-KK/07	F	Dec-07	8 เดือน	G1	P[8]
14	CU161-KK/07	F	Dec-07	3 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
15	CU163-KK/07	M	Dec-07	1 ปี 1 เดือน	G1	P[8]
16	CU164-KK/07	M	Dec-07	2 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
17	CU169-KK/07	M	Dec-07	7 เดือน	G1	P[8]
18	CU175-KK/08	M	Jan-08	3 ปี 5 เดือน	G1	P[8]
19	CU182-KK/08	F	Jan-08	1 ปี 5 เดือน	G1	P[8]
20	CU183-KK/08	F	Jan-08	9 เดือน	G1	P[8]
21	CU185-KK/08	F	Jan-08	2 ปี	G1	P[8]
22	CU188-KK/08	F	Jan-08	1 ปี	G1	P[8]
23	CU190-KK/08	F	Jan-08	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
24	CU192-KK/08	M	Jan-08	1 ปี 4 เดือน	G1	P[8]
25	CU194-KK/08	M	Jan-08	1 ปี	G1	P[8]
26	CU195-KK/08	M	Jan-08	1 ปี 6 เดือน	G1	P[8]
27	CU197-KK/08	M	Jan-08	1 ปี	G1	P[8]
28	CU198-KK/08	M	Feb-08	1 ปี	G1	P[8]
29	CU199-BK/08	M	Feb-08	3 ปี	G9	P[8]
30	CU200-BK/08	F	Feb-08	1 ปี	G9	P[8]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

31	CU201-BK/08	M	Feb-08	3 ปี	G9	P[8]
32	CU205-KK/08	F	Feb-08	4 ปี	G1	P[8]
33	CU206-KK/08	F	Feb-08	7 เดือน	G9	P[8]
34	CU208-KK/08	M	Feb-08	10 เดือน	G1	P[8]
35	CU209-KK/08	F	Mar-08	5 ปี	G2	P[4]
36	CU210-KK/08	M	Feb-08	1 ปี	G9	P[8]
37	CU211-KK/08	M	Feb-08	5 เดือน	G1	P[8]
38	CU212-KK/08	F	Feb-08	8 เดือน	G2	P[4]
39	CU213-KK/08	F	Feb-08	5 เดือน	G1	P[8]
40	CU215-KK/08	M	Feb-08	1 ปี	G2	P[4]
41	CU217-KK/08	M	Feb-08	1 ปี 8 เดือน	G9	P[8]
42	CU218-KK/08	M	Feb-08	7 ปี	G1	P[8]
43	CU231-KK/08	M	Feb-08	5 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
44	CU234-KK/08	M	Feb-08	1 ปี 1 เดือน	G9	P[8]
45	CU235-KK/08	F	Mar-08	2 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
46	CU236-KK/08	M	Mar-08	11 เดือน	G9	P[8]
47	CU237-KK/08	F	Mar-08	3 ปี 6 เดือน	G1	P[8]
48	CU238-KK/08	F	Mar-08	2 ปี 4 เดือน	G9	P[8]
49	CU240-KK/08	F	Mar-08	1 ปี 4 เดือน	G1	P[8]
50	CU241-KK/08	M	Mar-08	1 ปี 11 เดือน	G1	P[8]
51	CU242-KK/08	F	Mar-08	1 ปี 11 เดือน	G9	P[8]
52	CU243-KK/08	F	Mar-08	1 ปี	G2	P[4]
53	CU244-KK/08	M	Mar-08	4 เดือน	G9	P[8]
54	CU246-KK/08	M	Mar-08	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
55	CU247-KK/08	M	Mar-08	8 เดือน	G1	P[8]
56	CU248-KK/08	M	Mar-08	9 เดือน	G9	P[8]
57	CU249-KK/08	M	Mar-08	1 ปี 3 เดือน	G9	P[8]
58	CU250-KK/08	F	Mar-08	1 ปี 5 เดือน	G9	P[8]
59	CU255-KK/08	F	Mar-08	8 เดือน	G9	P[8]
60	CU257-KK/08	M	Mar-08	1 ปี 2 เดือน	G9	P[8]
61	CU270-KK/08	M	Apr-08	6 เดือน	G1	P[8]
62	CU272-KK/08	F	Apr-08	1 ปี 6 เดือน	G1	P[8]
63	CU302-NR/08	M	Jan-08	7 เดือน	G9	P[8]
64	CU303-NR/08	F	Feb-08	4 เดือน	G1	P[8]
65	CU304-NR/08	M	Feb-08	1 ปี 4 เดือน	G2	P[4]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

66	CU305-NR/08	M	Mar-08	11 เดือน	G9	P[8]
67	CU306-NR/08	M	Mar-08	1 ปี 5 เดือน	G1	P[8]
68	CU308-NR/08	F	Mar-08	1 ปี 4 เดือน	G1	P[8]
69	CU310-NR/08	M	Mar-08	1 ปี 7 เดือน	G9	P[8]
70	CU312-NR/08	M	Apr-08	1 ปี 5 เดือน	G9	P[8]
71	CU314-NR/08	M	Apr-08	2 ปี 6 เดือน	G9	P[8]
72	CU319-NR/08	F	Apr-08	6 เดือน	G9	P[8]
73	CU325-NR/08	M	May-08	6 เดือน	G9	P[8]
74	CU326-NR/08	F	May-08	1 ปี	G9	P[8]
75	CU328-NR/08	M	May-08	11 เดือน	G9	P[8]
76	CU329-NR/08	F	May-08	3 เดือน	G9	P[8]
77	CU331-NR/08	M	Jul-08	1 ปี 6 เดือน	G12	P[6]
78	CU365-KK/08	M	Nov-08	1 ปี 2 เดือน	G3	P[9]
79	CU373-BK/08	M	Dec-08	2 ปี	G1	P[8]
80	CU374-BK/08	M	Dec-08	8 ปี	G1	P[8]
81	CU375-BK/08	M	Dec-08	1 ปี	G9	P[8]
82	CU379-BK/08	M	Dec-08	6 ปี	G2	P[4]
83	CU382-BK/08	F	Jan-09	1 ปี	G2	P[4]
84	CU383-BK/08	M	Dec-08	10 เดือน	G1	P[8]
85	CU389-BK/09	M	Jan-09	1 ปี	G2	P[4]
86	CU393-BK/09	M	Jan-09	2 ปี	G2	P[4]
87	CU398-BK/09	F	Jan-09	1 ปี	G1	P[8]
88	CU399-BK/09	M	Jan-09	1 ปี	G1	P[8]
89	CU403-BK/09	M	Jan-09	1 ปี	G1	P[8]
90	CU404-BK/09	F	Jan-09	1 ปี	G1	P[8]
91	CU406-BK/09	F	Jan-09	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
92	CU409-BK/09	M	Jan-09	1 ปี	G2	P[4]
93	CU411-BK/09	M	Jan-09	6 ปี	G1	P[8]
94	CU413-BK/09	F	Jan-09	7 เดือน	G1	P[8]
95	CU415-BK/09	M	Jan-09	3 เดือน	G1	P[8]
96	CU416-BK/09	M	Jan-09	8 เดือน	G2	P[4]
97	CU419-BK/09	F	Feb-09	1 ปี	G2	P[4]
98	CU420-BK/09	M	Feb-09	1 ปี	G1	P[8]
99	CU421-BK/09	M	Feb-09	3 ปี	G2	P[4]
100	CU424-BK/09	F	Feb-09	1 ปี	G2	P[4]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

101	CU426-KK/08	F	Dec-08	10 เดือน	G1	P[8]
102	CU430-KK/08	F	Dec-08	1 ปี 8 เดือน	G2	P[4]
103	CU434-KK/09	M	Jan-09	9 เดือน	G2	P[4]
104	CU435-KK/09	M	Jan-09	1 ปี 2 เดือน	G1	P[8]
105	CU436-KK/09	F	Jan-09	1 ปี 9 เดือน	G2	P[4]
106	CU438-KK/09	M	Jan-09	1 ปี 9 เดือน	G2	P[4]
107	CU440-KK/09	F	Jan-09	4 เดือน	G1	P[8]
108	CU441-KK/09	F	Jan-09	1 ปี 2 เดือน	G1	P[8]
109	CU442-KK/09	F	Jan-09	7 เดือน	G2	P[4]
110	CU444-KK/09	F	Jan-09	1 ปี 9 เดือน	G3	P[8]
111	CU446-KK/09	F	Jan-09	10 เดือน	G2	P[4]
112	CU447-KK/09	M	Jan-09	2 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
113	CU449-KK/09	F	Feb-09	7 เดือน	G1	P[8]
114	CU450-KK/09	M	Feb-09	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
115	CU453-KK/09	M	Feb-09	1 ปี 2 เดือน	G1	P[8]
116	CU454-KK/09	M	Feb-09	11 เดือน	G1	P[8]
117	CU455-KK/09	M	Feb-09	4 ปี	G1	P[8]
118	CU456-KK/09	M	Feb-09	1 ปี 3 เดือน	G2	P[4]
119	CU457-KK/09	M	Feb-09	4 เดือน	G1	P[8]
120	CU459-KK/09	M	Feb-09	1 ปี	G1	P[8]
121	CU460-KK/09	F	Feb-09	1 ปี 4 เดือน	G12	P[8]
122	CU463-KK/09	M	Feb-09	5 เดือน	G1	P[8]
123	CU466-KK/09	M	Feb-09	2 ปี 7 เดือน	G2	P[4]
124	CU468-KK/09	M	Feb-09	11 เดือน	G1	P[8]
125	CU470-KK/09	F	Feb-09	8 เดือน	G1	P[8]
126	CU473-BK/09	M	Feb-09	1 ปี 8 เดือน	G2	P[4]
127	CU474-BK/09	M	Feb-09	1 ปี	G1	P[8]
128	CU476-BK/09	M	Feb-09	1 ปี	G2	P[4]
129	CU481-BK/09	M	Feb-09	1 ปี	G12	P[8]
130	CU482-BK/09	F	Feb-09	6 เดือน	G2	P[4]
131	CU483-BK/09	M	Feb-09	6 เดือน	G2	P[4]
132	CU485-BK/09	M	Feb-09	3 ปี	G1	P[8]
133	CU487-BK/09	M	Mar-09	2 ปี	G2	P[4]
134	CU492-BK/09	F	Mar-09	1 ปี	G1	P[8]
135	CU497-BK/09	F	Mar-09	10 เดือน	G2	P[4]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

136	CU505-KK/09	F	Feb-09	1 ปี 4 เดือน	G1	P[8]
137	CU508-KK/09	M	Feb-09	1 ปี 3 เดือน	G1	P[8]
138	CU509-KK/09	M	Feb-09	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
139	CU510-KK/09	F	Feb-09	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
140	CU512-KK/09	M	Feb-09	1 ปี 8 เดือน	G1	P[8]
141	CU517-KK/09	M	Feb-09	3 ปี 2 เดือน	G1	P[8]
142	CU519-KK/09	M	Feb-09	7 เดือน	G1	P[8]
143	CU533-KK/09	M	Mar-09	2 ปี 10 เดือน	G1	P[8]
144	CU537-KK/09	M	Mar-09	1 ปี 4 เดือน	G1	P[8]
145	CU574-BK/09	M	Apr-09	9 เดือน	G2	P[4]
146	CU575-BK/09	M	Apr-09	9 เดือน	G2	P[4]
147	CU579-BK/09	F	May-09	2 เดือน	G1	P[8]
148	CU581-BK/09	M	May-09	1 เดือน	G1	P[8]
149	CU606-TK/09	M	Jan-09	2 ปี 2 เดือน	G12	P[8]
150	CU607-TK/09	F	Jan-09	1 ปี 2 เดือน	G12	P[8]
151	CU608-TK/09	M	Jan-09	2 ปี 5 เดือน	G12	P[8]
152	CU609-TK/09	F	Jan-09	2 ปี 2 เดือน	G12	P[8]
153	CU610-TK/09	M	Jan-09	1 ปี 1 เดือน	G12	P[8]
154	CU611-TK/09	F	Jan-09	1 ปี 10 เดือน	G1	P[8]
155	CU613-TK/09	F	Jan-09	2 ปี 5 เดือน	G12	P[8]
156	CU615-TK/09	M	Jan-09	1 ปี 4 เดือน	G12	P[8]
157	CU616-TK/09	M	Jan-09	2 ปี 5 เดือน	G12	P[8]
158	CU617-TK/09	F	Mar-09	2 ปี 2 เดือน	G1	P[8]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการ submitted ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรตาไวรัสที่ใช้ในการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic tree ทั้งหมดของการศึกษาครั้งนี้ลงใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยได้รับ accession number GQ996730-GQ996935

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกมลวรรณ คณานุรักษ์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Kamonwan Khananurak

อายุ 25 ปี **เกิด** 12 มีนาคม 2527

สัญชาติ ไทย **เชื้อชาติ** ไทย **ศาสนา** พุทธ

สถานภาพ โสด

สถานที่เกิด โรงพยาบาลรามาธิบดี จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน 51/124 ซอย3 หมู่บ้านร่มสุขวิลล่า2 ถ.รามคำแหง แขวงสะพานสูง เขตสะพานสูง กรุงเทพมหานคร 10240

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคนิคการแพทย์ จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ.2549

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2550

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย