การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ human enterovirus 71 และ coxsackievirus A16
ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นโรคมือเท้าปาก ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2553

นางสาวจิรัชญา พื้นผา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENOME CHARACTERIZATION OF HUMAN ENTEROVIRUS 71 AND COXSACKIEVIRUS A16 IN THAI PEDIATRIC PATIENTS WITH HAND-FOOT-AND-MOUTH DISEASE DURING 2009-2010.

Miss Jiratchaya Puenpa

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ human enterovirus 71 และ coxsackievirus A16 ในผู้ป่วยเด็กไทยที่ เป็นโรคมือเท้าปาก ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2553
โดย	นางสาวจิรัชญา พื้นผา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สุชีรา ฉัตรเพริดพราย)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิรัชญา พื้นผา : การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ human enterovirus 71 และ coxsackievirus A16 ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นโรคมือเท้าปาก ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2553. (GENOME CHARACTERIZATION OF HUMAN ENTEROVIRUS 71 AND COXSACKIEVIRUS A16 IN THAI PEDIATRIC PATIENTS WITH HAND-FOOT-AND-MOUTH DISEASE DURING 2009-2010.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ, 76 หน้า.

เชื้อ human enterovirus 71 (HEV-71) และ coxsackievirus A16 (CV-A16) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุหลักที่ก่อโรคมือ เท้า ปาก สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ A, สายพันธุ์ B และ สายพันธุ์ C การติดเชื้อ HEV-71 อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงทางระบบประสาทและเป็นสาเหตุทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งตรงข้ามกับการติดเชื้อ CV-A16 ผู้ป่วยมักมีอาการไม่รุนแรงและหายได้เอง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในประเทศไทย และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 แต่ละสายพันธุ์นำมาเปรียบเทียบกัน ผลการศึกษาที่ได้พบว่าจากจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ HEV-71 3 ราย มีค่าความชุกเท่ากับ 6% และเชื้อ CV-A16 25 ราย มีค่าความชุกเท่ากับ 50% โดยจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด พบว่า CV-A16-C เป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดมากในประเทศไทย ผลจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าจัดเป็น HEV71-B5, HEV71-C1 และ HEV71-C4 ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลในส่วน coding sequence พบว่า HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณ VP1, VP2 และ VP3 การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนใน VP1 ของ CV-A16 น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ HEV-71 การวิเคราะห์ใน 5΄-UTR พบว่า ทั้ง HEV-71 และ CV-A16 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในลักษณะเป็นกลุ่มเกิดขึ้นในส่วนที่เป็น IRES นอกจากนี้พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ finger domain ของ เอนไซม์ 3D RNA-dependent RNA polymerase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

5274759530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS : HUMAN ENTEROVIRUS 71 / COXSACKIEVIRUS A16 / HAND-FOOT-AND-MOUTH / GENOME CHARACTERIZATION

JIRATCHAYA PUENPA : GENOME CHARACTERIZATION OF HUMAN ENTEROVIRUS 71 AND COXSACKIEVIRUS A16 IN THAI PEDIATRIC PATIENTS WITH HAND-FOOT-AND-MOUTH DISEASE DURING 2009-2010. ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 76 pp.

Human enterovirus 71 (HEV-71) and coxsackievirus A16 (CV-A16) are the major etiological agent of hand-foot-and-mouth disease (HFMD). Both of them are genetically divided by molecular analysis into three groups, A, B, and C. Several studies showed that HEV-71 related HFMD has been linked to major outbreaks involving infections with severe neurological complications and death. Based on amplification of the partial VP1 region by semi-nested PCR, 3 and 25 of 50 samples obtained from 50 hospitalized pediatric patients during 2009 and 2010 were positive for HEV-71 and CV-A16, respectively. From this result, indicated an annual prevalence of 6% and 50%. Most of all positive samples were belonged to CV-A16-C. In a phylogenetic tree, based on the complete VP1 gene sequence, all three HEV-71 strains grouped into the B5, C1 and C4 genotype. The genetic heterogeneity of these strains culminated in amino acid substitutions within the VP1, VP2 and VP3 regions. The changes of amino acids sequences of the VP1 regions of CV-A16 were restored. The sequence analysis of HEV-71 and CV-A16 strains revealed that there are nucleotide changes clustered in the internal ribosome entry site (IRES) element of the 5′-untranslated region (5′-UTR). This amino acid difference is located in the finger domain of the viral RNA-dependent RNA polymerase 3D ($3D^{pol}$).

Field of Study : Medical Science .... Student's Signature Jiratchaya Puenpa

Academic Year : 2010 .... Advisor's Signature Yong Poov

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัยเพียบพร้อม ได้ชี้นำแนวความคิดของการเป็นนักวิจัยที่ดี พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำคำปรึกษาอันมีประโยชน์ และคุณค่ายิ่งต่องานวิจัยนี้มาโดยตลอด ตลอดจนให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญามหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการในขณะที่ทำการวิจัย คอยชี้แนะแนวทางการใช้เครื่องมือให้ถูกต้อง ซึ่งมีประโยชน์ต่อผู้ทำวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจตั้งแต่เริ่มเข้ารับการศึกษาจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ.. ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง.. ฌ

สารบัญภาพ.. ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.. ฎ

บทที่ 1 บทนำ.. 1

- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.. 1
- คำถามงานวิจัย.. 2
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.. 2
- ขอบเขตของการวิจัย.. 3
- ข้อจำกัดของการวิจัย.. 4
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.. 4
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 4
- วิธีดำเนินการวิจัย.. 5
- ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.. 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 7

- แนวคิดและทฤษฏี.. 7
- ทฤษฏีการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR.. 9
- เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 11
- อนุกรมวิธานของเชื้อ Human enterovirus.. 11
- ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Human enterovirus.. 13
- วงชีวิตของเชื้อ Human enterovirus.. 20
- ลักษณะอาการทางคลินิกและการรักษา.. 24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.. 27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- รูปแบบการวิจัย.. 27
- ประชากรศึกษา.. 27
- การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.. 27
- เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.. 28
- สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.. 29
- วิธีดำเนินการวิจัย.. 30
- การเก็บรวบรวมข้อมูล.. 37
- การวิเคราะห์ข้อมูล... 39
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.. 40
ส่วนที่ 1 ผลศึกษาระบาดวิทยาและการจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในประเทศไทย.. 40
- การตรวจวินิจฉัยเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ด้วยวิธี Semi-nested PCR.......... 40
- การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของยีน VP1 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis... 41
- การระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16.. 45
ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาข้อมูล coding sequence ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16. 46
- การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis................... 46
- ลักษณะทั่วไปของ complete coding sequence ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16.. 49
- ผลการวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับ HEV-71 สายพันธุ์รุนแรงบนโปรตีน capsid.. 52
- ผลการวิเคราะห์บนโปรตีน VP1.. 55
- ผลการวิเคราะห์ในส่วน 5´-UTR และ 3´-UTR.. 57
- ผลการวิเคราะห์ในส่วน $3D^{pol}$.. 59
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย... 61
รายการอ้างอิง.. 67
ภาคผนวก.. 74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 76

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 serotype ต่างๆที่พบใน HEV ทั้ง 4 สปีชีส์.. 9

2 Genus ที่จัดอยู่ในตระกูลของ *Picornaviridae* และ natural hosts.................. 12

3 ปริมาตรของสารต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ PCR.. 32

4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับการทำ PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีน GAPDH และการตรวจการติดเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 (VP1).. 33

5 สภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR ของ GAPDH และ semi-nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ HEV-71 และ CV-A16.. 33

6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ HEV-71..................................... 35

7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ CV-A16.................................... 36

8 สภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR.. 37

9 ลักษณะทั่วไปของ coding sequence และขนาด viral protein ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16.. 51

10 ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณตัดจำเพาะระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16.. 53

11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน capsid (VP2, VP3 และ VP1).. 56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการทำ PCR..	11
2	จีโนมของไวรัสมี 1ORF ประกอบด้วย 5'UTR และ 3'UTR..............................	13
3	โครงสร้างทุติยภูมิของ IRES ทั้งสี่ชนิดของ picornavirus................................	15
4	ลักษณะโปรตีน capsid ของ human enterovirus..	17
5	แผนผังโครงสร้างจีโนมของ picornavirus, โปรตีนแต่ละชนิดและหน้าที่หลักของแต่ละโปรตีน..	16
6	โครงสร้างของ 3'UTR ของ enterovirus..	20
7	กระบวนการ replication ของเชื้อ HEV ในเซลล์เจ้าบ้าน................................	22
8	ตัวอย่างผลการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหาเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ด้วยวิธี semi-nested PCR..	41
9	Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ HEV-71และ CV-A16....	43
10	Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ HEV-71.......................	44
11	การระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16..	46
12	การทำ phylogenetic analysis เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ polyprotein.....................	49
13	ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity ของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสพันธุกรรม ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16............................	51
14	ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีน capsid VP1......................	58
15	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IRES domain V, การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ IRES domain V และ 3´-UTR..	60
16	ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ finger domain ของ $3D^{pol}$......................................	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
aa	Amino Acid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base Pair
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CNS	Central nervous system
CPE	Cytopathic effect
CV-A16	Coxsackievirus A16
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
HEV-71	Human Enterovirus 71
HFMD	Hand-Foot-and-Mouth Disease
HRV	Human Rhinovirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus
IRES	Internal ribosome entry site
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	Messenger ribonucleic acid
ml	Milliliter (10^{-3} L)
µl	Microliter (10^{-6} L)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	ความหมาย
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
nt	Nucleotide
ORF	Open reading frame
PABP	PolyA-binding protein
PCBP	Poly(rC)-binding protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
RD cell	Rhabdomyosarcoma cell
RNA	Ribonucleic Acid
RNP	ribonucleoprotein complex
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
Sequin	DNA Sequence Submission and Update Tool
UTR	Untranslated Region
VP	Viral Capsid Protein

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมือ เท้า ปาก (Hand-Foot-and-Mouth Disease) ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ *Enterovirus* พบได้บ่อยในเด็กเล็ก โดยเฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี[1] เชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของโรคมือ เท้า ปากจะแตกต่างกันในพื้นที่ที่มีการระบาดที่ต่างกัน ในประเทศเขตหนาวจะพบช่วงฤดูร้อนและต้นฤดูใบไม้ร่วง ประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม แต่ช่วงเขตร้อนชื้นรวมทั้งประเทศไทยพบได้ตลอดทั้งปี แต่จะพบการระบาดมากในช่วงฤดูฝนและช่วงที่มีอากาศร้อนชื้น[2] ซึ่งเชื้อที่พบว่าเป็นสาเหตุบ่อยที่สุดโดยทั่วไป คือ coxsackievirus A16 (CV-A16) และ human enterovirus 71 (HEV-71) แต่เชื้อที่พบในการระบาดแล้วผู้ป่วยมักมีอาการรุนแรง พบผู้เสียชีวิตและพิการตามมาได้บ่อยคือ HEV-71[3] - [6]

Coxsackievirus A16 (CV-A16) และ human enterovirus 71 (HEV-71) เข้าสู่ร่างกายได้ทางระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจส่วนต้นเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อไวรัสเจริญเติบโตในกระเพาะอาหาร และเนื้อเยื่อของลำไส้ เนื่องจากเชื้อไวรัสสามารถคงทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเอนไซม์ย่อยอาหารต่างๆได้ดี[2] โดยอาการของโรคมือเท้าปากที่พบมากได้แก่ มีอาการไข้ มีผื่นเป็นลักษณะตุ่มน้ำใส หรือเม็ดแดงๆ (papulo-vesicular rash) บริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า และในช่องปาก โดยทั่วไปมีอาการไม่รุนแรงและหายได้เอง แต่ในบางรายที่มีอาการรุนแรง พบภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาท ได้แก่ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (aseptic meningitis), กล้ามเนื้ออ่อนแรงคล้ายโปลิโอ (poliomyelitis like paralysis), ก้านสมองอักเสบ (brainstem encephalitis), สมองน้อยอักเสบ (cerebellitis), สมองและไขสันหลังอักเสบ (encephalomyelitis) และภาวะปอดบวมน้ำ (pulmonary edema)[7] - [9] จะเห็นได้ว่าโรคมือ เท้า ปาก เป็นโรคระบาดที่สำคัญเนื่องจากพบได้บ่อยพอสมควร และมีผู้ป่วยเสียชีวิตและพิการได้ โดยเฉพาะจากเชื้อ HEV-71 ถึงแม้ในประเทศไทยจะยังไม่พบการระบาดที่รุนแรง แต่ก็พบการระบาดในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ปี ค.ศ. 1997 ในประเทศมาเลเซีย, ปี ค.ศ. 1998 และ ปี ค.ศ. 2000 ในประเทศไต้หวัน, ปี ค.ศ. 2000 ในประเทศญี่ปุ่นและสิงคโปร์ และ ปี ค.ศ. 2008 ในประเทศจีน พบผู้ป่วยทั้งสิ้นมากกว่า 25,000 ราย และเสียชีวิตมากกว่า 30 ราย สำหรับการรักษาโรคมือเท้าปากจากเชื้อ CV-A16 และ HEV-71 หากไม่

มีภาวะแทรกซ้อนเป็นโรคที่สามารถหายได้เอง ปัจจุบันไม่มียารักษาที่จำเพาะการรักษาจึงเป็นเพียงการประคับประคองและบรรเทาอาการเท่านั้น

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 โดยการทำ semi-nested PCR และนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในกลุ่มตัวอย่าง และวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ HEV-71 และ CV-A16 แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและการพัฒนายาต้านไวรัสและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพต่อไป

คำถามงานวิจัย

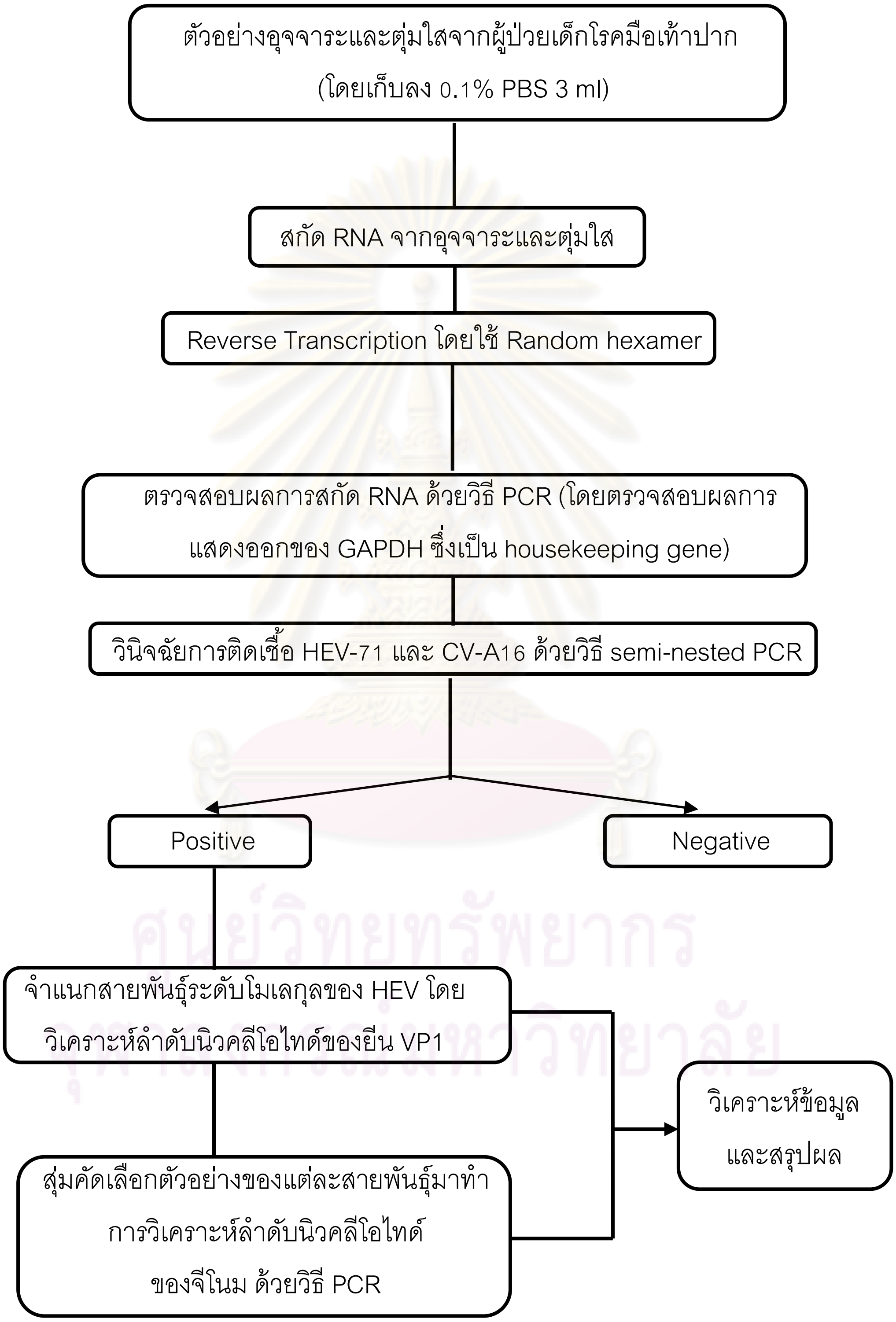
1. ความชุกของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมือเท้าปากในกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่พบในประเทศไทยมีค่าเท่าใด
2. สายพันธุ์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมือเท้าปากที่ระบาดในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ใดและลักษณะทางพันธุกรรมมีความใกล้เคียงกับที่ระบาดในต่างประเทศหรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมือเท้าปากในกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล
2. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมือเท้าปากที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย และวิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างระดับโมเลกุลระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากต่างประเทศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบเขตของการวิจัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้มีปริมาตรของสารตัวอย่างมีจำนวนจำกัด จึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำหรือทำการทดลองเพิ่มเติมในบางส่วนได้
2. เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง เป็นส่วนที่เหลือจากงานตรวจบริการเพื่อหาการติดเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 จึงไม่มีการเก็บตัวอย่างเพื่อที่จะนำข้อมูลมาเปรียบระหว่างกลุ่มที่ควบคุม(กลุ่มคนปกติ) กับ กลุ่มคนที่ติดเชื้อไวรัส HEV-71 และ CV-A16

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Species คือ สายพันธุ์ของเชื้อ HEV ในอดีตจำแนกด้วยวิธีทาง serology เป็นวิธีที่อาศัยการเข้าจับกัน อย่างจำเพาะเจาะจงระหว่าง antigen กับ antibody ไวรัสที่จัดว่ามีความแตกต่างกันจะถูกจำแนกออกเป็น serotype เชื้อ HEV ประกอบด้วยไวรัส 90 serotypes โดยปัจจุบันการจำแนกเชื้อด้วยวิธีเดิมมีข้อจำกัด จึงนิยมใช้การถอดรหัสทางพันธุกรรมของยีนที่สร้างโปรตีน capsid (VP1) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งให้ผลที่สะดวกกว่าการทำ serology test

Semi-nested PCR คือ เทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค nested PCR ซึ่งจะมีการใช้จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่น้อยกว่า ซึ่งวิธีนี้จะให้ค่าความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ที่สูงกว่าเทคนิค PCR ธรรมดา

Phylogenetic analysis คือ การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เพื่อจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามลำดับความสัมพันธุ์เชิงวิวัฒนาการ โดยนำข้อมูลมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ phylogenetic relation

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

(1) ทำให้ทราบถึงข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HEV-71 และ CV-A16 โดยเฉพาะไวรัส CV-A16 ซึ่งมีข้อมูลที่รายงานในฐานข้อมูลอย่างจำกัด

(2) สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผน ป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ต่อไปได้

(3) ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง โดยตีพิมพ์ในวารสารที่เกี่ยวกับด้านไวรัสวิทยา หรือโรคอุบัติใหม่ เช่น Virus Research, Infection หรือ Emerging Infectious Diseases

(4) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จะถูกนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทำการเก็บตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid จากผู้ป่วย ใส่ลงใน 0.1% phosphate Buffered Saline (PBS) และเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70ºC
2. สกัด RNA จากตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid โดยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction ของบริษัท RBC Bioscience
3. การศึกษาความชุกของเชื้อไวรัส HEV-71 และ CV-A16 ในประเทศไทย
   - 3.1 ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HEV-71 และ CV-A16 ในส่วนยีนควบคุมการสร้าง viral casid VP1 ด้วยวิธี semi-nested PCR
   - 3.2 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน VP1 ด้วยวิธี direct DNA sequencing
   - 3.3 จัดจำแนกสายพันธุ์โดยการทำ phylogenetic tree และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้
4. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่าง
   - 4.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV-71 และ CV-A16
   - 4.2 ทดสอบหาสภาวะในการทำ PCR ที่เหมาะสม เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ในส่วนยีน VP1 ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน เพื่อนำมาวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศกับต่างประเทศ
2. วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคมือเท้าปาก (Hand-Food-and-Mouth Disease) เป็นหนึ่งในกลุ่มอาการที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส *Enterovirus* มักพบได้บ่อยในเด็กเล็ก โดยเฉพาะเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี เชื้อไวรัสที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคมือเท้า ปากแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่และแต่ละการระบาด ซึ่งเชื้อไวรัสที่พบว่าเป็นสาเหตุหลักคือ human enterovirus 71 (HEV-71) และ coxsackievirus A16 (CV-A16) แต่เชื้อที่พบในการระบาดแล้วผู้ป่วยมักมีอาการรุนแรง พบผู้เสียชีวิตและพิการตามมาได้บ่อยคือ HEV-71[3] - [6] เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายผ่านทางการหายใจเอาละอองในอากาศที่มีเชื้อปนเปื้อน หรือจากการสัมผัสโดยตรงกับสารคัดหลั่งจากจมูก, ลำคอ, น้ำจากในตุ่มใส และอุจจาระของผู้ป่วยซึ่งมีเชื้อไวรัสอยู่ (fecal - oral route)[10] จากการศึกษาเชื้อไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) ใกล้เคียง ได้แก่ ทางเดินหายใจส่วนบน (tonsils , cervical nodes) และ ระบบทางเดินอาหาร (Peyer’s patches, mesenteric nodes) เชื้อไวรัสสามารถเจริญเติบโตได้ในกระเพาะอาหาร และเนื้อเยื่อของลำไส้ เนื่องจากสามารถคงทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเอนไซม์ย่อยอาหารต่างๆได้ดี เมื่อเริ่มมีเชื้อไวรัสในกระแสเลือดทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้ (fever) จากนั้นจะแพร่กระจายไปยังเยื่อบุช่องปาก ผิวหนังบริเวณมือและเท้า ทำให้เกิดลักษณะเป็นตุ่มน้ำใส (vesicular lesion) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการกระจายไปที่หัวใจ (heart) ตับ (liver) หรือระบบประสาทส่วนกลาง (CNS system)ได้ โดยทั่วไปผู้ป่วยมักมีอาการไม่รุนแรงและหายได้เอง แต่ในบางรายที่มีอาการรุนแรงจะพบภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาท ได้แก่ เยื่อหุ้มสมองอักเสบที่ไม่ใช่การติดเชื้อแบคทีเรีย (aseptic meningitis),กล้ามเนื้ออ่อนแรงคล้ายโปลิโอ (acute flaccid paralysis), ก้านสมองอักเสบ (brainstem encephalitis), สมองน้อยอักเสบ (cerebellitis) และ สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) ภาวะแทรกซ้อนระบบปอดและหัวใจ ได้แก่ ปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) และ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบจากเชื้อไวรัส (myocarditis)[11]

จะเห็นได้ว่าโรคมือเท้าปากเป็นโรคระบาดที่สำคัญ เนื่องจากพบได้บ่อยพอสมควรและมีผู้ป่วยเสียชีวิตและพิการได้ โดยเฉพาะจากเชื้อ HEV-71 ถึงแม้ในประเทศไทยจะยังไม่พบการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระบาดที่รุนแรง แต่ก็พบการระบาดในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ปี ค.ศ. 1997 ในประเทศมาเลเซีย, ปี ค.ศ. 1998 และ ปี ค.ศ. 2000 ในประเทศไต้หวัน, ปี ค.ศ. 2000 ในประเทศญี่ปุ่นและสิงคโปร์ และปี ค.ศ. 2008 ในประเทศจีน พบผู้ป่วยทั้งสิ้นมากกว่า 25,000 ราย และเสียชีวิตมากกว่า 30 ราย สำหรับการรักษาหากผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อน จะสามารถหายได้เอง ปัจจุบันไม่มียารักษาการรักษาจึงเป็นเพียงบรรเทาอาการเท่านั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจวิเคราะห์หาสาเหตุของการติดเชื้อ เพื่อใช้เป็นแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคมือ เท้า ปากและการพัฒนายาต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพ

การตรวจวินิจฉัยและการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ human enterovirus (HEV) ในตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยนั้นสามารถทำได้หลายวิธี แต่เดิมการจัดจำแนกสายพันธุ์พิจารณาจากพยาธิกำเนิด (pathogenicity) ที่เกิดขึ้นในมนุษย์และสัตว์ทดลอง และพิจารณาลักษณะที่เปลี่ยนไปของเซลล์ (cytopathic effect : CPE) ใน tissue culture โดยผลจากการจำแนกด้วยวิธีการนี้ทำให้สามารถแบ่ง HEV ออกเป็น 4 กลุ่ม[10] คือ

[1] polioviruses	ประกอบด้วย 3 serotypes	รวมทั้งหมด 60 serotypes
[2] coxsackievirus A	ประกอบด้วย 23 serotypes	
[3] coxsackievirus B	ประกอบด้วย 6 serotypes	
[4] echoviruses	ประกอบด้วย 28 serotypes	

ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 การจำแนกสายพันธุ์ใช้วิธีทาง serology ด้วยการทำ neutralization reaction ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยความจำเพาะของ antibody ที่ได้มาจาก homologous antiserum ต่อ antigen บนอนุภาคไวรัส และเริ่มมีการใช้ชื่อของ HEV เรียงตามลำดับเลข serotype ที่พบก่อน สายพันธุ์แรกที่เริ่มใช้ระบบการตั้งชื่อนี้คือ HEV-68 ผลการจำแนกด้วยวิธีนี้ทำให้สามารถแบ่ง HEV ได้อย่างน้อยที่สุด 90 serotypes และแบ่งออกเป็น 4 สปีชีส์[12] ตามตารางที่ 1 และ poliovirus ถูกจัดอยู่ใน human enterovirus สปีชีส์ C โดยอาศัยความสอดคล้องกันของข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัส[13]

ตารางที่ 1 serotype ต่างๆที่พบใน HEV ทั้ง 4 สปีชีส์[12]

	Serotype
A	CV-A2-8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, EV71, EV76, EV89-92
B	CV-A9,CV-B1-6, E1-7, E9, E11-21, E24-27, E29-33, EV69, EV73, EV74-75, EV77-88, EV93, EV97, EV98, EV100, EV101, EV106, EV107
C	CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19-22, CV-A24, EV95, EV96, EV99, EV102, EV104, EV105, EV109, PV1-3
D	EV68, EV70, EV94

ในปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยตรงด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เนื่องจากข้อจำกัดของระบบการแยกด้วยวิธีทาง serology นี้ต้องใช้เวลานานและมีขั้นตอนมาก[12] ในปี ค.ศ. 1983 Kary Banks Mullis ได้พัฒนาเทคนิค PCR ขึ้น ซึ่งสามารถทำให้การเพิ่มชิ้นส่วน DNA ได้จำเพาะ ง่ายและรวดเร็ว โดยเลียนแบบกระบวนการธรรมชาติที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ก่อนการแบ่งเซลล์ เริ่มจาก DNA เป้าหมายหนึ่งชิ้นหรือเซลล์เดียว ด้วยเทคนิค PCR นี้สามารถเพิ่มจำนวน DNA จำเพาะตามขนาดที่กำหนดให้เป็นล้านชิ้นในหลอดทดลองโดยใช้เวลาไม่นาน

ทฤษฎีการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR

ปัจจัยที่สำคัญของการทำ PCR คือ ต้องรู้ลำดับเบสของที่ปลายทั้งสองด้านของยีนหรือชิ้น DNA ส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อที่จะสามารถสร้างสายนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดประมาณ 20-30 เบส ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) จำนวน 2 เส้น โดยไพรเมอร์แต่ละชนิดจะมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบแต่ละเส้น แต่ละตำแหน่งการจับคู่จะอยู่ด้านข้าง (flanking) ของชิ้น DNA เป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน นั่นคือขนาดและตำแหน่งของ DNA เป้าหมายสามารถกำหนดได้โดยการกำหนดลักษณะและตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้งสอง นอกจากนี้ PCR ยังต้องมีเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งทนต่อความร้อน (thermostable) เป็นตัวช่วยสร้างสาย DNA ใหม่ โดยที่เอนไซม์ DNA polymerase ที่นิยมใช้สกัดได้จากแบคทีเรียที่เติบโตได้ในน้ำพุ

ร้อน แบคทีเรียชนิดนี้มีชื่อเรียกว่า *Thermus aquaticus* จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq* polymerase ซึ่งต้องการใช้ Mg^{2+} เป็นปัจจัยร่วม และนอกจากนี้การทำ PCR ยังต้องการนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) เป็นสารตั้งต้น และมีบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมให้ระบบอยู่ในภาวะที่เหมาะสม

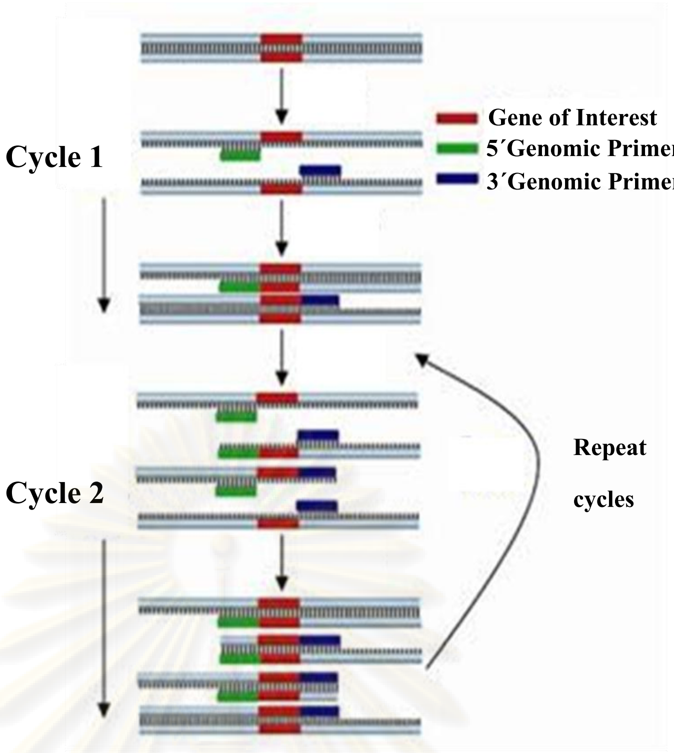
ปฏิกิริยา PCR เป็นปฏิกิริยาที่เป็นรอบ (cycle) โดยนำ DNA ที่มียีนที่เราต้องการเพิ่มจำนวน และปัจจัยที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำลงในเครื่อง (PCR machine) ที่ ถปรับอุณหภูมิขึ้นลงและควบคุม อุณหภูมิให้คงที่ได้ตามเวลาที่เราต้องการ ปริมาณชิ้น DNA ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของ PCR จะประมาณเท่ากับตัวเลข 2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของ PCR ซึ่งแต่ละรอบของ PCR นั้นประกอบด้วยขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1. **Denaturation** ขั้นตอนนี้เป็นการทำลายโครงสร้างสายคู่ของของ DNA โดยใช้ความร้อนสูง นิยมใช้ที่ประมาณ 95ºC เพื่อให้ DNA สายเดี่ยวที่เกิดขึ้นเป็นแม่แบบที่สายไพรเมอร์จะเข้ามาเกาะได้ในขั้นตอนต่อไป

2. **Annealing** เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับสาย DNA แม่แบบทั้งสองเส้น ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อลดอุณหภูมิของระบบลงมาที่ประมาณ 55 ºC อาจมากหรือน้อยกว่านี้ได้ขึ้นอยู่กับความยาวและจำนวนเบส G และ C (GC content) ของไพรเมอร์ สาย DNA แม่แบบทั้งสองสายก็สามารถกลับเข้ามาจับคู่กันได้ (reanneal) แต่เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับสาย DNA แม่แบบ และมีปริมาณมากกว่ามาก จึงจับคู่กับสาย DNA แม่แบบได้ก่อน โดยจะเกาะที่ตำแหน่งที่เป็นคู่ สมกันระหว่างไพรเมอร์กับ DNA แม่แบบ

3. **Extension** เป็นขั้นตอนการต่อเติมนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันกับสาย DNA ต้นแบบ โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจากปลาย 3´ ของไพรเมอร์ทั้งสองออกไปขั้นตอนนี้เกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะทำให้ได้ DNA สายใหม่สร้างจากทิศ 5´ ไป 3´หลังจากปล่อยให้เอนไซม์ทำงานได้ช่วงเวลาหนึ่ง ปฏิกิริยา PCR จะวนกลับไปเริ่มต้นที่ขั้นตอนแรกใหม่ และทำซ้ำๆกันไปอย่างนี้ประมาณ 30-40 รอบก็จะได้ชิ้น DNA ที่ต้องการศึกษาในจำนวนที่มากพอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำ PCR

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของเชื้อ Human Enterovirus

เชื้อ Human enterovirus (HEV) จัดอยู่ใน Family *Picornaviridae* ซึ่งก่อโรคสำคัญหลายชนิดทั้งในคนและสัตว์ ไวรัสใน Family *Picornaviridae* มีสมาชิกประมาณ 285 ชนิด ประกอบด้วย 14 genus[14] - [15] ดังตารางแสดงที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 Genus ที่จัดอยู่ในตระกูลของ *Picornaviridae* และ natural hosts[14] - [15]

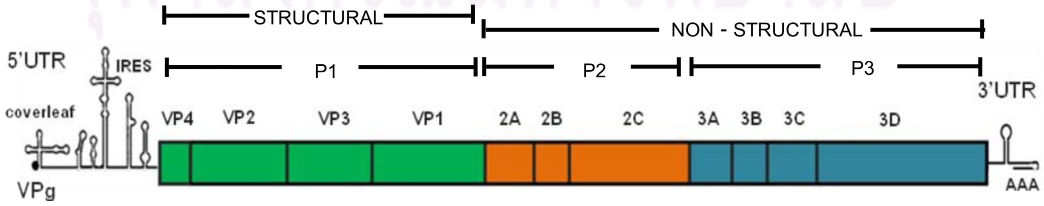
No.	Genus	Natural host
1.	*Enterovirus*	มนุษย์ Macaque Sooty mangabey ลิง (Yellow baboon) วัว, ควาย (cattle) หมู (swine)
2.	*Hepatovirus*	มนุษย์
3.	*Parechovirus*	มนุษย์ หนู (rodent)
4.	*Kobuvirus*	มนุษย์ วัว, ควาย (cattle) หมู (swine)
5.	*Cardiovirus*	หนู (rodent) กระรอก (squirrel) มนุษย์
6.	*Cosavirus*	มนุษย์
7.	*Aphtovirus*	วัว, ควาย (cattle) หมู (swine) แพะ (goat) แกะ (sheep)
8.	*Erbovirus*	ม้า (Horse)
9.	*Teschovirus*	หมู (swine)
10.	*Sapelovirus*	ลิง (monkey) เป็ด (duck) หมู (swine)
11.	*Senecavirus*	หนู (rodent)
12.	*Tremovirus*	ไก่ (chicken)
13.	*Avihepatovirus*	เป็ด (duck)
14.	*Seal picornavirus*	แมวน้ำ (seal)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย HEV-71 และ CV-A16 จัดเป็นสมาชิกใน genus *Enterovirus* เป็นกลุ่มไวรัสขนาดใหญ่ประมาณ 102 serotypes โดยเชื้อ HEV-71 ถูกเพาะเลี้ยงได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1969 จากการศึกษาของ Schmidt และคณะโดยการนำตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยเด็กอายุ 9 เดือนที่ป่วยเป็นโรคสมองอักเสบ (encephalitis) ในแคลิฟอร์เนีย (California) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) พบว่า HEV-71 เกิดแยกมาจาก CV-A16 พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1951[16]

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Human enterovirus

ไวรัส Family *Picornaviridae* มีขนาดเล็กประมาณ 30 นาโนเมตร อนุภาคของไวรัสเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (Icosahedral structure) จากการที่เชื้อไวรัส HEV ไม่มี envelope พบว่าทำให้มีความเสถียร (stability) ทำให้มีบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ทนต่อกรด เจริญได้ดีที่อุณหภูมิเฉลี่ย 37ºC และอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายวัน[17] [18] เชื้อไวรัส HEV ทนต่อสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น ether และ chloroform, ทนต่อแอลกอฮอล์และทนต่อการถูกแช่แข็ง แต่สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 56ºC, chlorination, formaldehyde และ รังสี UV (ultraviolet irradiation) [19] ภายในอนุภาคบรรจุด้วยสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นตรงสายเดี่ยว ที่มี polarity เป็นบวก (positive single stranded RNA) คือ มีคุณสมบัติสามารถทำหน้าที่เป็น mRNA ที่สร้างโปรตีนได้ สารพันธุกรรมมีขนาดประมาณ 7.4 กิโลเบส ลักษณะจีโนมของ picornavirus มีเพียงหนึ่ง open reading frame (ORF) และจะสร้างโปรตีนออกมาขนาดยาวตลอดสารพันธุกรรมนั้นได้เพียงเส้นเดียว (polyprotein) โดยโปรตีนมีขนาดประมาณ 250 kDa โปรตีนเส้นนี้ต่อมาจะถูกเอนไซม์ย่อยให้เป็นโปรตีนขนาดต่างๆ ทั้งหมด 11 ชนิดต่อไป[20] จีโนมของไวรัสแสดงดังภาพ



ภาพที่ 2 จีโนมของไวรัสมี 1 ORF ประกอบด้วย 5'UTR และ 3'UTR

(1.)5'-Untranslated region (5'UTR)

มีขนาดประมาณ 750 nt ที่บริเวณนี้พบการจัดรูปร่างของ RNA เป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) อย่างจำเพาะเจาะจง ได้มีการศึกษาเพื่อพิสูจน์โครงสร้างนี้โดยอาศัยความรู้ทางด้านชีวเคมี มีการส่องดูโครงสร้างโดยใช้ electron microscopy พบว่ารูปร่างแบ่งออกเป็น 2 โครงสร้างหลัก ดังนี้

1.1) Cloverleaf structure

มีขนาดประมาณ 100 nt พบที่บริเวณ 5'UTR ของ enterovirus และ rhinovirus เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication และ translation ของไวรัส โดยจับกับโปรตีนไวรัส 3CD (precursor protein) และจับกับโปรตีนเจ้าบ้าน PCBP (poly(rC)-binding protein) ประกอบกันเป็น ribonucleoprotein complex (RNP) ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการ RNA replication ของไวรัสและช่วยให้โครงสร้าง cloverleaf เสถียรยิ่งขึ้น นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า RNP เป็นตัวเชื่อมต่อในการเข้าจับบริเวณ 3'UTR ของ RNA โดยจับกับโปรตีนเจ้าบ้าน PABP (poly(A)-binding protein) ที่เกาะอยู่บน polyA tail ของไวรัส[21]

1.2) Internal ribosome entry site (IRES)

โดยส่วนมากที่ปลาย 5' ของ mRNA ของเซลล์จะพบมี 7-methylguanosine (m^7G) เชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ตัวแรกของสาย RNA ด้วยพันธะ 5',5' -triphosphate เรียกโครงสร้างนี้ว่า 5' –cap โดยเป็นบริเวณที่ถูกจดจำด้วย eIF-4F cap-binding complex เกี่ยวข้องกับช่วงแรกของกระบวนการ translation ของเซลล์ แต่ที่ RNA ของ picornavirus จะไม่พบโครงสร้างในส่วนนี้ ดังนั้นการเริ่มกระบวนการ translation ของไวรัสจึงไม่เกี่ยวข้องกับ 5' –cap โดยกระบวนการนี้จะขึ้นกับบริเวณ IRES เป็นบริเวณที่ ribosome จะเข้ามาจับ ส่วนที่เป็น IRES นี้พบว่าเริ่มมีการพัฒนาในเซลล์ยูคาริโอตก่อนและต่อมาจึงพบว่ามีในไวรัส เพราะว่ามี host-cell mRNAs บางชนิดที่มี IRES และ กระบวนการ translation ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ 5' –cap

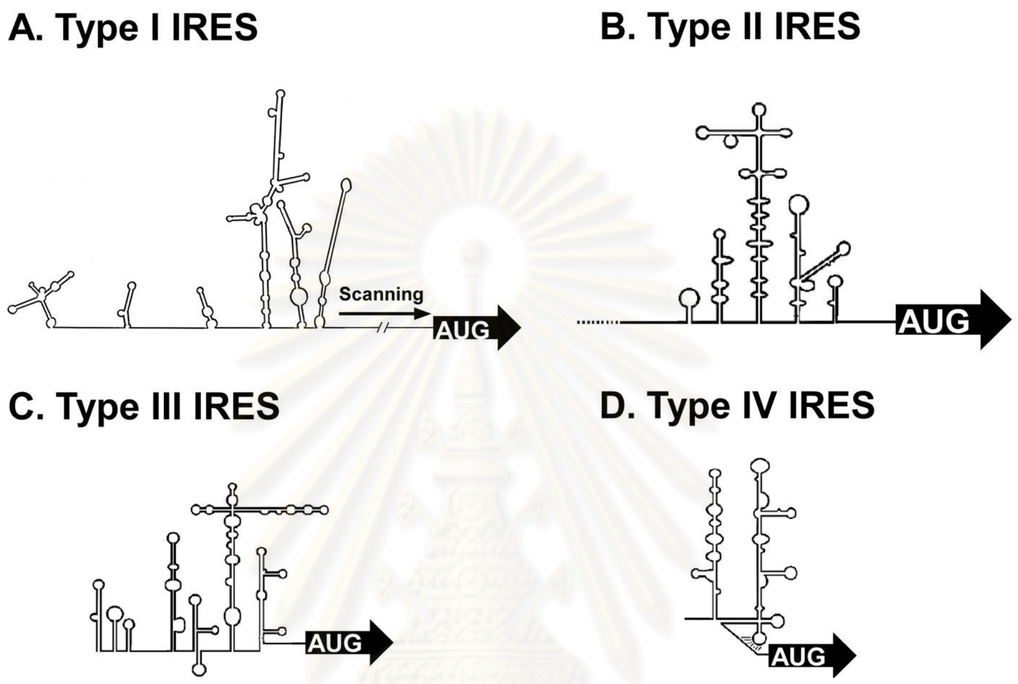
โครงสร้าง IRES ของ picornavirus แบ่งออกเป็น 4 ชนิดตาม homology, โครงสร้างทุติยภูมิ และตามคุณสมบัติอื่นๆ ซึ่งไวรัสแต่ละชนิดก็จะใช้ IRES แตกต่างกันไป[22] ได้แก่

Type I-IRES : Poliovirus, Rhinovirus, Coxsackievirus และ Enterovirus

Type II-IRES : Aphthovirus, Cardivirus, Paraechovirus และ Kobuvirus

TypeIII-IRES : Hepatitis A virus (HAV)

TypeIV-IRES : Teschovirus

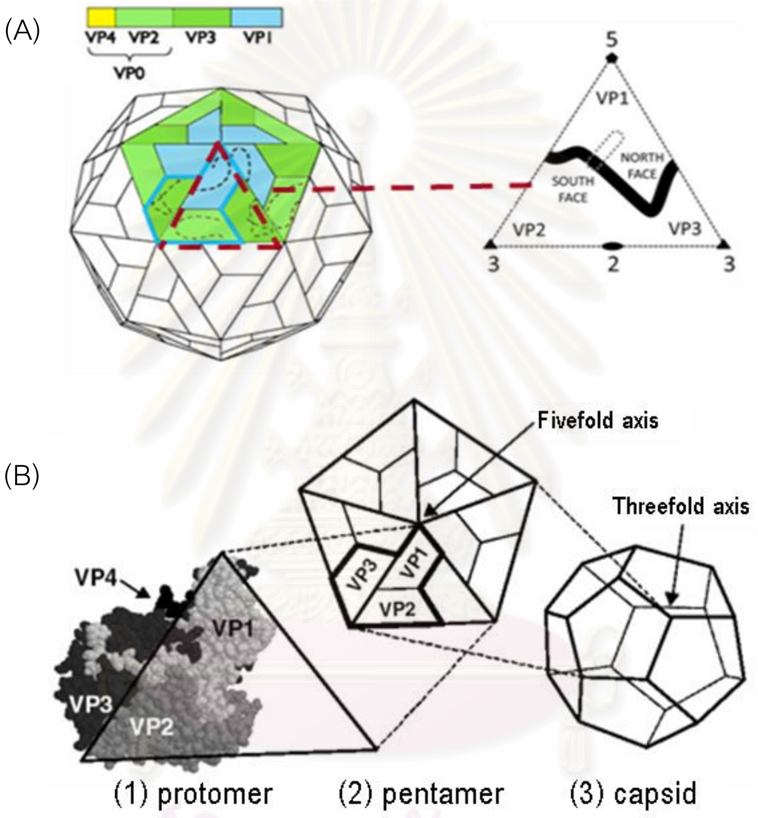


ภาพที่ 3 โครงสร้างทุติยภูมิของ IRES ทั้งสี่ชนิดของ picornavirus[22]

(2.) Structural region (P1)

ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน capsid 4 ชนิด คือ VP4 (200 nt), VP2 (800 nt), VP3 (700 nt) และ VP1 (900 nt) ตามลำดับ มีขนาดเฉลี่ย 2600 nt โดยส่วนผิวด้านนอกของ capsid เกิดขึ้นจากโปรตีน VP1 – VP3 มาประกอบเข้าด้วยกันเป็นหน่วยย่อย (protomer) มีรูปร่างเป็นสามเหลี่ยมด้านเท่า โดยมีโปรตีน VP4 ที่มีขนาดเล็กอยู่ด้านในอนุภาคไวรัส จากนั้นเกิดการเข้ามารวมกันเป็น 5 protomers เกิดเป็นรูปร่าง pentamer ต่อมา 12 pentamers จึงประกอบเข้าด้วยกันเป็น icosahedral capsid[23]

โปรตีน capsid ส่วนที่มีความสำคัญ คือ VP1 มีหน้าที่เป็น neutralization antigenic sites และการทำ serotyping ของไวรัส จากการศึกษาพบว่า ที่ด้าน N-terminal ของ VP1 มีขนาด 297 กรดอะมิโน จัดเป็น major antigenic sites ของไวรัส ในส่วนนี้มีการจัดโครงสร้างของโปรตีนให้คล้ายร่อง (canyon) บนอนุภาคของไวรัส ซึ่งบริเวณ canyon นี้จะถูกจดจำได้ด้วย neutralizing antibody (Ab) ของเจ้าบ้าน และถูกใช้เป็นบริเวณจับกับ receptor เพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน[24]



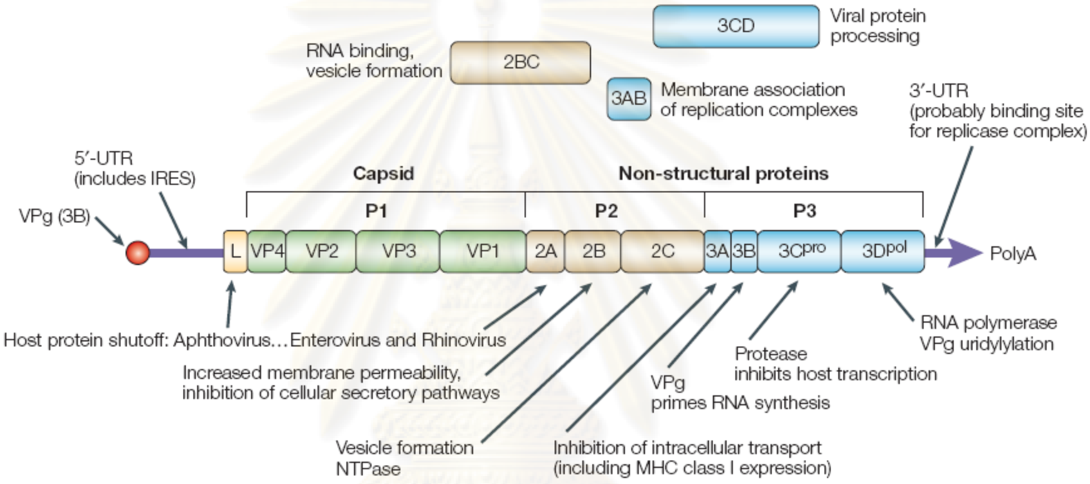
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 ลักษณะโปรตีน capsid ของ human enterovirus

(A) ลักษณะโครงสร้างของ icosahedral capsid ที่มีขนาดประมาณ 30 nm จากรูป asymmetry unit เส้นหนาแทนส่วนผิวหน้าของ canyon, เส้นปะรูปวงรีแทนผิวหน้าของ binding pocket, รูปวงรีทึบแทนแกนสมมาตร 2-fold axis, รูปสามเหลี่ยมทึบแทนแกนสมมาตร 3-fold axis และ รูปห้าเหลี่ยมทึบแทนแกนสมมาตร 5-fold axis

(B) การจัดเรียงตัวของโปรตีน capsid บนผิวหน้าของอนุภาคไวรัส HEV แต่ละหน่วยย่อย (protomer) ของโปรตีน capsid เกิดจากการรวมตัวของส่วนที่เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (structural protein) VP1-VP4 โดย VP1-VP3 จะอยู่ด้านผิวหน้าอนุภาค ส่วน VP4 เป็นโปรตีนที่อยู่ภายในอนุภาคไวรัส

(3.)Non-structural region (P2 และ P3)



ภาพที่ 5 โปรตีนแต่ละชนิดในจีโนมและหน้าที่หลักของแต่ละโปรตีน[62]

ประกอบด้วยยีนควบคุมการสร้างโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ polyprotein processing และ RNA replication ของไวรัส ส่วน P2 มีขนาด 1,700 nt ประกอบด้วยยีน 2A (400 nt), 2B (300 nt) และ 2C (1,000 nt) และส่วน P3 มีขนาด 2,200 nt ประกอบด้วยยีน 3A (200 nt), 3B (100 nt), 3C (500 nt) และ 3D (1,400 nt) โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสของทั้งสองส่วนนี้ มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลายประการ[25] ได้แก่

เอนไซม์ 2A (2A protease, $2A^{pro}$)

เป็นโปรตีนที่เป็น protease มีบทบาทสำคัญในการตัดโปรตีนสายยาวให้กลายเป็นโปรตีนหน่วยย่อย (polyprotein cleavage) โดย $2A^{pro}$ จะตัดโปรตีนบนบริเวณตัดจำเพาะระหว่าง

VP1/2A และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA replication ของไวรัส ใน Enterovirus และ Rhinovirus พบว่า $2A^{pro}$ มีบทบาทในการไปยับยั้งการ translation ของเจ้าบ้าน โดยไปย่อยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ translation ของเจ้าบ้าน คือ eIF-4G และชิ้นส่วนที่ได้จากการย่อยนี้พบว่ามีหนึ่งชิ้นไปจับกับ RNA ของไวรัส และช่วยผลักดันให้เกิดการ translation ของไวรัส[26]

นอกจากนี้เฉพาะในกลุ่ม Enterovirus พบว่า $2A^{pro}$ ไปย่อย dystrophin protein ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญทำให้เกิด cardiomyopathy และยังมีการศึกษาพบว่า $2A^{pro}$ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (cell apoptosis) ผ่าน 2 pathways คือ classical pathway และ autophagy pathway[27] [28]

โปรตีน 2B

เป็นโปรตีนที่มีบทบาทไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ membrane ของเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัส[29] โปรตีน 2B มีบริเวณที่เป็น hydrophobic ซึ่งทำให้สามารถแทรกเข้าสู่ membrane ของ Golgi และ ER ของเจ้าบ้านได้ และทำให้เกิดเป็น vesicles ขึ้น เรียก viroporin complex[30] สุดท้ายแล้ว complex นี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก (cell lysis) นอกจากนี้โปรตีน 2B สามารถไปยับยั้ง secretory pathways ของเซลล์เจ้าบ้านได้[31]

โปรตีน 3A

เป็น membrane binding protein มีบทบาทไปยับยั้งการหลั่งโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านและเป็นตัวกลางในการนำเสนอ membrane proteins ในระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัส[32]

โปรตีน 3B

โปรตีน 3B (VPg) เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก มีขนาดประมาณ 21 – 23 กรดอะมิโน ทำหน้าที่เชื่อมกับส่วนปลาย 5´-UTR ของจีโนมของ Picornavirus โดยเชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ มีบทบาทในการ replication ของไวรัส จะทำหน้าที่เป็น primer ในการสร้าง RNA ทั้งสายบวกและสายลบ โดยเกิดจากขบวนการ uridylylation เกิดเป็น VPgpUpU อาศัยเอนไซม์ $3D^{pol}$ เอนไซม์นี้จะใช้ adenosine ที่อยู่บริเวณ 2C มาเป็นแม่แบบ ในเซลล์เจ้าบ้านไม่พบขบวนการ uridylylation ดังนั้น จึงน่าจะเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคที่ติดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Enterovirus โดยอาศัยการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกิด point mutation เพื่อไปยับยั้งการเกิดกระบวนการนี้ทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้[33]

เอนไซม์ 3C (3C protease, 3C^{pro})

ทำหน้าที่ในกระบวนการ co-translational cleavage ของไวรัส และสามารถไปยับยั้งการ transcription ของเจ้าบ้านได้ โดยไปย่อย transcription factors อย่างจำเพาะที่บริเวณ Gln – Gly ของเจ้าบ้าน ปกติวงจรชีวิตของ picornavirus จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเจ้าบ้าน แต่ 3C^{pro} สามารถเข้าไปย่อย transcription factors ในนิวเคลียสของเจ้าบ้านได้ โดยไปในรูปของ 3CD precursor ที่มีบริเวณที่เป็น nuclear localization signal (NLS) เมื่อเข้าสู่นิวเคลียสแล้วจะเกิด autocatalytic แยก 3C^{pro} ออกมา[34]

เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, 3D^{pol})

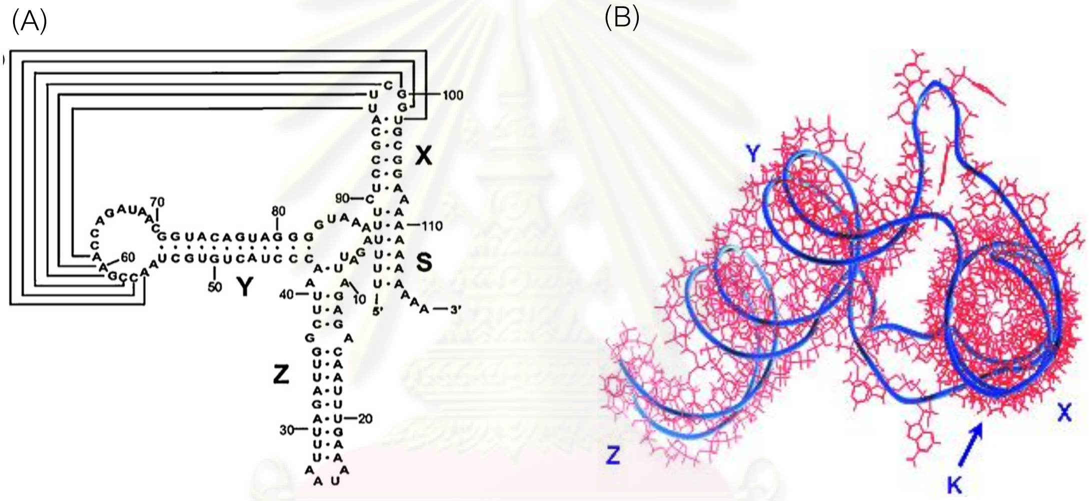
เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการ replication ของไวรัส[35]

(4.) 3'-Untranslated region (3'UTR)

มีขนาดเล็กประมาณ 75 – 100 nt ขนาดจะแตกต่างกันไปใน picornavirus แต่ละชนิด พบว่าบริเวณนี้ RNA มีการจัดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิขนาดเล็ก ประกอบด้วย 2 stem loops คือ X และ Y โดยทั้งสองบริเวณนี้จะเป็นส่วนที่ conserved และมีขนาด 8 nt และ 12 nt ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ stem loops นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าน่าจะทำหน้าที่เป็น recognition motif เพื่อใช้ในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง stem loops กับบริเวณอื่นๆบนจีโนมของไวรัส[36]

การมี poly(A) tail คล้ายกับใน mRNA ของยูคาริโอต โดย poly(A) tail ในจีโนมของไวรัสนั้น ถูกกำหนดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนม และมีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณ X domain เมื่อมีการถอดรหัสจาก sense RNA เป็น antisense RNA ลำดับ 3'-poly(A) tract จะถูกเปลี่ยนเป็น 5'-poly(U) tract และในระหว่างการเกิด replication สาย poly(A) ทำหน้าที่เป็น reciprocal template ให้กับการสร้าง RNA สายใหม่ บทบาทของ poly(A) tail ในไวรัสยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด

แต่เชื่อว่าหน้าจะมีหน้าที่คล้ายคลึงกับหน้าที่ของ poly(A) tail ใน mRNA ของยูคาริโอต และมีความสำคัญกับกระบวนการ replication ของไวรัส โดย poly(A) tail ใน mRNA ของยูคาริโอตไม่ได้ถูกกำหนดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนของเซลล์ยูคาริโอต แต่ได้รับมาจากขั้นตอน mRNA processing เพื่อป้องกันไม่ให้ปลายสาย mRNA โดนทำลายจากเอนไซม์ endonuclease และช่วยรักษาข้อมูลพันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เสมือน cellular signal ช่วยลำเลียงสาย mRNA ออกมายังไซโตพลาสซึม และยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ translation ด้วย[37] - [38]



ภาพที่ 6 โครงสร้างของ 3'UTR ของ enterovirus (A) โครงสร้างทุติยภูมิแสดงแต่ละ domains X, Y และ (B) three-dimensional model ของ 3'UTR ของ coxsackievirus B3[63]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วงจรชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ Human Enterovirus

ในการศึกษากระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสมีประโยชน์ช่วยให้เข้าใจพื้นฐานระดับโมเลกุลของไวรัสและทำให้เกิดความเข้าใจด้านการพัฒนายารักษาโรค เพื่อยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของไวรัส การที่ไวรัสจะไปสัมผัสและยึดกับผนังเซลล์เจ้าบ้านได้นั้น จะต้องมีตัวจับเกาะซึ่งจำเพาะกับตัวรับ (receptor) มีการแยกตัวรับในมนุษย์ที่จำเพาะกับ HEV-71 หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่

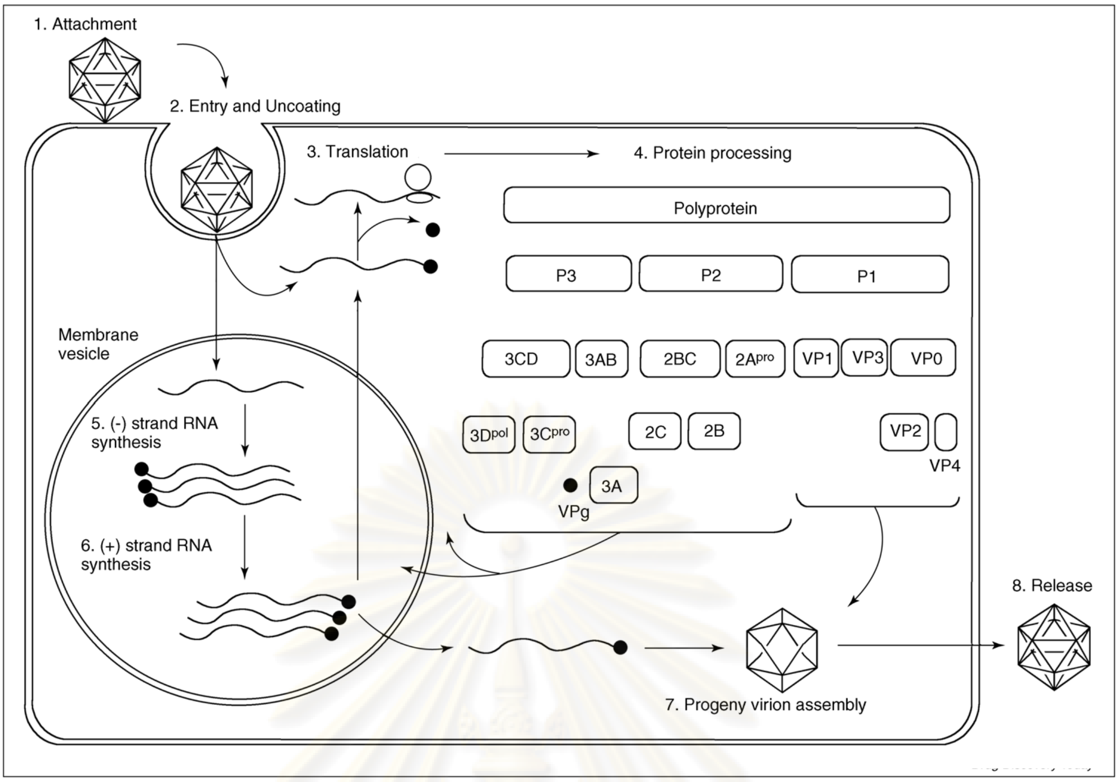
[1] Human scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการนำ lipoprotein เข้าและ cholesterol ออกจากเซลล์ พบการแสดงออกเป็นจำนวนมากในอวัยวะและเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น ตับ, ม้าม, osteoblast, macrophage และที่สำคัญคือพบได้ที่สมอง และ SCARB2 พบว่าเป็น receptor ของ HEV-71 ทั้ง 3 genotype (A-C)[39]

[2] Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1 / CD162] พบมากอยู่บน leukocyte รวมทั้งที่ dendritic cell และ tissue macrophage (เช่นที่พบในตับ, ปอด, ลำไส้ และ Langerhans cell ในผิวหนัง) มีรายงานการศึกษา CD162 ที่พบบน macrophage ใน lymphoid tissue ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร เป็นบริเวณหลักที่ไวรัสใช้ในการเพิ่มจำนวนหลังจากติดเชื้อ และเมื่อเกิดการติดเชื้อจะไปกระตุ้น Langerhans cell ในผิวหนัง จึงทำให้เกิดการอักเสบของผิวหนังที่บริเวณมือ เท้า และปาก นอกจากนี้พบว่า ด้าน N´-terminal ของ CD162 เป็นบริเวณที่สำคัญที่เกิด interaction กับ HEV-71[40]

[3] dendritic-cell-specific intercellular adhesion-molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN / CD209) พบบน dendritic cell และมีรายงานพบว่าการติดเชื้อลดลงมากกว่า 50% เมื่อมีการยับยั้ง DC-SIGN ด้วย anti-DC-SIGN antibody[41]

กระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้าน ในขั้นตอนแรกอนุภาค HEV จะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยจับเกาะกับตัวรับ (receptor) ที่ผิวเซลล์ ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของโปรตีน capsid ผ่านกระบวนการ decapsidation หรือ uncoating โดยอาศัยสภาวะที่เซลล์บริเวณนั้นมีค่า pH ต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิด acidification ภายใน endosome เมื่อโปรตีน capsid สลายไปแล้วจึงเกิดการปล่อยสารพันธุกรรมเข้ามาในไซโตพลาสมของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งกลไกนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 กระบวนการ replication ของเชื้อ HEV ในเซลล์เจ้าบ้าน[64]

เมื่อสารพันธุกรรมถูกปล่อยเข้าสู่ไซโตพลาสมแล้ว โปรตีน VPg (3B) ที่ยึดเกาะที่ด้านปลาย 5´ ด้วยพันธะโคเวเลนต์จะถูกตัดออกจากจีโนมโดยอาศัยเอนไซม์ของเจ้าบ้าน สารพันธุกรรมจะทำหน้าที่เปรียบเสมือน mRNA โดยจะถูกแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส (polyprotein processing) จะสร้างโปรตีนออกมาขนาดยาวตลอดสารพันธุกรรมนั้นได้เพียงเส้นเดียว (polyprotein) โดยโปรตีนมีขนาดประมาณ 250 kDa โปรตีนเส้นนี้ต่อมาจะถูกเอนไซม์ protease ที่ไวรัสสร้างขึ้นเองย่อยให้เป็นโปรตีนขนาดต่างๆ ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมี 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ $2A^{pro}$ จะตัดโปรตีนบนบริเวณตัดจำเพาะระหว่าง VP1/2A และเอนไซม์ $3C^{pro}$ ตัดโปรตีนบนบริเวณตัดจำเพาะระหว่าง 2C/3A จากนั้นจึงเกิดการตกแต่งโปรตีนแต่ละส่วนให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ (proteolytic processing) หลังจากการสร้างโปรตีนเสร็จสมบูรณ์ จึงจะเริ่มมีการสร้าง RNA สายลบเพิ่มมากขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสร้าง RNA สายบวกซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของไวรัส ในขั้นตอนการสร้าง RNA ทั้งสายบวกและสายลบนั้น เริ่มจากการรวมตัวกันเป็น complex ของ viral RNA, PCBP (โปรตีนของเจ้าบ้าน) และ 3CD (viral

precursor protein)[42] ที่บริเวณ cloverleaf ของ 5´-UTR โดย complex นี้จะ interact กับโปรตีน PABP1 ของเจ้าบ้านที่เกาะอยู่บริเวณ poly A ด้าน 3´-UTR ของจีโนมไวรัส และมีโปรตีน VPg ทำหน้าที่เป็น primer ของขบวนการสร้าง RNA นี้[43]

เมื่อได้โปรตีนที่จะเป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัส และเอนไซม์ต่างๆที่สมบูรณ์แล้ว จึงจะเริ่มสร้างสาย anti-genomic RNA ซึ่งจะเป็นต้นแบบในการสร้างสายสารพันธุกรรมของไวรัสต่อไป (genomic RNA) โดยสารพันธุกรรมจะถูกสร้างจากเอนไซม์ของไวรัส คือ viral RNA-dependent RNA polymerase (3D) สารพันธุกรรมที่สร้างใหม่นี้ส่วนหนึ่งทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนสายยาวต่อไปและส่วนหนึ่งจะถูกรวบรวมบรรจุภายใน capsid ในการประกอบขึ้นเป็น icosahedral capsid นั้นเริ่มจาก 5 หน่วยย่อยของโปรตีน (VP1-VP4) มาประกอบรวมกันเป็น pentamer จากนั้นโปรตีน 12 pentamers จึงรวมกันเป็นโครงสร้าง procapsid จากนั้นสารพันธุกรรมของไวรัสจะถูกบรรจุเข้าในโปรตีน procapsid โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน VPg ทำหน้าที่ยึดปลาย 5' ของสารพันธุกรรมกับผิวด้านในของ procapsid จากนั้นอนุภาคของไวรัสจะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์โดยการย่อย cell membrane ของเซลล์เจ้าบ้าน ส่งผลทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก (cell lysis)[44]

การที่เชื้อ HEV-71 มี mutation และวิวัฒนาการอย่างรวดเร็วนั้น เนื่องจากเอนไซม์ $3D^{pro}$ ไม่มี proofreading activity จึงส่งผลให้เอนไซม์มีการเติมเบสที่ผิดเข้าไปในสารพันธุกรรมประมาณ 1 หรือ 2 เบสทุกๆ 1 genome copy ในส่วนของ VP1 gene มีการคำนวณค่า evolution rate เท่ากับ $4.2\text{-}4.6\times10^{-3}$ nucleotide substitutions per site per year และในระหว่างการเกิดกระบวนการ replication ถ้าหากเซลล์เจ้าบ้านหนึ่งถูกรุกรานด้วย HEV ต่างสายพันธุ์พร้อมกัน อาจทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนบางส่วนของ RNA ระหว่างกันได้ ที่เรียกว่า recombination โดยใน HEV-71 พบการเกิด recombination ได้หลายรูปแบบ ได้แก่ intratypic (HEV-71 กับ HEV-71), intertypic มีรายงานพบระหว่าง HEV-71 กับ CV-A16, HEV-71 กับ CA-8 และ point mutation[7]

ลักษณะอาการทางคลินิกและการรักษา

การติดเชื้อไวรัสในกลุ่ม Picornavirus ส่วนมากมักพบได้บ่อยในเด็ก ในอดีตพบการระบาดที่สำคัญของไวรัสบางตัวในกลุ่มนี้ก่อนที่จะมีการผลิตวัคซีน เช่น โรค poliomyelitis ที่เกิดจาก poliovirus ปัจจุบันจัดอยู่ใน Enterovirus การติดเชื้อ Enterovirus ส่วนมากมักไม่แสดงอาการดังนั้นจึงควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสได้ยาก อาการที่เกิดจากการติดเชื้อในกลุ่ม Enterovirus ที่สำคัญ ได้แก่

[1] อาการแสดงทางระบบประสาท: กล้ามเนื้ออ่อนแรง (acute flaccid paralysis), เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (aseptic meningitis), สมองและไขสันหลังอักเสบ (meningoencephalitis)

[2] respiratory infection: มือ เท้า ปาก (HFMD), แผลในปาก (Herpangina)

[3] eye infection: เยื่อบุตาขาวอักเสบ (acute haemorrhagic conjunctivitis),

[4] cardiovascular infection: เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis), กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis)

โรคมือ เท้า ปาก (HFMD) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 10 ปี เมื่อไวรัสเข้าสู่ร่างกายจะมีระยะฟักตัว (incubation period) ประมาณ 3 – 7 วัน ผู้ป่วยจึงแสดงอาการเริ่มต้น คือ มักมีอาการไข้ จากนั้น 1 – 2 วัน มีผื่นเป็นลักษณะตุ่มน้ำใส หรือเม็ดแดงๆ (papulo-vesicular rash) บริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า บางครั้งอาจพบได้ตามลำตัว แขน ขา หรือ ก้น แผลที่พบในปากจะเป็นแผลเปื่อย กระจายที่ลิ้น เหงือก กระพุ้งแก้ม และเพดาน อาการโดยทั่วไปจะไม่รุนแรง จะหายได้เองใน 5 – 7 วัน นอกจากเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ที่เป็นสาเหตุของโรคนี้แล้ว ยังมีเชื้อไวรัสอื่นๆในกลุ่ม Enterovirus ได้แก่ CA-4-7, A9, A10, A24, B2-B5 เป็นต้น โดยลักษณะอาการของผู้ป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเหล่านี้ไม่แตกต่างกัน[45]

ผู้ป่วยที่เป็นโรค HFMD ที่มีอาการรุนแรงและเสียชีวิตพบว่ามีสาเหตุเกิดจากเชื้อ HEV-71 ปัจจัยเสี่ยงต่อการพบภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง คือ ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อย โดยเฉพาะที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี, มีไข้สูงมากกว่า 39ºC และนานเกิน 3 วัน และอาเจียนรุนแรงไม่สามารถรับประทานอาหารได้[46] โดยภาวะแทรกซ้อนแบ่งออกเป็นทางระบบประสาท (neurological) และระบบปอดและหัวใจ (cardiopulmonary) ไม่พบว่าความรุนแรงของเชื้อที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงส่วนมากพบในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี [47] อาการแสดง

ทางระบบประสาทที่พบได้บ่อยได้แก่ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (aseptic meningitis), กล้ามเนื้ออ่อนแรง (acute flaccid paralysis), ก้านสมองอักเสบ (brainstem encephalitis) หรือ สมองน้อยอักเสบ (cerebellitis) อาการต่างๆเหล่านี้จะพบได้แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่การระบาด โดยผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการรุนแรงเหล่านี้ 2 – 5 วันหลังจากเริ่มมีอาการไข้ ช่วงปี ค.ศ. 1998 – 2005 รวมเป็นระยะเวลา 8 ปี พบว่ามีอัตราผู้ป่วยที่เสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อในกลุ่ม Enterovirus โดยเฉพาะ HEV-71 ที่เป็นสาเหตุหลักอยู่ในช่วง 10.0 – 25.7%[48]

ในรายที่พบภาวะแทรกซ้อนระบบปอดและหัวใจพบว่ามีอัตราการเสียชีวิตสูง ส่วนสาเหตุของภาวะนี้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ คาดว่า สาเหตุมาจากความผิดปกติของก้านสมอง เนื่องจากเมื่อได้มีการตรวจหาเอนไซม์จากกล้ามเนื้อหัวใจในผู้ป่วยพบว่าไม่สูงผิดปกติ แต่พบความผิดปกติของก้านสมองและไขสันหลังในผู้ป่วย ยังมีข้อมูลสนับสนุนจากผลการตรวจ autophy พบการอักเสบและการทำลายก้านสมองและไขสันหลัง แต่ไม่พบการอักเสบหรือมีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte จำนวนมากผิดปกติในกล้ามเนื้อหัวใจ จึงเชื่อว่าภาวะปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) และการทำงานของระบบหัวใจและปอดล้มเหลวไม่น่าจะเกิดจากกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (viral myocarditis) แต่เกิดจากระบบประสาทผิดปกติจากการมีการเพิ่มการไหลออกของน้ำจากเส้นเลือดปอดและไปเพิ่มความดันในเส้นเลือดปอดจากระบบประสาทอัตโนมัติ sympathetic ถูกกระตุ้นร่วมกับการเพิ่มขึ้นของ catecholamine[49]

ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนและยาต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะมาทำลายเชื้อ HEV-71 นี้ได้ ดังนั้น การรักษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะบรรเทาอาการของผู้ป่วยเท่านั้น ยาต้านไวรัส HEV-71 ส่วนมากอยู่ในระหว่างการพัฒนา ได้แก่

[1] Pleconaril ยาชนิดนี้จะไป stabilize โปรตีน capsid ของไวรัสและขัดขวางกระบวนการ uncoating ของไวรัสไม่ให้ปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ หลังจากที่มีการระบาดของ HEV-71 ที่ Taiwan ในปี ค.ศ. 1998 มีรายงานการนำ Pleconaril มาศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง ผลที่ได้คือไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ เนื่องจากพบการเกิด cytopathic effect (CPE) ขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยง[50]

[2] Rupintrivir ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3C protease

[3] Enviroxime ยับยั้งโปรตีน 3A

[4] Ribavirin เป็นยาต้านไวรัสที่ใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส เช่น การติดเชื้อไวรัส hepatitis C นำมาใช้ร่วมกับ interferon-α และการติดเชื้อ RSV ที่รุนแรง หลายการศึกษารายงานว่า กลไลหลักของ Ribavirin ทำให้เกิด lethal mutagenesis ในระหว่างที่ไวรัสมีการเพิ่มจำนวน สำหรับเชื้อ HEV-71 นั้น พบว่า Ribavirin ยับยั้งเชื้อไวรัสนี้ได้ใน RD cell และพบว่าป้องกันการเกิดกล้ามเนื้ออ่อนแรงและการตายได้ในหนูทดลอง[51] เนื่องจากความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นจะพบได้เฉพาะในเด็ก จึงควรมีการพัฒนายาต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำมาป้องกันและลดอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในอนาคตต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive research) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว

ประชากร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ เป็นตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid ซึ่งมีการเก็บสิ่งส่งตรวจโดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมือ เท้า ปาก โดยกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษาคือ ผู้ป่วยเด็กซึ่งป่วยเป็นโรคมือ เท้า ปาก และเข้ารับการรักษาจากโรงพยาบาลทั้งหมด 2 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล ตั้งแต่ธันวาคม 2009 ถึงธันวาคม 2010 ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครองของผู้ป่วยก่อนแล้ว

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

ในการคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในประเทศไทย ได้อาศัยข้อมูลการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในภูมิภาคอื่นที่รายงานในฐานข้อมูลเป็นข้อมูลเปรียบเทียบ พบว่า การระบาดในภูมิภาคเอเชียนั้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49%

สูตรการคำนวณ ;

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

โดย ค่า Z ที่ระดับความเชื่อมั่น (confident interval (CI)) ที่ 95% = 1.96

ค่า d คือ ความคลาดเคลื่อน กำหนดให้เท่ากับ 20 % ของอัตราการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง

P = ค่าเฉลี่ยของอัตราการตรวจ HEV-71 และ CV-A16ในภูมิภาคเอเชีย = 49%

Q = 1 – P

แทนค่าลงในสูตร ;

$$n = \frac{(1.96)^2 * (0.49) * (1-0.49)}{((20/100) * 0.49)^2} = 99.96$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น ต้องทำการศึกษาจากตัวอย่างในประเทศไทยจำนวนอย่างน้อย 100 ตัวอย่าง

ในการศึกษาวิจัยนี้มีตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid ที่เก็บได้จากกลุ่มประชากรศึกษาทั้งหมด 50 ตัวอย่าง เนื่องจากกลุ่มประชากรศึกษานั้นหาได้ยากในประเทศไทย และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าความชุกแล้วพบว่า มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ จึงสรุปได้ว่าจากจำนวนตัวอย่างที่มีนั้น สามารถใช้เป็นตัวแทนของการศึกษาการระบาดวิทยาของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในประเทศไทยได้ ซึ่งจะให้ผลการศึกษาที่น่าเชื่อถือได้

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
2. Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1 – 2 µl), P10 (0.5 - 10 µl), P20 (5 – 20 µl), P100 (20 – 100 µl), P1000 (100 - 1000 µl) (Eppendorf, Germany)
3. Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)
4. Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
5. Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)
6. Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
7. Eppendorf Mastercycler personal (Hamberg, Germany)
8. Freezer -20ºC (Sanyo, Japan)
9. Freezer -70ºC (Forma Scientific, USA)
10. Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
11. Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)
12. Microcentrifuge 0.2 ml (AxyGEN, USA)
13. Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
14. Parafilm (American Nation Can, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15. Pipette rack (Eppendorf, Germany)
16. Pipette tip: 10 µl, 200 µl และ 1,000 µl (Elkay, Ireland)
17. Plastic wrap
18. Polypropylene conical tube: 15 ml, 50 ml (Elkay, Ireland)
19. Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
20. Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)
21. Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
22. Refrigerator 4 ºC (Misubishi, Japan)
23. Stirring hot plate (Bamstead/ Thermolyne, USA)
24. Stirring-magnetic bar
25. Vortex mixer (Scientific industry, USA)
26. Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. 0.1% Phosphate buffer saline
2. ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA)
3. Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Promega, USA)
4. Random hexamer (Promega, USA)
5. Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, USA)
6. ImProm-II™ 5X Reaction Buffer (Promega, USA)
7. Master mix solution ((Eppendorf, Germany)
8. Distill water (DW)
9. PCR primer: forward primer (F) และ reverse primer (R)

10. $MgCl_2$ (Promega, USA)

11. Agarose molecular grade (Promega, USA)

12. 1x Tris borate buffer (1x TBE)

13. Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

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

15. Isopropanol (Sigma, Singapore)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid จากผู้ป่วย โดยเก็บลงใน 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS) 3 ml
2. ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex 15 วินาที แล้วดูดสารละลายตัวอย่างใส่ในหลอด 1.5 ml แบ่งให้ได้ประมาณ 3 หลอด จากนั้นเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70ºC

การสกัด RNA โดยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction ของบริษัท RBC Bioscience

- นำสารละลายตัวอย่าง 200 µl
- เติม 400 µl ของ VB buffer แล้วนำไป Vortex
- Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- Transfer the lysate ลงใน spin column 2 ml
- เติม 500 µl ของ 95% ethanol แล้วนำไป Vortex
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 60 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- เติม 400 µl ของ W1 buffer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- เติม 600 μl ของ Wash buffer (add ethanol)
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 30 วินาที
- ทิ้งส่วนของ filtrate
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 3 นาที
- เปลี่ยน collection tube
- เติม 50 μl RNAse-free water
- ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- Centrifuge (maximum speed) เป็นเวลา 3 นาที

การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription

1. เติม RNA 5 μl ลงใน Random hexamer 6 μl ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที
3. นำมาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
4. เติมสารละลาย Reverse Transcription mix 15 μl ที่ประกอบด้วย

Improm II buffer	4.0	μl
Improm II RT	1.0	μl
10 uM dNTP	2.5	μl
RNase inhibitor	1.0	μl

5. นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
6. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบผลการสกัด RNA และผลการทำ Reverse Transcription

- ใช้การตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ซึ่งใช้เป็น universal housekeeping gene โดยใช้ปริมาตรของสารต่างๆ, ชนิดของไพรเมอร์ และสภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR แสดงดัง ตารางที่ 3-5 ตามลำดับ
- วิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ในการแยกหาขนาดของ PCR product ตามที่ต้องการ เปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder (marker) นำเจลที่ได้จากการทำ electrophoresis มาแช่ในสารละลาย ethidium bromide เพื่อย้อมดูแถบของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการตรวจสอบภายใต้ UV โดยขนาดของผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออก ของยีน GAPDH มีขนาดเท่ากับ 500 nt

การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR amplification

ส่วนที่ 1 เพื่อศึกษาการระบาดวิทยาของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในประเทศไทย

1. **ออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกยีน VP1 และนำ cDNA ที่ได้มาทำ semi-nested PCR**

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกยีนสร้างโปรตีน capsid VP1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ HEV-71 และ CV-A16 เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่าง และเพื่อการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV-71 ในส่วน VP1 ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank เป็นลำดับอ้างอิงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ และตรวจสอบผลด้วยการทำ BLAST ผ่านทางเว็บไซต์ของ NCBI ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ในรอบที่ 1 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HEV_F2760/HEV_R3206 มีขนาดเท่ากับ 500 nt และผลิตภัณฑ์จากรอบที่ 2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HEV_F3029/ HEV_R3206 มีขนาดเท่ากับ 200 nt โดยใช้ปริมาตรของสาร, ชนิดของไพรเมอร์ และสภาวะที่ใช้สำหรับการทำ semi-nested PCR แสดงดังตารางที่ 3-5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงปริมาตรของสารต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ PCR

สาร	ปริมาตร (µl)
H_2O	6.0
Master mix	5.0
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
cDNA Template	2

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับการทำ PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีน GAPDH และการตรวจการติดเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 (VP1)

Primer’s name	Sequence (5' ⟶ 3')	Region	Position
GAPDH_F112	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	GAPDH	112 - 131
GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	GAPDH	603 - 583
HEV_F2760	ATGGKTATGYWAAYTGGGACAT	VP1	2760 - 2782
HEV_F3029	TTCATGTCRCCWGCSAGTGC	VP1	3029 - 3049
HEV_R3206	CCTGACRTGYTTMATCCTCAT	VP1	3185 - 3206

ตารางที่ 5 แสดงสภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR ของ GAPDH และ semi-nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ HEV-71 และ CV-A16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PCR reaction	Temperature	Time			Cycle
		GAPDH	HEV-71 (VP1)		
			1^{st} PCR	2^{nd} PCR	
Initial denaturation	95ºC	2 min	2 min	2 min	1
Denaturation	95ºC	0.45 min	0.45 min	0.45 min	40
Annealing	55ºC	0.45 min	0.45 min	0.45 min	
Extention	72ºC	1.30 min	1.30 min	1.30 min	
Final Extention	72ºC	7 min	7 min	7 min	1

	25°C	5 min	5 min	5 min	1

2. ตรวจสอบผลการทำ semi-nested PCR **ด้วยวิธี** Agarose Gel Electrophoresis **และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี** direct nucleotide sequencing

✓ PCR product ที่ได้นำมาแยกใน 2% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp

✓ DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาด DNA ที่ต้องการ ย้อมดูแถบ DNA ด้วย สารละลาย ethidium bromide

✓ ตัด gel ที่มีแถบ DNA ที่ต้องการ ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Bioscience)

- แช่ใน DF buffer 500 µl ที่ 50°C จนเจลละลาย
- ดูดใส่ column filter
- Centrifuge 12,000 g 30 วินาที
- เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม wash buffer 600 µl
- Centrifuge 12,000 g 30 วินาที
- เทสารละลายทิ้ง แล้ว Centrifuge 12,000 g 2 นาที
- เติม Elution buffer 30 µl แล้ว Centrifuge 12,000 g 2 นาที

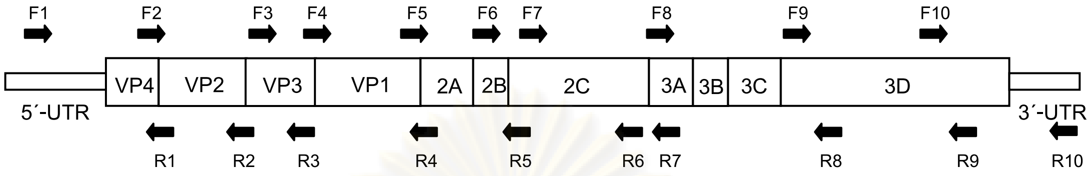
✓ นำ DNA ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ Direct Nucleotide Sequencing (First base laboratories SDN BHD)

ส่วนที่ 2 เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่าง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ genome sequencing ของ HEV-71 และ CV-A16 แสดงข้อมูลดังตารางที่ 6-7 และสภาวะที่เหมาะสำหรับการทำ PCR เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม แสดงผลสรุปดังตารางที่ 8 ตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel

Electrophoresis และหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ direct nucleotide sequencing โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD

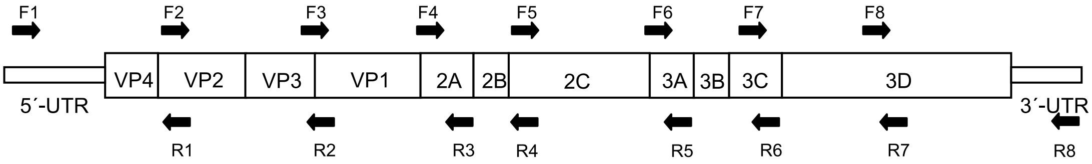
ตารางที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ HEV-71



pair	Primer's name	Sequence (5'→3')	Position	region
1	HEV71_F1	CTC GGT ACC TTT GTG CGC CTG	62-82	5'UTR - VP4
	HEV71_R1	GGG CGC GTT GGT TTA TCC ACT	1102-1122	
2	HEV71_ F2	TCC AGA CAA GTT TGC AAA TCC TGT	895-918	VP2
	HEV71_R2	GGA TCC AGT AAA CAT RAA GGT G	2068-2089	
3	HEV71_ F3	GGT CTC AGC ACA AGC AGG GA	1933-1953	VP3
	HEV71_R3	CCG CTA RTG CTA TTA TAT AGG C	2351-2372	
4	HEV71_ F4	GTC ACC CTT GTV ATA CCA TGG AT	2210-2232	VP1
	HEV71_R4	AGT CGC GRG AGC TRT CYT CCC	3432-3456	
5	HEV71_ F5	CCA AAT TAT GCT GGC AAC TCC A	3272-3293	2A
	HEV71_R5	ACT ATT TTC TCC TTA AGC CAA TC	4169-4191	
6	HEV71_ F6	TGC AAY TGY CAR ACA GGR GTG TA	3500-3522	2B
	HEV71_R6	CGG TGT TTG CTC TTG AAC TGC A	4416-4437	
7	HEV71_ F7	ATC TTA GGT ATC CCT ATC GCT C	4052-4073	2C
	HEV71_R7	GAG ATC GCT AAT AGC GTC TGG	5120-5140	
8	HEV71_ F8	TGT GAC ATT GAA GTG ACA GAC TC	4817-4839	3ABC
	HEV71_R8	CTA GTR TGA AGA TCA ATA GCC TC	6263-6285	
9	HEV71_ F9	CAA CAA ARG CDG GRC ART GTG G	5811-5833	3D
	HEV71_R9	CCT GAR CAV CCW GAG GGC AT	6800-6820	
10	HEV71_ F10	GCC TTY GAC TAC TCA GGT TAT G	6632-6654	3'UTR
	HEV71_R10	TTT TTT GCT ATT CTG GTT ATA ACA A	7388-7413	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ CV-A16



pair	Primer's name	Sequence (5' ⟶3')	Position	region
1	CA16F1_35	GCC CAC TGG GCG CTA GCA C	35 - 53	5'UTR - VP4
	CA16R1_1200	GGG AAT TTC CAR TAC CAT CCC TT	1178 - 1200	
2	CA16F2_1381	GTG TGY CCR CAT CAG TGG ATT A	1481 - 1502	VP2-VP3
	CA16R2_2470	CTG GTC AAT CAT GTC TGC AAT	2450 - 2470	
3	CA16F3_2270	TTT GAY TAT TAC ACC ACT GGC A	2270 - 2291	VP1
	CA16R3_3605	CTG GGT ART ACT CAC TAG CTT C	3584 - 3605	
4	CA16F4_3305	ACW AGT AGR GAC AAR ATA ACA ACA	3305 - 3328	2A
	CA16R4_4191	ACT ATT TTC TCC TTA AGC CAA TC	4169 - 4191	
5	CA16F5_4150	AAT YAG YAA GTT CAT TGA TTG GC	4150 - 4172	2B-2C
	CA16R5_5127	ATG GCA TCT GGG GCT GGC TT	5108 - 5127	
6	CA16F6_4697	GAA GAR AAA GGA GTK TCT TTC AC	4697 - 4719	3ABC
	CA16R6_5720	AGG GCA TGT GCT CWG TGT TGA T	5699 - 5720	
7	CA16F7_5450	GAC CAA GGM CAY TTC ACT ATG	5450 - 5470	3D
	CA16R7_6645	CCT GAR TAA TCA AAT GCA AAG AG	6623 - 6645	
8	CA16F8_6437	AAG ATT AAG AAA GGR AAA TCC CG	6437 - 6459	3'UTR
	CA16R8_7413	TTT TTT GCT ATT CTG GTT ATA ACA A	7388-7413	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงสภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR

PCR reaction	Temperature	PCR		Cycle
		1^{st} PCR	2^{nd} PCR	
Initial denaturation	95°C	2 min	2 min	1
Denaturation	95°C	0.45 min	0.45 min	40
Annealing	50-55°C	0.45 min	0.45 min	
Extention	72°C	1.30 min	1.30 min	
Final Extention	72°C	7 min	7 min	1
	25°C	5 min	5 min	1

การเก็บรวบรวมข้อมูล

รวบรวมและเก็บบันทึกข้อมูลบน data sheet เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR และ genome sequencing ทั้งหมดนั้นใช้โปรแกรมในการออกแบบและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

- Bioedit เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการออกแบบไพรเมอร์ โดยการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ โดยใช้โปรแกรมรุ่น 7.0.4.1

- Oligos เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการกลับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (reverse complement) เพื่อเตรียม reverse primer และคำนวณค่า Tm ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ พร้อมทั้งใช้ตรวจสอบโอกาสในการเกิด primer dimer ในเบื้องต้น

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการทำ DNA sequencing จะถูกตรวจสอบความถูกต้อง และแก้ไขโดยใช้โปรแกรม ดังต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ Basic local alignment search tool (BLAST) ทำการเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยดำเนินการ ผ่านเว็บไซด์ของ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

■ Chromas เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing โดยพิจารณาจากผลกราฟ chromatogram

■ Molecular Evolution Genetics Analysis version 4.0 หรือ MEGA4 เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการสร้าง phylogenetic tree เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 หรือเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชุดข้อมูลที่ทำการตรวจวิเคราะห์ โดยในการศึกษานี้ กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ Neighbor-joining method, Kimura's 2-parameter และค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

■ ClustalW เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่คัดเลือก (multiple alignment) และเพื่อการสร้าง phylogenetic tree สามารถทำการวิเคราะห์ผ่านเว็บไซด์ DDBJ (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html)

สำหรับโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ genome sequencing

■ DNASTAR's Seqman Genome Assembly เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการต่อข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์มากกว่า 2 ข้อมูลเข้าด้วยกัน (nucleotide conting assembly) โดยการพิจารณา ลำดับเบสและผล chromatogram ที่ได้ประกอบเพื่อวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของข้อมูลร่วมด้วย

■ โปรแกรมสำหรับการคำนวณค่า %GC content ของข้อมูล coding sequence เลือกใช้จากโปรแกรมใน Bioedit หรือผ่านเว็บไซด์ http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/ Genom_GC_Calculator.html ค่าที่ได้จากทั้งสองโปรแกรมนี้ เป็นค่าผลรวมของ %GC content และแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์องค์ประกอบทั้ง 4 ชนิด ของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย ในการพิจารณาความสัมพันธ์ของค่า %GC content ในบริเวณต่างๆบน coding

sequence ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ที่ทำการศึกษานั้น กำหนดให้ใช้ค่า window size เท่ากับ 600 และ window step เท่ากับ 10

- Simplot เป็นโปรแกรมที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลของการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในรูปของกราฟ %similarity ของคู่นิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบสัมพันธ์กับตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ในส่วนยีน VP1 ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน เพื่อนำมาวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศกับต่างประเทศ
2. วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์

การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ ทั้งส่วนของยีนสร้างโปรตีน capsid VP1 และข้อมูลของ coding sequence ทั้ง 5 strain โดยใช้โปรแกรม Sequin 7.25 (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/sequin) ไปยังฐานข้อมูล GenBank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนที่ 1 ผลศึกษาระบาดวิทยาและการจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในประเทศไทย

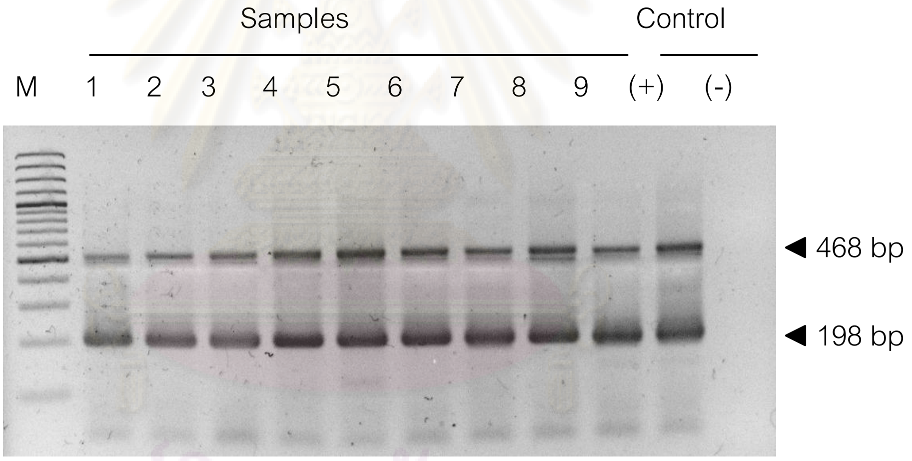
ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ตามข้อกำหนดของคณะกรรมการจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัส หรือ International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) ว่าด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสนั้นระบุให้ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน capsid sequence เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก ซึ่งบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ได้แก่ ส่วนของยีน VP1 และ VP4 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละส่วนจะให้ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่สอดคล้องกัน โดยมีค่าเฉลี่ย %nucleotide divergence ระหว่าง genotype และ subgenotype เท่ากับ 16-20% และ 12% ตามลำดับ ส่วน non-structural เป็นบริเวณที่พบว่ามีความถี่ในการเกิด recombination บ่อยครั้ง และส่วน 5´UTR เป็นส่วน non-coding sequence ที่มีความอนุรักษ์มากและมีลักษณะคล้ายกันในกลุ่ม Enterovirus จึงอาจทำให้การจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในทั้งสองส่วนนี้ไม่น่าเชื่อถือ[14] ในส่วน 5´UTR มักนิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ Enterovirus แบบไม่ระบุสายพันธุ์ (Pan-Enterovirus screening) ในงานวิจัยนี้จึง ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกยีนควบคุมการสร้างโปรตีน capsid VP1 บางส่วน เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้อย่างถูกต้อง และเพื่อให้สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ให้ได้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ

1.1 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ด้วยวิธี Semi-nested PCR

ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid ซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยเด็กซึ่งป่วยเป็นโรคมือ เท้า ปาก และเข้ารับการรักษาจากโรงพยาบาลทั้งหมด 2 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลบางปะกอก 9

อินเตอร์เนชั่นแนล ด้วยวิธี semi-nested PCR ทั้งสองรอบอยู่ในบริเวณยีน VP1 โดยมีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR รอบที่ 1 และ รอบที่ 2 เท่ากับ 468 bp และ 198 bp ตาม ลำดับ

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในตัวอย่าง stool, rectal swab และ vesicle fluid จำนวน 50 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการป่วยเป็นโรคมือ เท้า ปาก ด้วยวิธี semi-nested PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยทั้งหมด 28 ราย แบ่งออกเป็นผู้ป่วยติดเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 เท่ากับ 3 ราย และ 25 ราย ตามลำดับ สามารถคำนวณหาอัตราการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในประชากรไทยได้เท่ากับ 6% (3/50) และ 50% (25/50) ตามลำดับ แบ่งออกเป็นผู้ป่วยชายและหญิงเท่ากับ 17 ราย และ 11 ราย ตามลำดับ หรือมีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงประมาณ 1.5:1 ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี จึงสรุปได้ว่าเชื้อ CV-A16 เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคมือ เท้า ปากมากที่สุดระหว่างปี ค.ศ. 2009 - 2010



ภาพที่ 8 ตัวอย่างผลการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหาเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ด้วยวิธี semi-nested PCR

1.2 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของยีน VP1 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis

เมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 บางส่วนขนาดเฉลี่ย 200 nt ซึ่งได้จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ทั้ง 3 ตัวอย่าง และ 25 ตัวอย่าง ตามลำดับ มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ เทียบกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และทำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

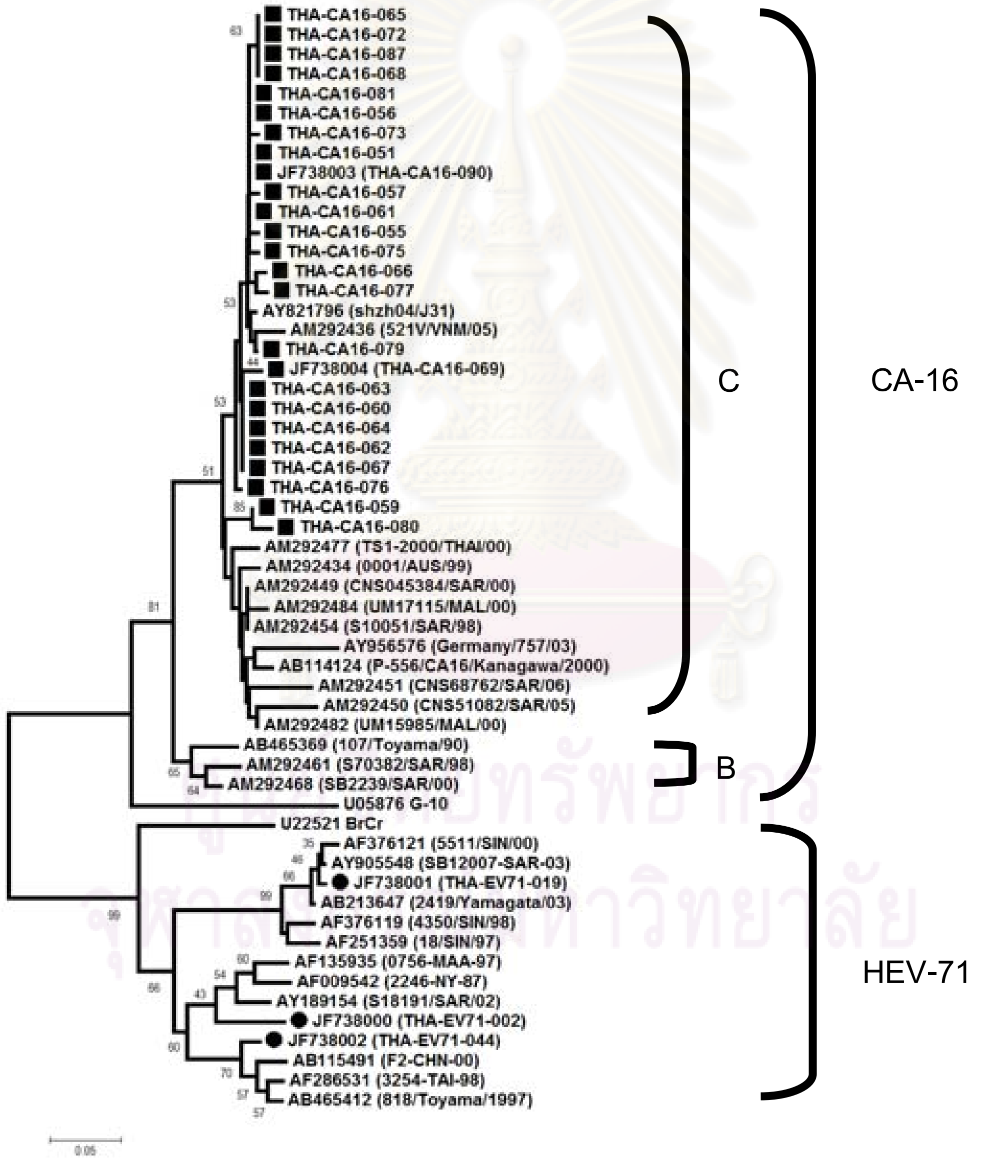
phylogenetic analysis พบว่ามีตัวอย่าง HEV-71 ที่ถูกจำแนกเป็น genotype B เท่ากับ 1 ตัวอย่าง, genotype C เท่ากับ 2 ตัวอย่าง และ CV-A16ทั้งหมด 25 ตัวอย่างถูกจำแนกเป็น genotype C จึงสามารถสรุปได้ว่าในกลุ่มประชากรไทยในปี ค.ศ. 2009 - 2010 นั้น เชื้อ CV-A16 genotype C มีอัตราการระบาดสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับที่พบได้ในต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น[6] และประเทศจีน[8] เป็นต้น

จากลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่า มีลักษณะสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 มีลักษณะกระจายทั่วแถบภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ไม่พบความจำเพาะของสายพันธุ์กับประเทศที่เกิดการระบาด ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ที่สมบูรณ์ของเชื้อ HEV-71 จากการศึกษาวิจัยนี้ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV71-B ทำการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ โดยมีค่า %sequence identity ระหว่าง 80-82% และ 81-85% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV71-A และ HEV71-C หรือมีค่า %sequence identity ระหว่าง 93-94% และ 95-98% เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HEV71-A และ HEV71-C ตามลำดับ สำหรับความสัมพันธ์ของค่า identity ภายในสายพันธุ์ HEV71-B นั้นมีค่าของ %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 88-99% และลำดับกรดอะมิโนระหว่าง 98-100% เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV71-C ทำการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ โดยมีค่า %sequence identity ระหว่าง 81-83% และ 94-95% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ HEV71-A ความสัมพันธ์ของค่า identity ภายในสายพันธุ์ HEV71-C นั้นมีค่าของ %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 88-99% และลำดับกรดอะมิโนระหว่าง 97-100%

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 บางส่วนของเชื้อ CV-A16ทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่า มีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 85 – 100% และ 88 - 100% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนภายในสายพันธุ์ CV-A16-C จากการศึกษาวิจัยนี้เปรียบเทียบ prototype strain (G-10) หรือ CV-A16-A ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีค่า %sequence identity ระหว่าง 72 - 80% และ 84 – 93% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

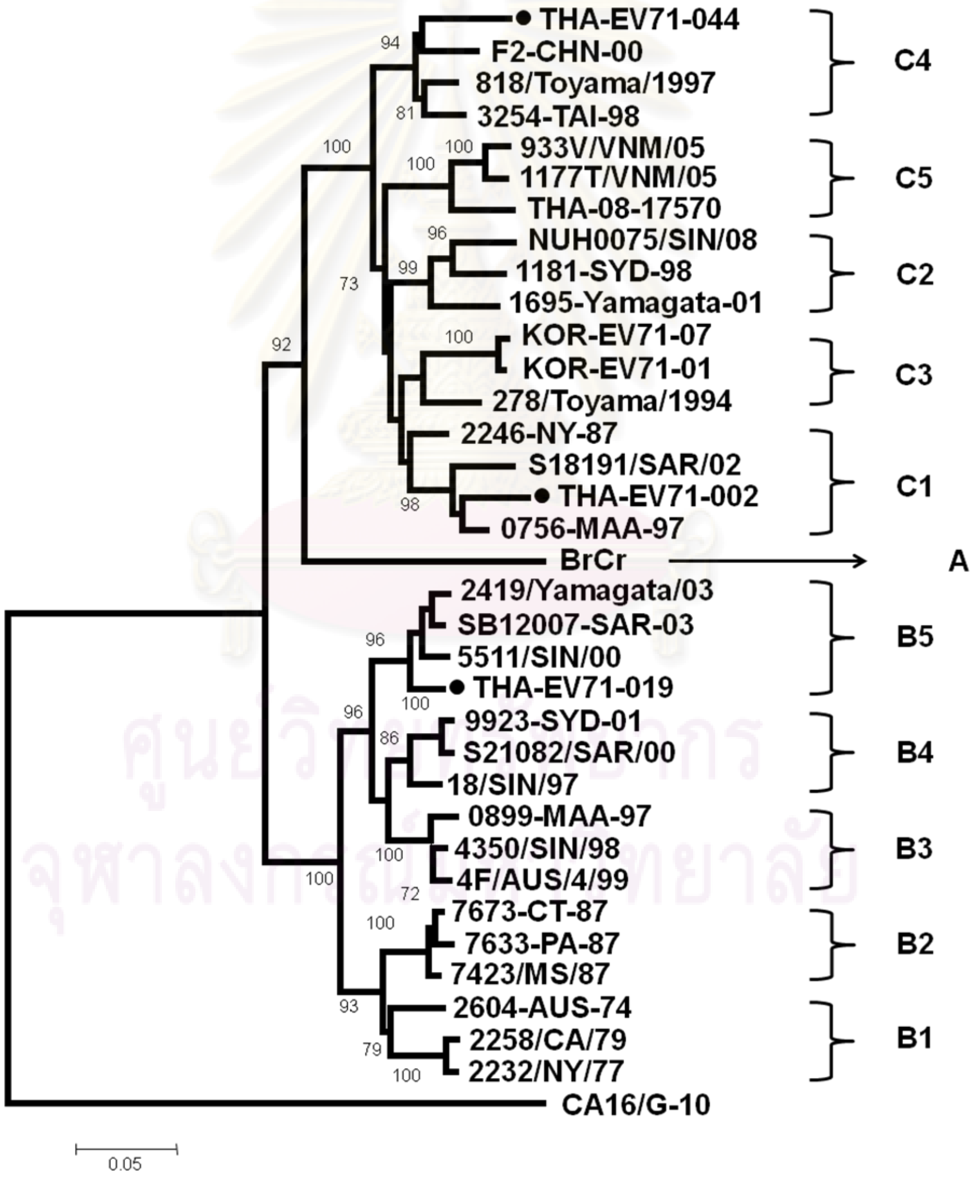
ของ CV-A16-C ทำการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ โดยมีค่า %sequence identity ระหว่าง 80-92% และ 88-100% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ CV-A16-B

และเมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ที่สมบูรณ์ขนาด 891 nt หรือ 297 aa ของเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์เป็น subgenotype โดยวิเคราะห์เทียบกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และทำ phylogenetic analysis พบว่า THA-EV71-019 ถูกจำแนกเป็นสายพันธุ์ B5 ส่วนสายพันธุ์ THA-EV71-002 ถูกจำแนกเป็นสายพันธุ์ C1 และ สายพันธุ์ THA-EV71-044 ถูกจำแนกเป็นสายพันธุ์ C4



ภาพที่ 9 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ HEV-71 และ CV-A16

โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้างโปรตีนบางส่วน capsid VP1(200 nt) จากตัวอย่างทั้ง 28 ตัวอย่างที่ให้ ผลบวก ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetics Analysis version 4.0 (MEGA4) (www.megasoftware.net) นั้น เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Kimura's two-parameter และ ค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000 กำหนดให้เส้นตรงใต้ภาพแทนจำนวน nucleotide substitution ต่อตำแหน่ง และ prototype strain ของสายพันธุ์ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ค่า %nucleotide identity และ deduced amino acid identity แทน BrCr คือสายพันธุ์ที่เป็น prototype strain ของ HEV-71, G-10 คือสายพันธุ์ที่เป็น prototype strain ของ CV-A16

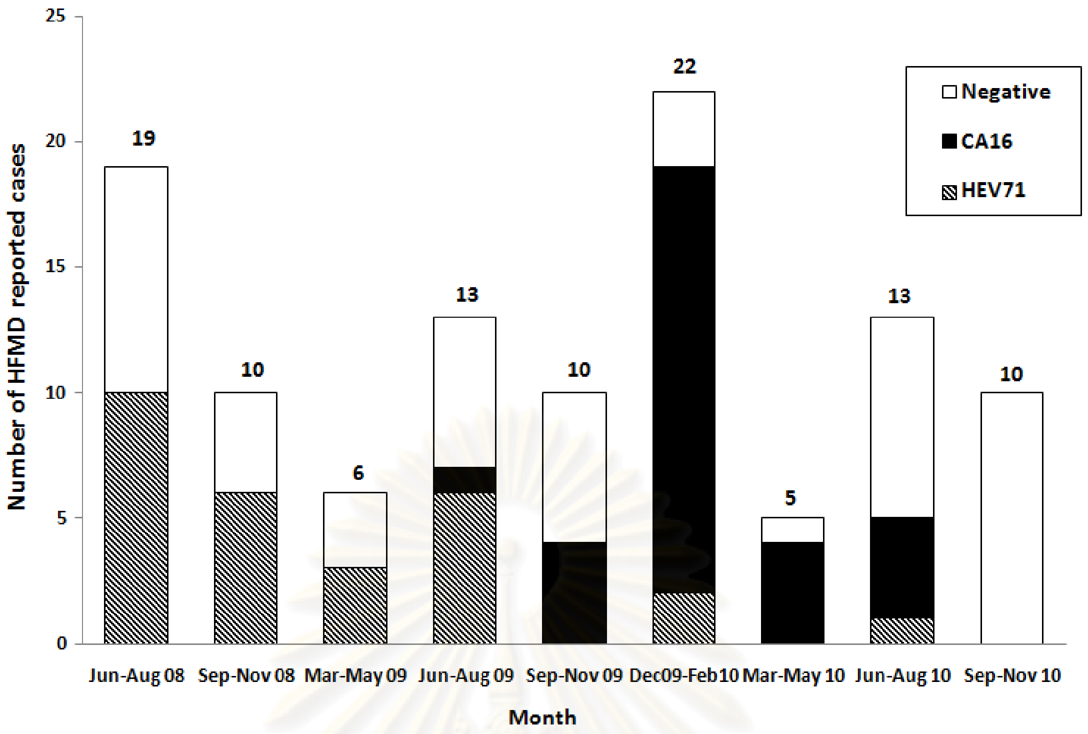


ภาพที่ 10 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ HEV-71

โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้างโปรตีนสมบูรณ์ capsid VP1 (891 nt) จากตัวอย่างที่คัดเลือกมา 3 ตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetics Analysis version 4.0 (MEGA4) (www.megasoftware.net) นั้น เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Kimura's two-parameter และ ค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000 กำหนดให้เส้นตรงใต้ภาพแทนจำนวน nucleotide substitution ต่อตำแหน่ง และ prototype strain ของสายพันธุ์ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ค่า %nucleotide identity และ deduced amino acid identity แทน BrCr คือตัวแทนของ genotype A, CV-A16/G-10 คือตัวอย่างไวรัสสายพันธุ์อื่น (outgroup) เพื่อใช้เป็นเกณฑ์การเปรียบเทียบ ●( ) คือ ตัวอย่างที่คัดเลือกไปศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุล

1.3 การระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CA-16

ในการศึกษาการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในระยะเวลาที่ทำการศึกษานี้ ระหว่างเดือนธันวาคม2009 – ธันวาคม 2010 เปรียบเทียบกับที่มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ระหว่างเดือนมิถุนายน2008 – พฤศจิกายน2009 พบว่ารูปแบบของเชื้อที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคมือเท้าปากแตกต่างกันในแต่ละปี โดยเดือนมิถุนายน2008 – พฤศจิกายน2009 พบเชื้อ HEV-71 มีอัตราการระบาดมากที่สุด ค่าความชุกเท่ากับ 47.9% รองลงมาคือ CV-A16ค่าความชุกเท่ากับ 8.3% นอกจากนี้ยังพบเชื้อ CA-10 มีค่าความชุกเท่ากับ 2.1% ส่วนในระหว่างเดือนธันวาคม2009 – ธันวาคม2010 พบว่า เชื้อ CV-A16มีอัตราการระบาดมากที่สุด ค่าความชุกเท่ากับ 50% และเชื้อ HEV-71 มีค่าความชุกเท่ากับ 6% ไม่พบเชื้อ CA-10 ในระยะเวลาที่ทำการศึกษานี้ นอกจากนี้พบว่าเดือนที่มีอัตราการระบาดของเชื้อ CV-A16มากที่สุด คือเดือนกุมภาพันธ์2010 คิดเป็น 48% (12/25) ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด และไม่ตรวจพบเชื้อทั้งสองชนิดระหว่างเดือนกันยายน – พฤศจิกายน2010



ภาพที่ 11 แสดงการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในช่วงระยะเวลาก่อนทำการศึกษาและที่เริ่มทำการศึกษาจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละเดือนกำกับด้วยตัวเลขด้านบนแผนภูมิ

ส่วนที่ 2 **ผลการศึกษาข้อมูล** coding sequence **ของเชื้อ** HEV-71 **และ** CV-A16

ในการศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 โดยการวิเคราะห์ลักษณะทั่วไป ความคล้ายคลึงของไวรัสในสายพันธุ์เดียวกัน หรือลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเพาะของไวรัสแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกันนั้น ผู้วิจัยได้ทำการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งหมด 5 strains แบ่งเป็นเชื้อ HEV-71 ทั้ง 2 จีโนไทป์ เป็นจำนวน 3 สายพันธุ์ และ CV-A16 1 จีโนไทป์ เป็นจำนวน 2 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งทำการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา โดยอ้างอิงจากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการทำ phylogenetic analysis ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 และค่า %identity เป็นเกณฑ์ สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV-71 และ CV-A16 ที่ได้นั้น พบว่าแต่ละตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษานั้น มีค่า %pairwise nucleotide identity เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype strain) ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำการสุ่มคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HEV-71 genotype B มา 1 ตัวอย่าง และ genotype C มา 2 ตัวอย่าง และเชื้อ CV-A16 genotype C มา 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันและมีปริมาณไวรัสมาก เพื่อใช้

เป็นตัวแทนในการศึกษาข้อมูล coding sequence ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ที่ถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อที่ตรวจพบในผู้ป่วยโดยตรง โดยตัวแทนของ HEV-71 genotype B คือ THA-EV71-019 (JF738001), ตัวแทนของ HEV-71 genotype C ได้แก่ THA-EV71-002 (JF738000) และ THA-EV71-044 (JF738002), ตัวแทนของ CV-A16genotype C ได้แก่ THA-CV-A16-090 (JF738003) และ THA-CV-A16-069 (JF738004) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และลักษณะทั่วไปของ coding sequence สามารถสรุปได้ดังนี้

2.1 การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis

ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ทั้ง 5 strains พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ coding sequence ที่ถอดรหัสได้ หรือลำดับกรดอะมิโนในส่วน polyprotein ที่แปลรหัสได้ในการศึกษานี้ กับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank นั้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลให้ผลที่สอดคล้องกับการจำแนกสายพันธุ์ด้วยการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสร้างโปรตีน capsid VP1 ดังต่อไปนี้

- สายพันธุ์ HEV71-B คือ THA-EV71-019

โดยพบว่า THA-EV71-019 เป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่เข้ารับการรักษาในเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2009 เก็บตัวอย่างจาก vesicle fluid, rectal swap และ stool พบว่าตัวอย่างนี้ จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกับ FJ461781 มากที่สุด เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศ สิงคโปร์ ปี ค.ศ. 2008 เก็บตัวอย่างจาก throat swap มีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 98% และ 100% ตามลำดับ

- สายพันธุ์ HEV71-C คือ THA-EV71-002 และ THA-EV71-044

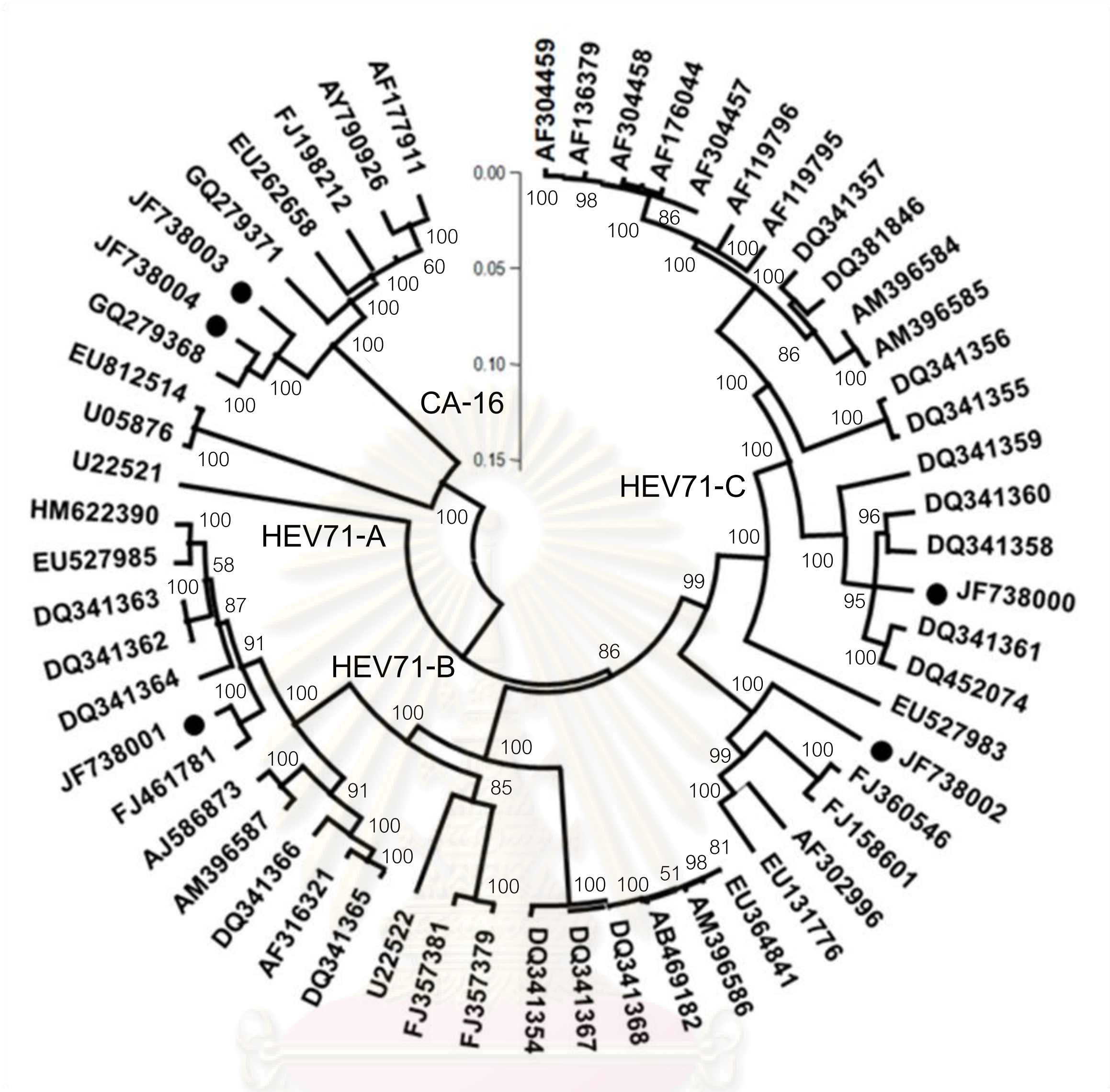
ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HEV-71 ได้มาจากการถอดรหัสสารพันธุกรรมของตัวอย่าง THA-EV71-002 และ THA-EV71-044 ซึ่งได้มาจากตัวอย่าง stool ที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่เข้ารับการรักษาในเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2009 และเดือนสิงหาคม ปี ค.ศ. 2010 ตามลำดับ โดย THA-EV71-002 มีความคล้ายคลึงกับ DQ341361 มากที่สุด เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศออสเตรเลีย ปี ค.ศ. 2000 โดยมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ

96% และ 99% ตามลำดับ สำหรับ THA-EV71-044 มีความคล้ายคลึงกับ FJ158601 มากที่สุด เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศจีน ปี ค.ศ. 2008 โดยมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 91% และ 98% ตามลำดับ

- สายพันธุ์ CV-A16-C คือ THA-CVA16-090 และ THA-CVA16-069

ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ THA-CVA16-090 และ THA-CVA16-069 ซึ่งได้มาจากตัวอย่าง stool ที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่เข้ารับการรักษาในเดือนกรกฎาคม ปี ค.ศ. 2010 และ กุมภาพันธ์ ปี ค.ศ. 2010 ตามลำดับ พบว่าทั้ง 2 strains จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกับ GQ279368 เป็น สายพันธุ์ที่พบในประเทศจีน ปี ค.ศ. 2008 โดย THA-CV-A16-090 มีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 96% และ 99% ตามลำดับ และ THA-CVA16-069 มีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 97% และ 99% ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 12 ผลการทำ phylogenetic analysis เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ polyprotein ซึ่งได้มาจากการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง แสดงด้วยสัญลักษณ์ (●) ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม MEGA 4 เลือกใช้ค่า พารามิเตอร์ Neighbor-joining method, Kimura’s 2-parameter และค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000

2.2 ลักษณะทั่วไปของ complete coding sequence ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16

ORF ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ครอบคลุมขนาดกว่า 90% ของความยาวจีโนม และยีนต่างๆ มีการจัดเรียงตัวเหมือนกับไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ ในตระกูล *Picornaviridae* ผลการวิเคราะห์ลักษณะ ORF ของ HEV-71 และ CV-A16พบว่ามีขนาดเท่ากัน โดยมีขนาด 6,582 nt หรือ 2,193 aa องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ต่างๆใน coding sequence ของ HEV-71 และ CV-A16 พบว่า ประกอบด้วยเบส adenine (A) เป็นส่วนประกอบหลัก คิดเป็น 28% รองลงมาคือ uridine (U) 25%, guanine (G) 24% และ cytosine (C) 23% ตามลำดับ สรุปได้ว่าค่าเฉลี่ยของเบสทั้ง 4 ชนิดของ HEV-71และ CV-A16มีค่าไม่แตกต่างกัน

ผลการพิจารณา identity matrix ของ polyprotein ของ HEV-71 แต่ละสายพันธุ์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบภายในสายพันธุ์ HEV71-B มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.3% (96.7-99.8%) และใน HEV71-C มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 95.3% (90.7-99.9%) แสดงให้เห็นว่า HEV71-C มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์มากกว่า HEV71-B ในปัจจุบันข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ coding sequence ของ CV-A16 ที่มีรายงานในฐานข้อมูลมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ไม่สามารถพิจารณาความหลากหลายภายในสายพันธุ์ได้

ลักษณะของ ORF terminator ของ HEV-71 และ CV-A16ประกอบด้วย stop codon ทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ UAA, UAG และ UGA ผลการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV71-B พบว่าส่วนมากใช้ UAA เป็น stop codon โดย THA-EV71-019 ใช้ UAA ส่วน HEV71-C พบว่าส่วนมากใช้ UAA เป็น stop codon เช่นเดียวกัน และพบว่ามีการใช้ UGA เป็นส่วนน้อย โดย THA-EV71-002 ใช้ UGA และ THA-EV71-044 ใช้ UAG สรุปได้ว่า HEV-71 ทั้งสองสายพันธุ์น่าจะมีการเลือกใช้ UAA เป็น stop codon หลักเช่นเดียวกับใน BrCr หรือ HEV71-A ส่วน stop codon ที่พบใน CV-A16-C ทั้ง 2 ตัวอย่าง ใช้ UAA และ coding sequence ของ CV-A16ที่มีรายงานในฐานข้อมูลมีอยู่ทั้งหมด 10 strain โดย 8 strain ใช้ UAA และอีก 2 strain รวมทั้ง prototype strain (genotype A, G-10) ใช้ UAG ไม่สามารถสรุปการเลือกใช้ stop codon ของ CV-A16 ได้เนื่องจากข้อมูลที่มีอยู่อย่างจำกัด

ตารางที่ 9 ลักษณะทั่วไปของ coding sequence และขนาด viral protein ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16

Strain	ORF			viral protein (aa)										
				P1				P2			P3			
	length		%G + C	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
	(nt)	(aa)	content											
EV71-002	6,582	2,193	47.8%	69	254	242	297	150	99	329	86	22	183	462
EV71-019	6,582	2,193	47.8%	69	254	242	297	150	99	329	86	22	183	462
EV71-044	6,582	2,193	47.9%	69	254	242	297	150	99	329	86	22	183	462
CV-A16-090	6,582	2,193	47.1%	69	254	242	297	150	99	329	86	22	183	462
CV-A16-069	6,582	2,193	47.4%	69	254	242	297	150	99	329	86	22	183	462

	BrCr [A]	G-10 [A]	DQ341364 [B]	FJ461781 [B]	EU527983 [C]	DQ341360 [C]	EV71 -002	EV71 -019	EV71 -044	CA16 -090	CA16-069
BrCr[A]	-										
G-10[A]	88%	-									
DQ341364[B]	96%	90%	-								
FJ461781[B]	95%	89%	99%	-							
EU527983[C]	95%	89%	96%	96%	-						
DQ341360[C]	95%	89%	96%	96%	98%	-					
EV71-002	95%	89%	96%	96%	98%	99%	-				
EV71-019	95%	89%	99%	100%	96%	96%	96%	-			
EV71-044	95%	90%	97%	96%	97%	97%	97%	96%	-		
CA16-090	89%	95%	89%	89%	89%	89%	89%	89%	89%	-	
CA16-069	89%	95%	89%	89%	89%	89%	89%	89%	89%	99%	-

ภาพที่ 13 ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity ของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสพันธุกรรม ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ในการศึกษาวิจัยนี้เปรียบเทียบกับ prototype ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

ในการวิเคราะห์ลักษณะของโปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้นมานั้น อ้างอิงจากกระบวนการ translation ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ซึ่งจะแปลรหัสสารพันธุกรรมเป็น polyprotein สายยาวที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยเรียงต่อเนื่องกันตามลำดับของยีนบนจีโนม และโปรตีนเหล่านี้จะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ viral protease เป็นโปรตีนหน่วยย่อย 11 ชนิด ผลจากการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนแต่ละส่วนของ HEV-71 และ CV-A16เปรียบเทียบกัน พบว่าโปรตีนหน่วยย่อยทั้ง 11 ชนิด มีขนาดเท่ากัน ซึ่งการรักษาขนาดของโปรตีนเหล่านี้น่าจะมีความสำคัญในการกำหนดขนาดของอนุภาคไวรัส

ลักษณะสำคัญของกระบวนการ viral protease-dependent cascade โปรตีนสายยาวจะถูกตัดออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อยได้อย่างถูกต้องได้นั้น จะถูกกำหนดด้วยบริเวณตัดจำเพาะระหว่างรอยต่อของโปรตีนแต่ละชนิด ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญซึ่งอยู่ระหว่างรอยต่อของโปรตีนหน่วยย่อยของ HEV-71 และ CV-A16แต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 10 และสามารถสรุปได้ว่า บริเวณตัดจำเพาะแสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันระหว่าง HEV-71 และ CV-A16 โดยส่วนมากจะมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Glutamine/ Glycine (Q/G) เหมือนกันในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นในบริเวณตัดจำเพาะระหว่าง 2B/2C ของ HEV71-B บาง strain ที่แสดงลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะแตกต่างไป โดยมีลำดับเป็น Glutamine/ Serine หรือ Glycine (Q/S,G)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณตัดจำเพาะระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16

protein junction	EV71-002	BrCr	HEV71-B	HEV71-C	CA16-090	G-10
VP4/VP2	K/S	K/S	K/S	K/S	K/S	K/S
VP2/VP3	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
VP3/VP1	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
VP1/2A	L/G	L/G	L/G	L/G	L/G	L/G
2A/2B	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
2B/2C	Q/S	Q/S	Q/S,G	Q/S	Q/S	Q/S
2C/3A	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
3A/3B	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
3B/3C	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
3C/3D	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G

2.3 ผลการวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับ HEV-71 สายพันธุ์รุนแรงบนโปรตีน capsid

ในบริเวณโปรตีน capsid (VP1-VP4) มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อในกลุ่ม Enterovirus จึงทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน capsid โดยเปรียบเทียบสายพันธุ์ของ HEV-71 ที่ไม่รุนแรงในประเทศไทย คือ THA-EV71-002, THA-EV71-019 และ THA-EV71-044 จากผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรคมือ เท้า ปากกับสายพันธุ์ที่รุนแรงที่มีรายงานในต่างประเทศ คือ EV71/7423/MS/87 ที่มีการแยกเชื้อครั้งแรกในปี ค.ศ. 1987 จากเด็กผู้ชายที่ป่วยเป็นโรค paralysis[52]

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่จะถอดรหัสไปเป็นโปรตีน capsid ของเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์ในประเทศไทย พบว่า ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนมีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 84 – 88% และ 98 – 99% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ และข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนมีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 83 – 88% และ 97 – 99% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ

7423/MS นอกจากนี้พบว่า %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์มีค่าน้อยกว่า 83% เมื่อเปรียบเทียบกับ protype strain (BrCr)

โปรตีน VP4 : จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีน VP4 ระหว่างเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์, 7423/MS และ BrCr พบว่า มี %sequence identity เท่ากับ 100%

โปรตีน VP2 : พบการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนลักษณะที่แตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 114 มีความหลากหลายมากกว่าตำแหน่งอื่นๆในส่วนที่ทำการวิเคราะห์นี้ ตำแหน่ง 195 พบสายพันธุ์ EV71-019 และ 7423/MS เปลี่ยนแปลงจาก V195 เป็น I195 ตำแหน่ง 146 และ 293 พบสายพันธุ์ EV71-044 เปลี่ยนแปลงจาก G146 เป็น S146 และ F293 เป็น Y293 ตามลำดับ ตำแหน่ง 214 พบสายพันธุ์ EV71-002 เปลี่ยนแปลงจาก H214 เป็น Y214 ตำแหน่ง 246 พบสายพันธุ์ EV71-019 เปลี่ยนแปลงจาก V246 เป็น I246 ตำแหน่ง 267 และ 269 พบสายพันธุ์ EV71-002 และ EV71-044 เปลี่ยนแปลงจาก M267 เป็น I267 และ T269 เป็น A269 ตามลำดับ นอกจากนี้ ตำแหน่ง 315 พบสายพันธุ์ 7423/MS เปลี่ยนแปลงจาก A315 เป็น G315 และพบกรดอะมิโนของ BrCr ที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 163 และ 212

โปรตีน VP3 : พบการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนลักษณะที่แตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 329 และ 392 พบสายพันธุ์ EV71-019 เปลี่ยนแปลงจาก L329 เป็น P329 และ L392 เป็น I392 ตามลำดับ ตำแหน่ง 416 และ 423 พบทั้ง 3 สายพันธุ์ในประเทศไทยเปลี่ยนแปลงจาก D416 เป็น N416 และ M423 เป็น L423 ตามลำดับ ตำแหน่ง 555 และ 562 พบสายพันธุ์ EV71-002 และ EV71-044 เปลี่ยนแปลงจาก T555 เป็น A555 และ A562 เป็น G562 ตามลำดับ ตำแหน่ง 557 และ 563 พบสายพันธุ์ EV71-019 และ 7423/MS เปลี่ยนแปลงจาก D557 เป็น H557 และ T563 เป็น S563 ตามลำดับ นอกจากนี้ ตำแหน่ง 538 พบสายพันธุ์ 7423/MS เปลี่ยนแปลงจาก I538 เป็น L538 และ ตำแหน่ง 560 ของ BrCr ที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น

โปรตีน VP1 : เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ VP1 ของทั้ง 3 สายพันธุ์ในประเทศไทย 7423/MS และ BrCr พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนมีความหลากหลายมากกว่าโปรตีนส่วนอื่นมากที่สุด โดยพบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งหมด 21 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 583, 587, 595, 596, 608, 623, 663, 710, 729, 732, 737, 748, 749, 805, 809, 811, 814, 840, 847, 854 และ 857

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่จะถอดรหัสไปเป็นโปรตีน capsid ของเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์ในประเทศไทย 7423/MS และ BrCr สามารถสรุปได้ว่า โปรตีน VP4 เป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์มากที่สุด โปรตีน VP2 และ VP3 มีตำแหน่งของการเกิด mutations ที่ใกล้เคียงกัน และพบความหลากหลายในการเกิด mutations มากที่สุดในส่วนของโปรตีน VP1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน capsid (VP2, VP3 และ VP1)

Strains	Gene																				
	VP1																				
	583 (18)	587 (22)	595 (30)	596 (31)	608 (43)	623 (58)	663 (98)	710 (145)	729 (164)	732 (167)	737 (172)	748 (183)	749 (184)	805 (240)	809 (244)	811 (246)	814 (249)	840 (275)	847 (282)	854 (289)	857 (292)
BrCr	K	P	P	D	K	A	K	R	D	D	P	S	S	S	E	S	I	S	D	T	T
MS/7423/87	R	Q	Q	N	E	T	E	E	E	E	Q	L	T	.	K	P	V	A	N	.	N
THA-EV71-019[B5]	R	R	Q	N	E	T	E	E	.	E	Q	L	T	.	K	P	V	A	N	.	.
THA-EV71-002[C1]	R	Q	Q	N	.	.	E	E	.	E	Q	L	.	T	K	P	.	A	N	A	.
THA-EV71-044[C4]	R	Q	Q	N	.	.	E	Q	.	E	Q	L	.	T	K	P	V	A	N	.	.

Strains	Genes																				
	VP2											VP3									
	114	146	163	195	212	214	246	267	269	293	315	329	392	416	423	538	555	557	560	562	563
BrCr	N	G	P	V	N	H	V	M	T	F	A	L	L	D	M	I	T	D	E	A	T
MS/7423/87	D	.	Q	I	D	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	L	.	H	Q	.	S
THA-EV71-019[B5]	D	.	Q	I	D	.	I	.	.	.	.	P	I	N	L	.	.	H	Q	.	S
THA-EV71-002[C1]	S	.	Q	.	D	Y	.	I	A	.	.	.	.	N	L	.	A	.	Q	G	.
THA-EV71-044[C4]	S	S	Q	.	D	.	.	I	A	Y	.	.	.	N	L	.	A	.	Q	G	.

BrCr : prototype strain ของ HEV-71, MS/7423/87 : สายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 ที่มีความรุนแรง

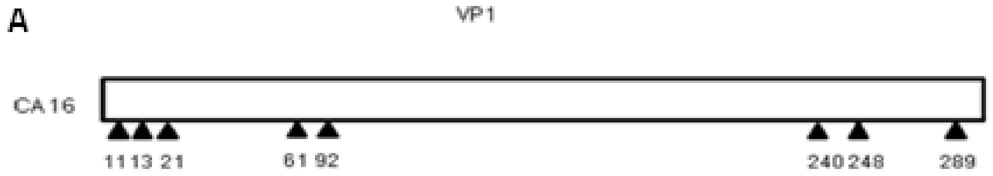
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ผลการวิเคราะห์บนโปรตีน VP1

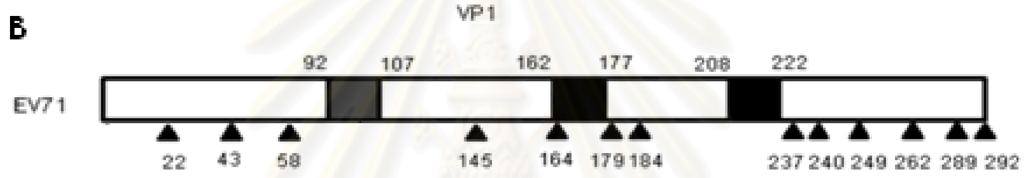
ลักษณะทั่วไปของ viral capsid protein 1 (VP1) เป็นโปรตีน capsid ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด จัดเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของ icosahedral capsid ของอนุภาคไวรัส โปรตีนชนิดนี้มีบทบาทที่สำคัญหลายประการ เช่น ในการกำหนด antigenicity ของไวรัส เนื่องจากเป็นส่วนหนึ่งของ epitope ของไวรัสที่จะถูกจับด้วย neutralizing antibody ใช้ในการแยกสายพันธุ์ของไวรัส (genotyping) และทำหน้าที่เป็น receptor attachment site ของไวรัสในการเข้าจับกับ receptor เพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ที่สมบูรณ์ (891 nt) ของเชื้อ CV-A16พบว่า % ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ B กับสายพันธุ์ C อยู่ในช่วง 2 – 12% และ % ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง genotype หรือ subgenotype อยู่ในช่วง 0 – 1% และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ที่สมบูรณ์ของเชื้อ HEV-71 พบว่า % ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง genotype หรือ subgenotype อยู่ในช่วง 8 – 19% และ % ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง genotype หรือ subgenotype อยู่ในช่วง 0.4 – 5%

ผลการวิเคราะห์รูปแบบความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีน VP1 ที่สมบูรณ์ (297 aa) ในกลุ่มของเชื้อ CV-A16หรือ HEV-71 แสดงดังภาพที่ 13 พบว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนใน CV-A16มีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับใน HEV-71 จำนวนกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างสายพันธุ์ของ CV-A16มีค่าเท่ากับ 6 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนพบได้ทั้งใน CV-A16สายพันธุ์ B และสายพันธุ์ C ในขณะที่จำนวนกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างสายพันธุ์ของ HEV-71 มีค่าเท่ากับ 8 และพบว่ามีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนข้ามสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ C ในตำแหน่งที่ 43, 58, 184 และ 240



	11	13	21	61	92	240	248	289
AM292465[B]	T	N	S	K	I	T	T	A
AM292468[B]	T	N	S	K	I	T	T	A
AB465369[B]	T	D	T	K	I	T	A	T
AM292483[C]	T	N	T	K	V	T	T	T
AM292444[C]	T	N	T	K	I	I	T	T
JF738003*[C]	T	N	T	R	I	T	T	T
JF738004*[C]	A	N	T	K	I	T	T	T



	22	43	58	145	164	179	184	237	240	249	262	289	292
AF009535[B2]	Q	E	T	Q	E	V	T	T	S	V	I	T	N
AY207642[B3]	Q	E	T	G	E	I	T	N	S	V	I	T	N
AY940107[B4]	Q	E	T	E	E	V	T	T	S	V	I	T	T
JF738001*[B5]	R	E	T	E	D	V	T	T	S	V	I	T	T
AM490161[C5]	Q	K	A	E	D	V	S	T	T	I	V	A	T
JF738000*[C1]	Q	K	A	E	D	V	S	T	T	I	I	A	T
JF738002*[C4]	Q	K	A	Q	D	V	S	T	T	V	I	T	T

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 14 ความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีน capsid VP1 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความหลากหลายแสดงด้วยสัญลักษณ์ (▲) และ * คือสายพันธุ์ในประเทศไทย

2.5 ผลการวิเคราะห์ในส่วน 5´-UTR

ลักษณะจีโนมของ Enterovirus และ Rhinovirus ประกอบด้วยส่วนที่เป็น 5´-UTR ที่มีขนาดยาว และ 3´-UTR ที่มีขนาดสั้นๆ ในส่วนของ 5´-UTR แบ่งตามหน้าที่ออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็น cloverleaf (nts 1 ถึง 89 - 101) และ IRES (nts 123 - 126 ถึง 602 - 605) โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ translation ของไวรัส IRES ของ poliovirus มีขนาดประมาณ 450 nt และโครงสร้างทุติยภูมิในบริเวณนี้ประกอบด้วย 5 stem-loop ได้แก่ domain II - VI[53] จากผลการศึกษาของ Svitkin และคณะ[54] พบว่า poliovirus สายพันธุ์ที่นำมาผลิตวัคซีนที่ชื่อว่า “Sabin vaccine strain” มีการเกิด point mutation ในส่วนของ domain V IRES

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ domain V IRES ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ทั้ง 5 สายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของ poliovirus type 1 (J02281) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 5 สายพันธุ์มีความหลากหลายในบริเวณนี้ โดยมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น 14 ตำแหน่ง มีสองบริเวณที่มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 สายพันธุ์ ได้แก่ ตำแหน่ง 495 และ 500 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้โดยภาพรวม พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นในลักษณะเป็นกลุ่ม (cluster) โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ prototype strain BrCr การเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงตำแหน่ง 480 – 510 ซึ่งในช่วงตำแหน่งนี้อยู่ในส่วนที่มีรายงานการเกิด mutation ของ Sabin vaccine strain คือ ตำแหน่ง 472 เปลี่ยนจาก A เป็น U ตำแหน่ง 480 เปลี่ยนจาก A เป็น G และ ตำแหน่ง 481 เปลี่ยนจาก G เป็น A[54]

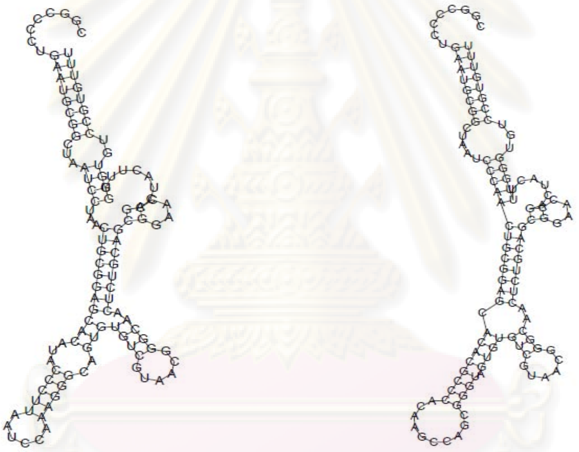
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)

```
                               460                 480                 500                 520
                  ..|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
BrCr              CGGCCCCUGAAUGCGGCUAAUCCUAACUGCGGAGCACAUACCCUUAAUCCAAAGGGCAGUGUGUCGUAACGGGCAACUCU
THA_EV71_002      ...................................G..C....AC.UA...GU........C..................
THA_EV71_019      .......................................G....C......G....U............U..........
THA_EV71_044      .......................C..............CG...AC..G...GC...U.......................
THA_CA16_090      ...................................G.GC.....C......GG......C.C.......U...U......
THA_CA16_069      ...................................G.GC.....C......GU......C.C.......U...U......
PMV               .......................C...CU.......GG.GGU.AC..A...GU.AUUG.CC..........C....G..C

                          540           560
                  ..|....|....|....|....|....|......
BrCr              GCAGCGGAACCGACUACUUUGGGUGUCCGUGUUU
THA_EV71_002      ..................................
THA_EV71_019      ..................................
THA_EV71_044      ..................................
THA_CA16_090      ..................................
THA_CA16_069      ..................................
PMV               .UG...............................
```

(B)



BrCr THA-EV71-044

ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ IRES domain V (A), การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ IRES domain V (B) โดยอาศัยข้อมูลของ BrCr

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 ผลการวิเคราะห์ในส่วน $3D^{pol}$

$3D^{pol}$ มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase มีบาทสำคัญในการ replication ของไวรัส สร้างได้ทั้ง sense RNA ((+) RNA) และ antisense RNA ((-) RNA) รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การเกิด mutation ใน $3D^{pol}$ บริเวณ finger domain มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของ poliovirus ในส่วน finger domain นี้จะมีความ flexible สูง มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง (modulating) และการ oligomerization ของเอนไซม์ polymerase ในการเข้าจับกับนิวคลีโอไทด์[55] [56]

ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนใน $3D^{pol}$ บริเวณ finger domain ของทั้ง 5 สายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับ poliovirus พบว่า มีความหลากหลายของกรดอะมิโนทั้ง 5 สายพันธุ์ 16 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 19 ตำแหน่ง โดยในกลุ่ม HEV-71 สายพันธุ์ C แสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันหนึ่งตำแหน่ง คือ K2127 ในขณะที่กลุ่ม CV-A16สายพันธุ์ C จะแสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันภายในกลุ่มเพียงตำแหน่งเดียวเช่นกัน คือ S2073 ในขณะที่ลักษณะของการเกิด amino acid substitution เพียง 1 ตำแหน่งพบได้กระจัดกระจายในบริเวณ finger domain นี้ และพบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่ง 1982, 2159 และ 2182 มีความหลากหลายมากกว่าตำแหน่งอื่นๆในส่วนที่ทำการวิเคราะห์นี้ ผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการเกิดลักษณะ mutation hot-spot อยู่ในช่วง 1990 – 1994 และตำแหน่ง 1994 แสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันในกลุ่มของเชื้อ HEV-71 สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมีกรดอะมิโนเป็น V1994 แต่ในกลุ่มของเชื้อ HEV-71 สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงมีกรดอะมิโนเป็น I1994[55] [56]

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของ $3D^{pol}$ ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ทั้ง 5 สายพันธุ์ในประเทศไทย พบว่า มีค่า %sequence identity เท่ากับ 94% เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในกลุ่มของเชื้อ HEV-71 และเท่ากับ 99% เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในกลุ่มของเชื้อ CV-A16และเมื่อเปรียบเทียบ HEV-71 กับ prototype strain (BrCr) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีค่า %sequence identity ระหว่าง 92 – 94% เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบ CV-A16กับ prototype strain (G-10) พบว่ามีค่า %sequence identity เฉลี่ยเท่ากับ 93%

```
             1940                1960                1980                2000
               |                   |                   |                   |
EV71/BrCr   TGSAVGCNPDVFWSKLPILLPGSLFAFDYSGYDASLSPVWFRALELVLREIGYSEEAVSLIEGINHTHHVYRNKTYCVLG 80
EV71-002    .............................................I.................................. 80
EV71-019    .............................................V.......T.......................... 80
EV71-044    ................................................................................ 80
CA16-090    .............................................V.................................. 80
CA16-069    .............................................V.................................. 80
PVM         .......D..L....I.V.MEEK......T........A..E..KM..EK..FGDR~.DY.DYL..S..L.K......K. 79

             2020                2040                2060                2080
               |                   |                   |                   |
EV71/BrCr   GMPSGCSGTSIFNSMINNIIIRTLLIKTFKGIDLDELKMVAYGDDVLASYPFPIDCLEWGKTGKEYGLTMTPADKSPCFN 160
EV71-002    .....................................N....................LA.................... 160
EV71-019    .....................................N....................LA.................... 160
EV71-044    ......................A..............N....................LA.................... 160
CA16-090    .....................................N..................S.LA.................... 160
CA16-069    .....................................N..............S...S.LA.................... 160
PVM         ..................L......L..Y......H...I......I....HEV.ASLLAQS..D...........AT.E 159

             2100                2120                2140                2160
               |                   |                   |                   |
EV71/BrCr   EVTWENATFLKRGFLPDHQFPFLIHPTMPMREIHESIRWTKDARNTQDHVRSLCLLAWHNGKEEYEKFVSTIRSVPIGRA 240
EV71-002    ..............................K......................................G.......... 240
EV71-019    ..............................................................D.............V.K. 240
EV71-044    ..N..............E............K...............................Q.......A.......K. 240
CA16-090    ..............................................................................K. 240
CA16-069    ..............................................................................K. 240
PVM         T.....V.....F.RA.EKY......V..K...........P..................E...N..LAK.......... 239

             2180
               |
EV71/BrCr   LAIPNLENLRRNWLELF 257
EV71-002    .....F........... 257
EV71-019    ....SF........... 257
EV71-044    .....Y......L.... 257
CA16-090    .....F........... 257
CA16-069    .....F........... 257
PVM         .LL.EYST.Y.R..DS. 256
```

ภาพที่ 16 ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ finger domain ของ 3D[pol] ของทั้ง 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ poliovirus type 1 (Mahoney)(PVM) accession number คือ J02281 และ BrCr

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

เริ่มมีการแยกวิเคราะห์เชื้อ HEV-71 ได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1969 ที่แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกาจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยเด็กอายุ 9 เดือนที่ป่วยเป็นโรคสมองอักเสบ (encephalitis)[22] และการแยกวิเคราะห์เชื้อ HEV-71 ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคมือ เท้า ปาก ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1973 ที่ประเทศญี่ปุ่น[23] - [24] หลังจากนั้นมีรายงานการระบาดจากประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบเอเชียแปซิฟิก ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น, มาเลเซีย, สิงคโปร์, ไต้หวัน และเวียดนาม

ผลจากการศึกษาการระบาดของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ในประชากรไทยระหว่างปี ค.ศ. 2009 - 2010 ด้วยวิธี semi-nested PCR พบว่า มีค่าความชุกของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 เท่ากับ 6% และ 50% ตามลำดับ ดังนั้นเชื้อ CV-A16 เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคมือ เท้า ปากมากที่สุดระหว่างปี ค.ศ. 2009 – 2010 พบว่ามีความแตกต่างจากระหว่างปี ค.ศ. 2008 - 2009 พบเชื้อ HEV-71 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคมือ เท้า ปากมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อ CA-10 ในการระบาดในปีเดียวกัน [3] ผลจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16ด้วยการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนควบคุมการสร้างโปรตีน capsid VP1 และกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสได้จากยีนส่วนนี้ พบว่าเชื้อ CV-A16genotype C เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าความชุกของเชื้อสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 67% ในขณะที่ HEV71-C และ HEV71-B มีค่าเท่ากับ 25% และ 8% ตามลำดับ และพบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสซึ่งได้จากการถอดรหัสสารพันธุกรรมในงานศึกษาวิจัยนี้ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับเชื้อ HEV-71 strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ผลการวิเคราะห์ค่า %identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับ HEV-71 ระหว่างสายพันธุ์ HEV71-C และ HEV71-B มีค่าเท่ากับ 81-85% แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 มีค่าต่ำ และค่า %identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับ CV-A16 ระหว่างสายพันธุ์ CV-A16-C และ CV-A16-B มีค่าเท่ากับ 80-92% แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายภายในสายพันธุ์ของ CV-A16มากกว่า HEV-71 อัตราความชุก

ที่พบในกลุ่มประชากรไทยนี้ มีค่าแตกต่างไปจากผลการศึกษาของประเทศอื่นๆในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งโดยทั่วไปมักพบว่ามี HEV71-B เป็นสายพันธุ์หลักที่ระบาดในกลุ่มประชากร

ในการศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 พบว่าทั้ง HEV-71 และ CV-A16ทุกสายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนประกอบในจีโนมไม่แตกต่างกัน ลักษณะจีโนมซึ่งเป็น RNA สายเดี่ยวขั้วบวกนั้น ประกอบด้วยเบส adenine (A) เป็นหลัก คิดเป็น 28% ขององค์ประกอบทั้งหมด รองลงมาคือ uridine (U) 25%, guanine (G) 24% และ cytosine (C) 23% ตามลำดับ

ผลจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 strains ที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า THA-EV71-019 ถูกจัดเป็นสมาชิกของสายพันธุ์ B, THA-EV71-002 และ THA-EV71-044 ถูกจัดเป็นสมาชิกของสายพันธุ์ C ส่วนการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ CV-A16ทั้ง 2 strain สามารถสรุปได้ว่า THA-CV-A16-090 และ THA-CV-A16-069 ถูกจัดเป็นสมาชิกของสายพันธุ์ C โดยผลที่ได้จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้าง capsid VP1 นั้นให้ผลที่สอดคล้องกับการจัดจำแนก สายพันธุ์ด้วยข้อมูลของ coding sequence จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ข้อมูลของโปรตีน capsid ในการตรวจหาการติดเชื้อและการจำแนกสายพันธุ์ของ HEV-71 นั้น ให้ข้อมูลที่ถูกต้องและเป็นที่เชื่อถือได้

ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน capsid ของเชื้อ HEV-71 ทั้ง 3 สายพันธุ์ในประเทศไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงที่พบในต่างประเทศ พบว่า ลักษณะความหลากหลายเกิดขึ้นส่วนมากจะพบได้ในโปรตีน capsid ที่อยู่ด้านนอกอนุภาคไวรัส (VP1, VP2 และ VP3) แสดงว่า วิวัฒนาการส่วนใหญ่ของเชื้อ HEV-71 น่าจะเกิดขึ้นที่บริเวณดังกล่าวนี้ ในการศึกษา molecular basis ที่เกี่ยวกับความรุนแรงของเชื้อ HEV-71 น่าจะมีการสร้าง recombinant chimeric virus ขึ้นจากสายพันธุ์ที่รุนแรงและสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง เพื่อมาช่วยอธิบายในบริเวณที่เกิด amino acid substitution ที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของไวรัส นอกจากนี้ควรมีการสร้างเป็น mapping ของยีนในบริเวณดังกล่าว[57] เชื้อ rhinovirus และ poliovirus ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Enterovirus มีบริเวณร่องบนผิวหน้าของอนุภาคไวรัสที่เรียกว่า canyon การสร้างบริเวณนี้อาศัยลำดับกรดอะมิโนของ VP1 ร่วมกับ VP3 และจะถูกจดจำได้ด้วย neutralizing antibody ของเจ้าบ้าน ทำให้โครงสร้างนี้มีความอนุรักษ์มากกว่า

บริเวณอื่นๆบนผิวหน้าของอนุภาคไวรัส[58] จากรายงานผลการศึกษาของ Wien และคณะ[59] พบว่ามีการเกิด mutation มากมายในบริเวณที่เป็น receptor ของ poliovirus ได้แก่ โปรตีน VP2 ตำแหน่ง 142 และ โปรตีน VP1 ตำแหน่ง 95, 158, 160, 166, 226, 228, 239 และ 241 ซึ่งจากตำแหน่งของกรดอะมิโนดังกล่าวนี้ พบว่า เป็นตำแหน่งที่มีการอนุรักษ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 คือ THA-EV71-002, THA-EV71-019, THA-EV71-044, 7423/MS และ BrCr ดังนั้น ในตำแหน่งที่เกิด mutation (เฉพาะบางตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณ hydrophobic) ของทั้ง 5 สายพันธุ์ของเชื้อ HEV-71 นี้จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้าง canyon และน่าจะเป็นบริเวณที่เข้าจับกับ receptor ของเจ้าบ้าน

ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนส่วนโปรตีน VP1 พบว่าเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนน้อย ซึ่งมีความสอดคล้องกับ serotype ของ Enterovirus โดยเชื้อ HEV-71 และ CV-A16จัดอยู่ใน human enterovirus สปีชีส์ A (HEV-A) พบตำแหน่ง 164 ของ HEV-71 เพียงตำแหน่งเดียวที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนอยู่ในบริเวณที่เป็นส่วนหนึ่งของ neutralization epitope ของไวรัส คือ กรดอะมิโนตำแหน่ง 162 – 167 และ 208 – 222 [60] โดยสายพันธุ์ B ส่วนมากมีกรดอะมิโนเป็น E และในสายพันธุ์ C ทั้งหมดมีกรดอะมิโนเป็น D นอกจากนี้ไม่พบความหลากหลายของกรดอะมิโนในบริเวณ BC loop คือ กรดอะมิโนตำแหน่ง 92 – 107 เป็นบริเวณที่กำหนด antigenicity ของไวรัส[61] จากผลที่ได้แสดงว่าในการเปลี่ยนแปลงโปรตีน VP1 ตรงบริเวณที่กำหนด antigenicity ของไวรัสเพื่อหลบหลีกภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านนั้นเกิดขึ้นได้ยาก ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่รายงาน antigenic epitope หลักของ CV-A16 และยังไม่มีรายงาน antigenic epitope ในบริเวณโปรตีน VP2 หรือ VP3 ที่มีอยู่ในเชื้อ HEV-71 และ CV-A16

ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ domain V IRES และลำดับกรดอะมิโนใน $3D^{pol}$ บริเวณ finger domain ของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16แต่ละสายพันธุ์ที่ไม่มีความรุนแรงเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของ poliovirus (neurovirulent) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 5 สายพันธุ์มีความหลากหลายในทั้งสองบริเวณนี้ และในการประกอบขึ้นเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของ RNA ไวรัสในส่วน domain V IRES นี้ มีบทบาทสำคัญที่ช่วยรักษาความเสถียรของ domain V ใน poliovirus ดังนั้น รูปแบบความแตกต่างของ mutation ที่เกิดขึ้นใน domain V และบริเวณ finger domain ของ $3D^{pol}$ ของเชื้อ HEV-71 และ

CV-A16 นี้น่าจะลดประสิทธิภาพในขั้นตอนของกระบวนการ translation ของ RNA ไวรัส หรือไปลดความสามารถในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (replication) ทำให้ไวรัสมีการแพร่กระจายได้อย่างจำกัดในเจ้าบ้าน ซึ่งเป็นข้อดีในการเข้ามากำจัดเชื้อของระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิดการติดเชื้อที่มีอาการไม่รุนแรง (mild) ในเจ้าบ้าน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานความสอดคล้องกันระหว่างรูปแบบการเกิด mutation และอาการที่รุนแรงของโรคที่เกิดจาก HEV-71

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบความชุกของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคมือ เท้า ปาก การติดเชื้อ HEV-71 สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง อาจส่งผลให้เกิดอาการที่รุนแรงทางระบบประสาทและเป็นเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ข้อมูลที่เกี่ยวกับตัวไวรัสที่ได้นี้ เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญทำให้เกิดประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและการแพร่กระจายของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เชิงโมเลกุลของเชื้อ HEV-71 และ CV-A16 แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน สามารถถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคและยาต้านไวรัสต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Zhang, Y., et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol* 2009; 44: 262-267.

[2] Theokiss, Z., and Joel, DK. Enterovirus infection. *Pediatrics in Review* 1998; 19: 183-191.

[3] Chatproedprai, S., et al. Clinical and molecular characterization of hand-foot-and-mouth disease in Thailand, 2008-2009. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63: 229-233.

[4] Steven O, M., Silvia, P., Kaija, M., and Mark, AP. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Virol* 2004; 85: 1597-1607.

[5] Wang, JR., et al. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 10-15.

[6] Hosoya, M., et al. Genetic Diversity of coxsackievirus A16 associated with hand foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 112-120.

[7] Tee, KK., et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol* 2010; 84: 3339-3350.

[8] Yan, Z., et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *J Virol* 2010; 7: 94-102.

[9] Simmonds, P., and Welch, J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol* 2006; 80: 483-493.

[10] Pallansch MA and Ross RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses,

echoviruses, and newer enteroviruses. In *Fields Virology, vol 1. Volume 1*. Edited by Knipe DM., et al. Hagerstown, MD, USA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007:866-884.

[11] Chung, P., et al. Duration of enterovirus shedding in stool. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 167–170.

[12] Nasri, D., et al. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 419–434.

[13] Brown, B., Oberste, M., Maher, K., and Pallansch, M. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol* 2003; 77: 8973–8984.

[14] Johansson, S., et al. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the Picornaviridae with a cluster of two unrelated 2A proteins. *J Virol* 2002; 76: 8920–8930.

[15] Hughes, AL. Phylogeny of the Picornaviridae and differential evolutionary divergence of picornavirus proteins. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 143–152.

[16] Schmidt, NJ. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974; 129: 304-309.

[17] Chen, CH., Hsu, BM., and Wan, MT. Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *J Appl Microbiol* 2008; 104: 817–823.

[18] Hsu, BM., Chen, CH., and Wan, MT. Prevalence of enteroviruses in hot spring recreation areas of Taiwan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52: 253–259.

[19] Chan, YF., and AbuBakar, S. Virucidal activity of Virkon S on human enterovirus. *Med J Malaysia* 2005; 60: 246–248.

[20] Stanway, G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol* 1990;

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

71:2483-2501.

[21] Parsley, TB., et al. Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *Rna* 1997; 3:1124-1134.

[22] Pisarev, AV, et al. Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virol* 2004; 78:4487-4497.

[23] McMinn, P. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health signifi cance. *FEMS Microbiol* 2002; 26: 91–107.

[24] Chua, BH., et al. The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. *J Gen Virol* 2008; 89: 1622–1632.

[25] Muir, P., et al. Molecular typing of enteroviruses. current status and future requirements. The European Union concerted action on virus meningitis and encephalitis. *Clin Micro Rev* 1998; 11: 202–227.

[26] Gradi, A., Svitkin, YV., Imataka, H., and Sonenberg, N. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11089-11094.

[27] Calandria, C., Irurzun, A., Barco, A., and Carrasco L. Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Res* 2004; 104:39-49.

[28] Chau, DH., et al. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* 2007; 12: 513-524.

[29] Aldabe, R., Barco, A., and Carrasco, L. Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J Biol Chem* 1996; 271: 23134-23137.

[30] Jong, de, AS., et al. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex

as the target organelle. *J Biol Chem* 2003; 278:1012-1021.

[31] van, Kuppeveld, FJ., et al. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J* 1997; 16: 3519-3532.

[32] Doedens, JR., and Kirkegaard, K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* 1995; 14: 894-907.

[33] Paul, AV., et al. Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* 2003; 77(2): 891–904.

[34] Amineva, SP., Aminev, AG., Palmenberg, AC., and Gern, JE. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J Gen Virol* 2004; 85: 2969-2979.

[35] Dyke, Van, TA., and Flanegan, JB. Identification of poliovirus polypeptide P63 as a soluble RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 1980; 35: 732-740.

[36] Pilipenko, EV., Maslova, SV., Sinyakov, AN., and Agol, VI. Towards identification of *cis*-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: aproposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1739–1745.

[37] Herold, J., and Andino, R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein–protein bridge. *Mol Cell* 2001; 7: 581–591.

[38] Silvestri, LS., Parilla, JM., Morasco, BJ., Ogram, SA., and Flanegan, JB. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3'poly(A) tail. *Virology* 2006; 345: 509–519.

[39] Yamayoshi, S., et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 2009; 15: 798–801.

[40] Nishimura, Y., et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 2009; 15: 794–797.

[41] Lin, YW., et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med* (Maywood)2009; 234: 1166–1173

[42] Vogt, DA., and Andino, R. An RNA element at the 5′-end of the poliovirus genome functions as a general promoter for RNA synthesis. *PLoS Pathog* 2010; 6 (6): e1000936.

[43] Herold, J., and Andino, R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein–protein bridge. *Mol Cell* 2001; 7 (3): 581–591.

[44] Bedard, KM., and Semler, BL. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect* 2004; 6: 702–713

[45] Tai, WC., Hsieh, HJ., and Wu, MT. Hand, foot and mouth disease in a healthy adult caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71. *British Journal of Dermatology* 2009; 160: 890–892.

[46] Chang, LY., et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1999; 354: 1682–1686.

[47] Cardosa, MJ., et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 461–468.

[48] Chang, LY., et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 2007; 356:1226-1234.

[49] Jing, MW., et al. Cardiopulmonary manifestation of fulminant enterovirus 71 infection. *Pediatrics* 2002;101:26-30.

[50] Shia, K.S. et al. Design, synthesis, and structure–activity relationship of pyridyl imidazolidinones: a novel class of potent and selective human enterovirus 71 inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45: 1644–1655.

[51] Li, ZH. et al. Ribavirin reduces mortality in enterovirus 71-infected mice by

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

decreasing viral replication. *J Infect Dis* 2008; 197: 854–857.

[52] Brown, BA., and Pallansch, MA. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res* 1995; 39:195-205.

[53] Skinner, MA., et al. New model for the secondary structure of the 5´ non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulent. *J Mol Biol* 1989; 207:379-392.

[54] Svitkin, YV., Cammack, N., Minor, PD., and Almond, JW. Translation deficiency of the Sabin type 3 poliovirus genome: association with an attenuating mutation C472-U. *Virology* 1990; 175:103-109.

[55] Cornell, CT., and Semler, BL. Subdomain specific functions of the RNA polymerase region of poliovirus 3CD polypeptide. *Virology* 2002; 298: 200-213.

[56] Hansen, JL., Long, AM., and Schultz, SC. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* 1997; 5: 1109-1122.

[57] Singh, S., Chow, TK, V., Chan, KP., Ling, AE., and Poh, CL. RT-PCR, nucleotide, amino acid and phylogenetic analyses of enterovirus type 71 strains from Asia. *J Virol Methods* 2000; 88: 193-204.

[58] Rossmann, MG. Viral cell recognition and entry. *Protein Sci* 1994; 3: 1712-1725.

[59] Wein, MW., Curry, S., Filman, DJ., and Hogle, JM. Structural studies of poliovirus mutants that overcome receptor defects. *Nat Struct Biol* 1997; 4: 666-674.

[60] Foo, DG., et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein off enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res* 2007; 125:61-68.

[61] Ranganathan, S., et al. The hand, foot, and mouth disease virus capsid: sequence analysis and prediction of antigenic sites from homology modeling. *Appl Bioinform* 2002; 1:43 – 52.

[62] Whitton, JL., Cornell, CT., and Feuer, R. Host and virus determinants of Picornavirus pathogenesis and tropism. *Nature Rev Microbiol* 2005; 3: 765 – 776.

[63] Zoll, J., et al. The structure-function relationship of the enterovirus 3´-UTR. *Virus Res* 2009; 139: 209 – 216.

[64] Wu, KX., et al. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71. *Drug Discovery Today* 2010; 15: 1041 – 1051.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเคมี

1. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base	54	g
Boric acid	27.5	g
EDTA (pH 8.0)	20	ml

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	2	g
1 x TBE	100	ml

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	10	μl
น้ำกลั่น	100	μl

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 ml แล้วที่ $4^{\circ}C$

5. DEPC water

DEPC	0.1	ml
น้ำกลั่น	100	ml

เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}C$ นาน 12 ชั่วโมงแล้วนำไป autoclave

6. Reverse Transcription mix

Improm II buffer	4.0	μl
Improm II RT	1.0	μl
10 uM dNTP	2.5	μl
RNase inhibitor	1.0	μl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) :	นางสาวจิรัชญา พื้นผา
เกิด :	8 สิงหาคม 2530
สถานที่เกิด :	กรุงเทพมหานคร
e-mail address :	anfield-alz@hotmail.com
ประวัติการศึกษา :	
พ.ศ. 2548-2551	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2552-ปัจจุบัน	เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วบ.ม.) หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย