

ระบาดวิทยาและจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโคโรนาที่มี การติดเชื้อในผู้ป่วย
ไทยช่วงปี ค.ศ. 2012-2013



นางสาวรพีพรรณ สุณรงค์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERIZATION OF HUMAN CORONAVIRUS IN
THAI PATIENTS DURING 2012-2013

Miss Rapeepun Soonnarong



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ระบาดวิทยาและจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อ
ไวรัสโคโรนาที่มี การติดเชื้อในผู้ป่วยไทยช่วงปี ค.ศ. 2012-
2013

โดย

นางสาวรพีพรรณ สุณรังค์

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิริศักดิ์ หารษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภัตต์ สำราญสำรวจกิจ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

รพีพรรณณ สุณนรงค์ : ระบาดวิทยาและจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโคโรนาที่มี การติดเชื้อในผู้ป่วยไทยช่วงปี ค.ศ. 2012-2013. (MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERIZATION OF HUMAN CORONAVIRUS IN THAI PATIENTS DURING 2012-2013) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงภร, 91 หน้า.

เชื้อไวรัสโคโรนาเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในคน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโคโรนาที่มีการติดเชื้อในผู้ป่วยไทยช่วงเดือนมกราคม 2555 ถึงเดือนธันวาคม 2556 จากตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูก และสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกจำนวนทั้งหมด 5,833 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยการวิเคราะห์ที่บริเวณยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสโคโรนา 0.79% (46/5,833) ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเด็กอายุ 0-5 ปี มีอัตราการติดเชื้อไวรัสโคโรนามากที่สุด 54.35% (25/46) โดยอัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายเท่ากับ 1:1.08 การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสามารถพบได้ตลอดทั้งปี แต่จะพบการติดเชื้อได้สูงในฤดูฝนช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างที่ให้บวกต่อไวรัสโคโรนามาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ที่บริเวณยีน Spike ด้วยวิธี PCR เพื่อสร้าง phylogenetic tree จัดจำแนก HCoV ที่ศึกษาในครั้งนี้ ออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ HCoV-229E 10.87% (5/46), HCoV-OC43 6.52% (3/46), HCoV-NL63 41.30% (19/46) และ HCoV-HKU1 41.30% (19/46) การศึกษาโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาในประชากรไทยในช่วงปี 2555-2556 จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษา ฝ้าระวังป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนสายพันธุ์อื่นๆ ในประชากรไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา ชีวเคมี

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5574205430 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HUMAN CORONAVIRUS (HCOV) / MERS-COV / 229E / NL63 / OC43 /
HKU1 / EPIDEMIOLOGY

RAPEEPUN SOONNARONG: MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND
CHARACTERIZATION OF HUMAN CORONAVIRUS IN THAI PATIENTS DURING
2012-2013. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO-ADVISOR:
ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., 91 pp.

Global emergence of coronaviruses causes respiratory infections in humans. This study investigated the prevalence of HCoV infection in Thai patients for two year from January 2012 to December 2013. In total, 5,833 clinical samples from nasopharyngeal swab/aspirate were collected from Bangkok, Khon Kaen and Chon Buri. Analysis of the rate of infections was performed using PCR and sequence analysis of the viral RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp). HCoV infection was found in 0.79% (46/5,833) of the total samples. Out of all population subsets, HCoV was detected mainly in young patients between the ages of 0 –5 years (25/46). Amongst the positive cases, 56.52% were male and 43.48% were female (1.08:1). During for the two-year period this study HCoV infection occurred throughout the year, although HCoV infection peaked from May to October, which coincided with the rainy season. Moreover, 46 of HCoV positive samples clustered into four genotypes. To assess the relationship among the strains identified, phylogenetic trees were constructed based on the alignment analysis of the HCoV spike gene sequences obtained from PCR. These are HCoV-229E 10.87% (5/46), HCoV-OC43 6.52% (3/46), HCoV-NL63 41.30% (19/46) and HCoV-HKU1 41.30% (19/46). This study thus provides the HCoV infection rate in a Thai cohort from 2012 to 2013. These data may also be useful in modeling other types of coronavirus infection in the Thai population.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ยง ภูวรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโทมาบัณฑิตทำให้ได้ปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์เพียบพร้อมและทันสมัย พร้อมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขปัญหาค้นคว้าของวิทยานิพนธ์ เป็นความรู้ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สัญชัย พยุงกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกคนที่มีส่วนร่วมในการเก็บและรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ด้วยความร่วมมือเป็นอย่างดีของแพทย์ พยาบาล และห้องปฏิบัติการจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลในเครือข่ายภาค กทม จังหวัดกรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาระดับปริญญาโทมาบัณฑิตในครั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาและเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยดำเนินการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และสมาชิกในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำ และกำลังใจ ที่มีค่าและเป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทมาบัณฑิต รวมทั้งคอยให้ความรัก ความอบอุ่น และกำลังใจจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์งานวิจัย	2
สมมติฐาน.....	3
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	6
ข้อจำกัดในการวิจัย	6
คำสำคัญ	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
ประวัติความเป็นมา.....	7
สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของไวรัสโคโรนา.....	9
สารพันธุกรรมและองค์ประกอบของจีโนมไวรัสโคโรนา	11
การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโคโรนา	12
สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนา	13
พยาธิสภาพของการติดเชื้อไวรัสโคโรนา.....	15
ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนา	17
การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของเชื้อไวรัสโคโรนา	18

อุบัติการณ์ของโรค.....	19
การรักษาและป้องกัน	21
การเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) [65]	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
รูปแบบการวิจัย.....	25
ประชากรศึกษา.....	25
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	29
2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA).....	31
3. การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA	31
4. การตรวจสอบผลการสกัด RNA.....	32
5. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design).....	33
6. การตรวจหาเชื้อ HCoV ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	36
7. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ด้วยวิธี nested PCR.....	37
8. Agarose gel electrophoresis และ PCR product purification	38
9. การเตรียม Positive Control โดยวิธี DNA Cloning	40
10. การทดสอบ sensitivity.....	44
11. การทดสอบ specificity.....	44
12. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	45
13. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	46
1. ผลการตรวจสอบการสกัด RNA.....	46
2. ผลการเตรียม Positive Control โดยวิธี DNA Cloning	47
4. ผลการทดสอบ specificity Viral RNA	49
5. ผลการตรวจหาเชื้อ HCoV.....	51
6. ผลการวิเคราะห์อายุและเพศของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ HCoV	53

7.	ผลการวิเคราะห์ฤดูกาลและปีที่ตรวจพบเชื้อ HCoV.....	55
8.	ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อ HCoV.....	57
9.	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp	59
10.	ผลการจัดจำแนกเชื้อ HCoV	61
11.	ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike.....	62
12.	ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อ HCoV	63
13.	ผลการวิเคราะห์การกระจายของเชื้อ HCoV แยกตามสายพันธุ์.....	69
14.	ผลการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน Spike.....	70
	บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	73
	รายการอ้างอิง	79
	ภาคผนวก.....	86
	ภาคผนวก ก	87
	ภาคผนวก ข.....	90
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	91

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1: การแบ่งกลุ่มไวรัสโคโรนาตามลักษณะของแอนติเจนและการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตต่างๆ....14	
ตารางที่ 2: ความชุกของเชื้อ HCoV ในประเทศต่างๆ	20
ตารางที่ 3: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบ GAPDH.....	32
ตารางที่ 4: แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH.....	33
ตารางที่ 5: แสดงสถานะที่ใช้ทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของ GAPDH.....	33
ตารางที่ 6: แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการศึกษา	35
ตารางที่ 7: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HCoV	36
ตารางที่ 8: แสดงสถานะทำ Semi-nested PCR เพื่อ Screen หาเชื้อ HCoV	37
ตารางที่ 9: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อจัดจำแนกเชื้อ HCoV.....	38
ตารางที่ 10: แสดงสถานะที่ใช้ทำ Nested PCR เพื่อจัดจำแนกเชื้อ HCoV	38
ตารางที่ 11: แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ ligation	40
ตารางที่ 12: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ colony PCR.....	42
ตารางที่ 13: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ colony PCR.....	42
ตารางที่ 14: แสดงสถานะที่ใช้ทำ colony PCR.....	42
ตารางที่ 15: แสดงความเข้มข้นและจำนวน copy number ของพลาสมิดที่ positive ต่อ HCoV ..	48
ตารางที่ 16: ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เมื่อจำแนกตามชนิดของตัวอย่าง	52
ตารางที่ 17: ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	53
ตารางที่ 18: ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแบ่งตามช่วงอายุ	54
ตารางที่ 19: ความชุกของเชื้อ HCoV ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013.....	56
ตารางที่ 20: รายละเอียดด้าน เพศ อายุ วันที่เก็บตัวอย่าง สายพันธุ์ที่ติดเชื้อ HCoV ในผู้ป่วย.....	57
ตารางที่ 21: อาการทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อ HCoV สายพันธุ์ต่างๆ	59

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1: แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสโคโรนาเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนภาพ	9
ภาพที่ 2: ลักษณะโครงสร้างของ Human coronavirus [27]	10
ภาพที่ 3: ลักษณะการจัดเรียงตัวและขนาดของยีนบนจีโนมของ Human coronavirus [33].....	11
ภาพที่ 4: การเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของเชื้อ HCoV [39]	12
ภาพที่ 5: การดำเนินของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ HCoV [53]	16
ภาพที่ 6: ขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR [66].....	23
ภาพที่ 7: ขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยวิธี RT-PCR [67].....	24
ภาพที่ 8: วิธีการเก็บ nasopharyngeal aspirate (NPA) [68]	29
ภาพที่ 9: วิธีการเก็บ nasopharyngeal swab (NPS) [69]	30
ภาพที่ 10: วิธีการเก็บ nasal swab, (NS) [70].....	30
ภาพที่ 11: บริเวณของไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในงานวิจัย (ดัดแปลงมาจาก [71]).....	34
ภาพที่ 12: แสดงตัวอย่างผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ด้วยวิธี PCR.....	46
ภาพที่ 13: ผลการตรวจสอบการเตรียม Positive control ด้วยวิธี PCR.....	47
ภาพที่ 14: ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์จากการสกัดพลาสมิด	47
ภาพที่ 15: ผลการทำ PCR ทดสอบ sensitivity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ HCoV.....	49
ภาพที่ 16: ผลการทำ PCR ทดสอบ specificity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดเชื้อ HCoV	50
ภาพที่ 17: แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาเชื้อ HCoV ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	51
ภาพที่ 18: การกระจายตัวของช่วงอายุผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCoV	55
ภาพที่ 19: ความชุกของเชื้อ HCoV ในแต่ละเดือนตั้งแต่ปี ค.ศ. 2012-2013.....	56
ภาพที่ 20: ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp.....	59
ภาพที่ 21: ตัวอย่างผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp ของเชื้อ HCoV	60
ภาพที่ 22: ตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp ของเชื้อ HCoV	60

ภาพที่ 23: แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อ HCoV ด้วยวิธี nested PCR 61

ภาพที่ 24: ตัวอย่าง chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike ของ HCoV-OC43 62

ภาพที่ 25: ตัวอย่างผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike ของเชื้อ HCoV..... 62

ภาพที่ 26: ตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike ของเชื้อ HCoV..... 63

ภาพที่ 27: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-229E โดยอาศัยข้อมูลในส่วน ของยีน spike ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-229E ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้..... 65

ภาพที่ 28: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-OC43 โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน spike ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-OC43 ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้..... 66

ภาพที่ 29: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-HKU1 โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน spike ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-HKU1 ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้..... 67

ภาพที่ 30: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-NL63 โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน spike ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-NL63 ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้..... 68

ภาพที่ 31: การกระจายตัวของเชื้อ HCoV สายพันธุ์ต่างๆ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2012-2013..... 69

ภาพที่ 32: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-229E..... 70

ภาพที่ 33: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-OC43..... 71

ภาพที่ 34: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-HKU1	71
ภาพที่ 35: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-NL63	72



สารบัญแผนภาพ

หน้า

- แผนภาพที่ 1: กรอบความคิดของโครงการวิจัย (เตรียม Positive Control และทดสอบ primer).....4
- แผนภาพที่ 2: กรอบความคิดของโครงการวิจัย (ศึกษาการระบาดของเชื้อ HCoV ในประเทศไทย).....5



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid
CSG	The Coronavirus Study Group
DPP4	Dipeptidyl peptidase 4
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HCoV	Human coronaviruses
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
ml	Mililiter
mM	Milimolar
NaCl	Sodium Chloride
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Round per minute
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
TBE	Tris Borate Buffer
Tm	Melting temperature
μ l	Microliter
μ M	Micromolar
VTM	Viral Transport Media

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อไวรัสโคโรนา (Coronavirus, CoV) เป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในสัตว์หลายชนิด รวมทั้งในมนุษย์ หากได้รับการติดเชื้อไวรัสโคโรนาอาจก่อให้เกิดอาการในระบบทางเดินหายใจส่วนบนได้ถึงร้อยละ 35 [1]โดยมีอาการคล้ายกับการติดเชื้อไข้หวัดทั่วไป เช่น มีไข้ ไอ เจ็บคอ เป็นต้น หากเป็นผู้สูงอายุ เด็กทารก ผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่มีโรคเรื้อรังของปอดและโรคหัวใจ อาจก่อให้เกิดอาการในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้ ซึ่งได้แก่หลอดลมฝอยอักเสบ หรือปอดอักเสบ นอกจากนี้แล้ว เชื้ออาจก่อให้เกิดอาการกระเพาะอาหารอักเสบ และลำไส้อักเสบ หรืออาจจะมีอาการไตวายร่วมด้วย ในปี ค.ศ. 2012 ได้พบการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV) ในประเทศแถบตะวันออกกลาง โดยทั่วไปจะมีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจค่อนข้างรุนแรงและเฉียบพลัน [2] ทำให้พบอัตราการเสียชีวิตที่สูงกว่าร้อยละ 50 ของผู้ที่ติดเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยสูงอายุหรือผู้มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง [3] จากสาเหตุของการเสียชีวิตที่สูงจึงทำให้หลายหน่วยงานให้ความสนใจที่จะศึกษาถึงเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ กันอย่างกว้างขวาง เพื่อป้องกันการระบาดของไวรัสไปยังภูมิภาคอื่นๆ ทั่วโลก ปัจจุบันยังไม่มียาต้านไวรัสหรือวัคซีนสำหรับรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสำหรับผู้ป่วยเนื่องจากยังอยู่ในขั้นตอนของการพัฒนา [4]

เชื้อไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคน (Human coronavirus, HCoV) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยข้อมูลความแตกต่างทางด้านการทำปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antigenic cross reactivity) [5] ได้แก่ แอลฟา (α) โคโรนาไวรัส ประกอบไปด้วยกลุ่มย่อย (subgroup) HCoV-229E และ HCoV-NL63 ส่วนกลุ่มที่สองคือ บีตา (β) โคโรนาไวรัส ประกอบไปด้วยกลุ่มย่อย HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV และ MERS-CoV [6] จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่า HCoV - 229E, NL63, OC43 และ HKU1 สามารถพบการระบาดได้ในช่วงต้นของฤดูหนาวไปจนถึงฤดูใบไม้ผลิ และสามารถพบการติดเชื้อได้ทั่วโลก [7, 8] สำหรับ Severe acute respiratory syndrome (SARS) เกิดจากการติดเชื้อ SARS-CoV เป็นโรคอุบัติใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 ที่ประเทศจีน และได้มีการระบาดไปเกือบ 30 ประเทศทั่วโลก พบผู้ป่วยประมาณกว่า 8,000 คน มีผู้เสียชีวิตประมาณ 800 คน [9, 10] จนกระทั่งปลายปี ค.ศ. 2003 สามารถควบคุม SARS ได้ในที่สุด จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคนี้อีก สำหรับสถานการณ์ล่าสุดในปี ค.ศ. 2012 ได้พบโรคอุบัติใหม่ที่เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ ปัจจุบันรู้จักกันในชื่อ MERS-CoV สามารถแยกเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้ครั้งแรกได้ที่ห้องปฏิบัติการชื่อ Erasmus Medical Center ในประเทศเนเธอร์แลนด์ [3] อาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MERS-CoV จะรุนแรงกว่าการติดเชื้อด้วย HCoV สายพันธุ์อื่น เนื่องจากไวรัสสายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการรุนแรงเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจคล้ายกับ SARS [10] แต่

ต่างกันว่า MERS-CoV ทำให้เกิดไตวายเฉียบพลันร่วมด้วย แต่ลักษณะหรือรูปแบบทางระบาดวิทยาไม่เหมือนกับ SARS [11] เพราะมีการระบาดเพียงบางภูมิภาคเท่านั้นยังไม่พบการระบาดทั่วโลกแต่จะมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงเมื่อเทียบกับการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อื่นๆ สำหรับสถานการณ์การระบาดของ HCoV ในประเทศไทย พบว่ามีการศึกษาอยู่น้อย [12, 13] และพบการระบาดไม่มากนักเมื่อเทียบกับการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีการติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจ โดยจะพบการติดเชื้อได้สูงในผู้ป่วยกลุ่มเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี [13] อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสโคโรนาในประเทศไทยนั้นได้ศึกษาในช่วงระยะเวลาสั้นๆ และได้ทำการศึกษาไปแล้วในหลายปีที่ผ่านมา อีกทั้งยังมีข้อจำกัดด้านจำนวนของตัวอย่างที่ยังค่อนข้างน้อย

งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นไปศึกษาถึงระบาดวิทยาและการจัดจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อไวรัสโคโรนาที่พบในประเทศไทยในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 โดยใช้วิธี semi-nested PCR และ nucleotide sequencing บริเวณยีน RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) จากนั้นทำการจัดจำแนกทาง phylogenetic tree บริเวณยีน *spike* (*S* gene) โดยผลงานวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่งอาจทำให้ทราบถึงแนวโน้มและทิศทางการระบาด ทำให้สามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อและพยากรณ์ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นในแต่ละปีได้นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้นี้อาจจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาต้านไวรัสหรือการผลิตวัคซีนได้ในอนาคต

คำถามงานวิจัย

1. ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ human coronavirus ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 ในประเทศไทยเป็นอย่างไร และมีความแตกต่างจากข้อมูลในประเทศอื่นๆ หรือไม่ อย่างไร
2. สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนาชนิดที่พบในคน (HCoV) จากสารคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยไทยในช่วงปี 2012-2013 ที่ทำการศึกษามีสายพันธุ์อะไรบ้าง
3. มีการระบาดของเชื้อ MERS-CoV ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 หรือไม่ ในประเทศไทย

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจากตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายกับการติดเชื้อไข้หวัดในประเทศไทย
2. เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ
3. ศึกษาการระบาดเชิงโมเลกุลของเชื้อ MERS-CoV ในประเทศไทยและเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้อีกกับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศ

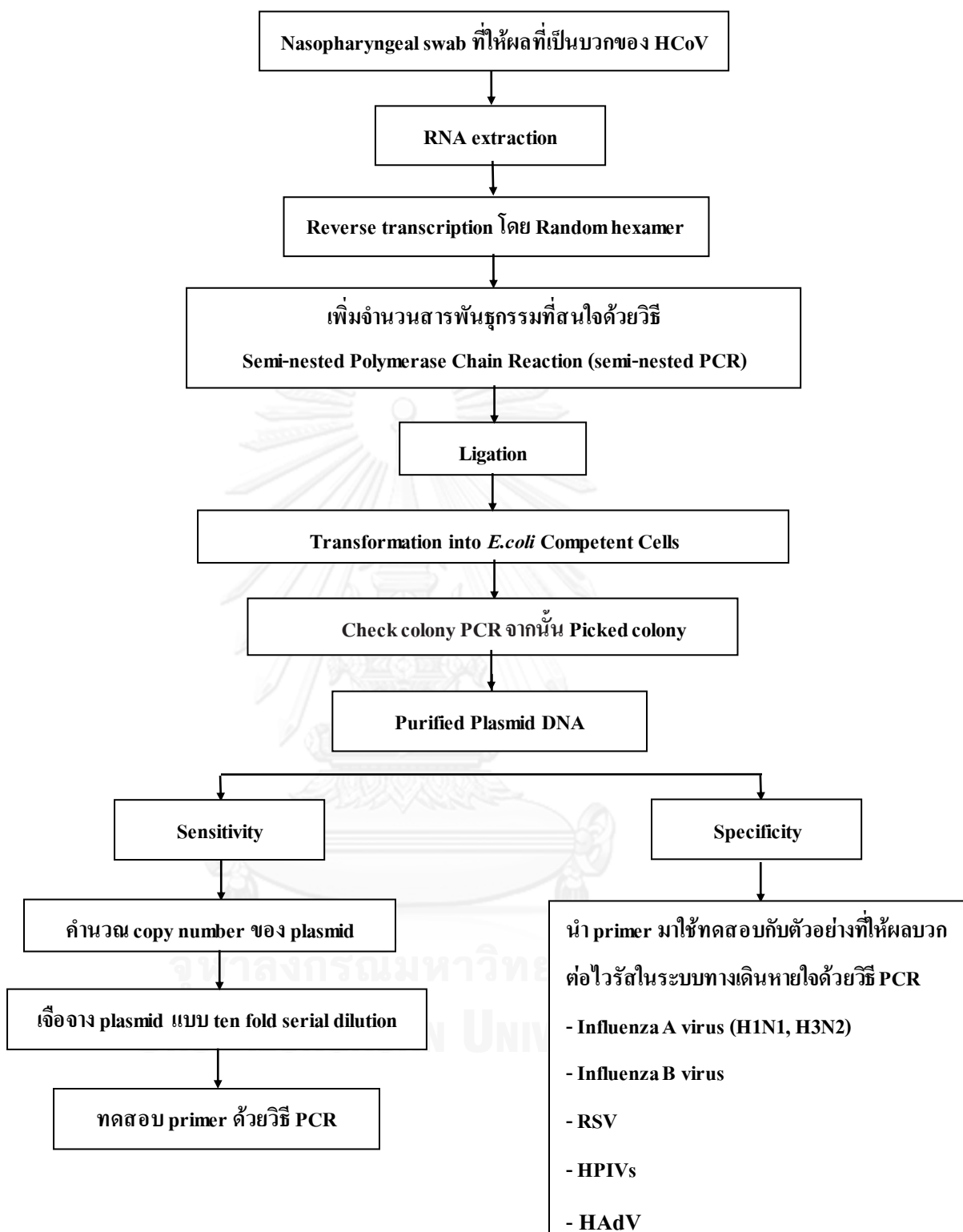
สมมติฐาน

1. เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *RdRp* แล้วพบว่ามีส่วนสายพันธุ์ของ HCoV ครบทั้ง 5 กลุ่มสายพันธุ์ คือ 229E, OC43, HKU1, NL63 และ MERS-CoV ในผู้ป่วยคนไทย
2. เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบการศึกษาครั้งนี้กับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศพบว่ารูปแบบของระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลมีความแตกต่างกัน

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

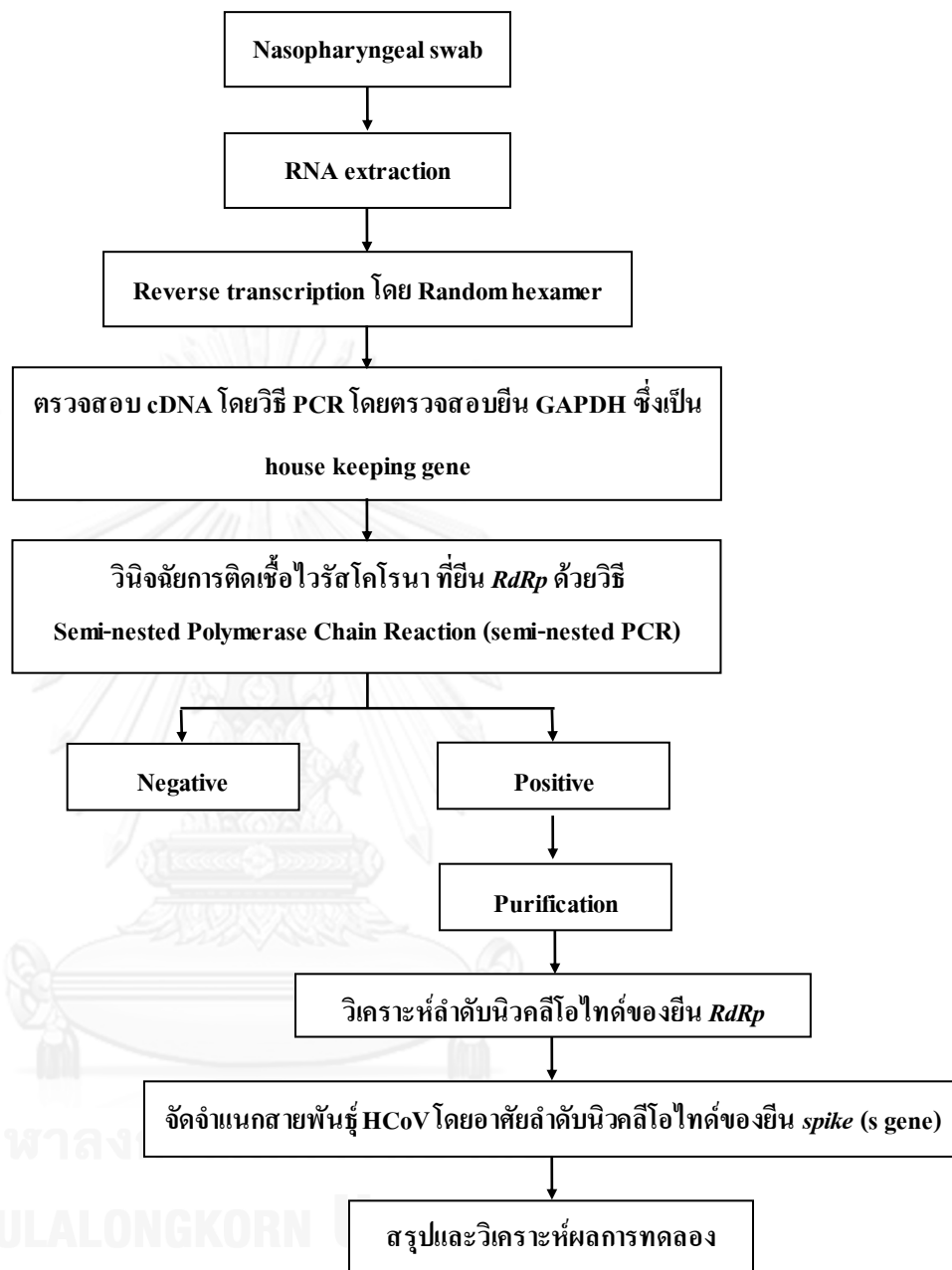
งานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือส่วนแรกจะเป็นการทดสอบความไวและความจำเพาะของไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการวิจัยว่ามีความเร็วและมีความจำเพาะในการตรวจวัดต่อ HCoV ส่วนที่สองคือ ทำการศึกษาระบาดวิทยาของ HCoV โดยใช้วิธีการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นการตรวจสอบโดยอาศัยวิธี semi-nested PCR จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้

- การเตรียม Positive control และการทดสอบ primer



แผนภาพที่ 1: กรอบความคิดของโครงการวิจัย
(เตรียม Positive Control และทดสอบ primer)

- ศึกษาการระบาดของเชื้อ HCoV ในประเทศไทย



แผนภาพที่ 2: กรอบความคิดของโครงการวิจัย
(ศึกษาการระบาดของเชื้อ HCoV ในประเทศไทย)

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. Genotype เป็นการจัดจำแนก HCoV ออกเป็นกลุ่มย่อยโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมบริเวณยีน *spike* (S gene) เปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล NCBI
2. Clade เป็นการแบ่งกลุ่มย่อยของ HCoV ออกมาจากแต่ละ genotype โดยอาศัยเกณฑ์การจำแนกจาก amino acid distance ตามกฎ RdRp-based grouping units (RGU)

ข้อจำกัดในการวิจัย

ตัวอย่างที่นำมาใช้ศึกษาเป็น nasopharyngeal aspiration และ nasopharyngeal swabs ที่มาจากผู้ป่วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องผ่านการพิจารณาจริยธรรมการทำวิจัยในคน อีกทั้ง nasopharyngeal aspiration เป็นการเก็บตัวอย่างที่ดีแต่เกิดความเจ็บปวดต่อผู้ป่วยมากกว่าจึงทำให้ผู้ป่วยบางรายไม่ยินยอมให้เก็บตัวอย่างในรูปแบบนี้ ส่งผลให้ตัวอย่างในรูปแบบ nasopharyngeal aspiration มีจำนวนน้อยกว่าตัวอย่างในรูปแบบ nasopharyngeal swabs

คำสำคัญ

Human Coronavirus (HCoV), MERS-CoV, 229E, NL63, OC43, HKU1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่พบในประเทศไทยและสามารถนำข้อมูลนี้มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันควบคุมโรค และเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสในอนาคตต่อไป
2. ฝึกกระบวนการคิด การวิเคราะห์ และสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการทดลอง
3. นำข้อมูลมาใช้ประกอบการอธิบายความสัมพันธ์ระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสกับปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการระบาด
4. มีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ ในวารสารที่เกี่ยวข้องกับไวรัส หรือระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ HCoV ที่เกิดขึ้นทั่วโลก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติความเป็นมา

ไวรัสโคโรนา (coronavirus) เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคได้ในคนและสัตว์หลายชนิด มีการค้นพบครั้งแรกโดย Beaudette และ Hudson ในปี ค.ศ. 1937 ซึ่งเป็นไวรัสที่แยกได้จากไก่ซึ่งขณะนั้นมีชื่อว่า Infectious bronchitis virus (IBV) ต่อมาในปี ค.ศ. 1949 Clever และคณะก็สามารถแยกไวรัสโคโรนาได้อีกชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า Murine hepatitis viruses (MHV) เป็นไวรัสที่แยกได้จากหนูที่ป่วยด้วยโรคตับอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อ [5] หลังจากนั้นก็ได้มีผู้ค้นพบไวรัสโคโรนาอีกหลายชนิดจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1960 Tyrrell และ Bynee ได้ค้นพบไวรัสโคโรนาที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในคน (human coronaviruses) เป็นครั้งแรก โดยสามารถแยกเชื้อได้จากเด็กนักเรียนที่ป่วยด้วยอาการไข้หวัด [6] ปัจจุบันไวรัสโคโรนาจัดอยู่ใน family *Coronaviridae*, genus *Coronaviruses* [14] สมาชิกใน genus นี้มีมากกว่า 10 ชนิดและมีการติดเชื้อได้ในคน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่างๆ รวมถึงสัตว์ปีกด้วย โดยไวรัสโคโรนาแต่ละชนิดมีความสามารถในการติดเชื้อในโฮสต์ (host) ที่จำเพาะต่อ receptor ของโฮสต์ (species specific receptor) [15] สัตว์แต่ละชนิดที่ติดเชื้อจะมีอาการที่หลากหลาย เช่น ไนวู ควาย จะทำให้มีอาการท้องเสีย ในแมวอาจทำให้เกิดเยื่อช่องท้องอักเสบ ส่งผลให้มื่ออัตราการตายที่สูง ในหนูจะทำให้เกิดตับอักเสบ หรือโรค Multiple sclerosis หรือย่อว่าโรค MS (โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง หรือโรคเอ็มเอส) [16] ได้ เป็นต้น

สำหรับเชื้อไวรัสโคโรนาที่ก่อให้เกิดโรคในคนหรือที่เรียกว่า human coronaviruses (HCoV) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตาม antigenic cross reactivity คือ แอลฟา (α) โคโรนาไวรัสและบีตา (β) โคโรนาไวรัส โดยกลุ่มแอลฟา (α) โคโรนาไวรัส ประกอบด้วยสายพันธุ์ HCoV-229E และ HCoV -NL63 ส่วนกลุ่มบีตา (β) โคโรนาไวรัส ประกอบด้วยสายพันธุ์ HCoV-OC43, HCoV-HKU1 และ SARS-CoV [6] นอกจากนี้ในช่วงเดือนกันยายนปี ค.ศ. 2012 ได้มีการค้นพบเชื้อไวรัสโคโรนาในผู้ป่วยที่ประเทศซาอุดีอาระเบียโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตัวใหม่ที่มีความคล้ายคลึงกับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของบีตา (β) โคโรนาไวรัส มีจีโนมอยู่ที่ประมาณ 30 Kb และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ BtCoV-HKU4 และ BtCoV-HKU5 ที่พบในค้างคาว [17] ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่นี้มีชื่อว่า Human coronavirus EMC (HCoV-EMC) เนื่องจากสถาบันที่สามารถแยกเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้ได้มีชื่อว่า Erasmus Medical Center ในประเทศเนเธอร์แลนด์ ต่อมาในช่วงเดือนพฤษภาคมปี ค.ศ. 2013 กลุ่มของ The Coronavirus Study Group (CSG) ได้เปลี่ยนชื่อของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus" (MERS-CoV) [3, 18] สำหรับสถานการณ์เกี่ยวกับการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์นี้ในปัจจุบัน (20 ก.พ. 2557) พบว่า มีผู้ป่วยทั้งสิ้นจำนวน 186 ราย และมีผู้เสียชีวิตจำนวน 81 ราย ซึ่งคิดเป็น 43.5 % [19] แต่สถานการณ์ที่น่าเป็นห่วงในขณะนี้คืออาจมีการติดต่อจากคนสู่คนได้เพราะพบข้อมูลของคนในบ้านที่

อยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยหรือแม้กระทั่งบุคลากรด้านการแพทย์ที่ดูแลผู้ป่วยก็มีรายงานการติดเชื้อแม้จะไม่มีประวัติการท่องเที่ยวในแถบตะวันออกกลาง จากเหตุผลดังกล่าวองค์การอนามัยโลกจึงให้ความสำคัญต่อการระบาดของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์นี้เป็นอย่างมาก โดยมีหลักฐานที่สามารถยืนยันได้แน่นอนแล้วว่าไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่เป็นเชื้อไวรัสที่เป็นต้นเหตุของโรคที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตของผู้คนเป็นจำนวนมาก [3] ในขณะที่เชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการค้นพบมาก่อน เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดและโรคคอจจาจร่วงที่ไม่รุนแรงนักยกเว้นใน SARS-CoV

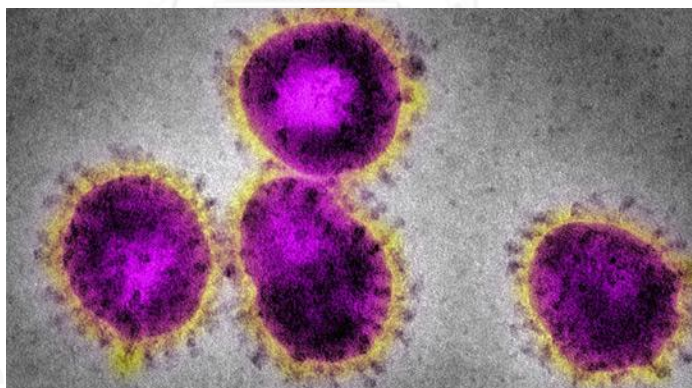
หากเรียงลำดับตามการค้นพบ HCoV พบว่า การคัดแยกเชื้อ HCoV ครั้งแรกนั้นสามารถคัดแยกได้ HCoV-229E ต่อมาจึงค้นพบ HCoV-OC43 [20] และในปี 2002 ก็ได้เกิดอุบัติการณ์ของโรคขึ้นมาใหม่เนื่องจากการค้นพบ HCoV ที่ทำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงส่งผลให้เกิดโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงโดยมีชื่อเรียกในขณะนั้นว่า SARS ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อ SARS-CoV ขณะนั้นมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อแล้วกว่า 20 ประเทศทั่วโลก จนกระทั่งในเดือนกรกฎาคม 2003 การระบาดก็ได้ยุติลง [21] รวมมีผู้ติดเชื้อทั้งสิ้นกว่า 8,000 คนและเสียชีวิตมากกว่า 800 คน ต่อมาในปี 2004 มีการค้นพบ HCoV สายพันธุ์ที่สี่ นั่นก็คือ HCoV-NL63 [22] จนกระทั่งในปี 2005 กลุ่มนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยฮอว์กิงส์ได้ค้นพบ HCoV สายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีอาการปอดบวม จึงตั้งชื่อ HCoV สายพันธุ์นี้ว่า HCoV-HKU1 [23] ล่าสุดในปี ค.ศ. 2012 ได้มีการค้นพบ HCoV สายพันธุ์ใหม่ที่ประเทศซาอุดีอาระเบีย ผู้ป่วยจะมีอาการคล้ายกับติดเชื้อ SARS-CoV แต่จะมีอาการที่รุนแรงกว่า เพราะจะมีอาการไตวายร่วมด้วยทำให้มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงมากกว่า แต่การแพร่กระจายของโรคนั้นยังไม่แพร่กระจายทั่วโลกเหมือนอย่างการระบาดของ SARS-CoV ในปี 2002-2003 โดยไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้มีชื่อว่า HCoV-EMC [24] แต่ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้เป็น MERS-CoV เพราะมีการระบาดของโรคในประเทศแถบตะวันออกกลาง

สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของไวรัสโคโรนา

ไวรัสโคโรนาถูกจัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Coronaviridae* สกุล (genus) *Coronaviruses* มีขนาดจีโนมประมาณ 27 - 32 kb ไวรัสโคโรนาเป็นไวรัสที่มีชั้นของไขมัน (envelope) หุ้มสารพันธุกรรมต่อจากนิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid) อีกชั้นหนึ่ง เรียกไวรัสที่มีลักษณะแบบนี้ว่า enveloped viruses อนุภาคไวรัสมีรูปร่างที่หลากหลาย (pleiomorphism) แต่ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นทรงกลม ลักษณะเด่นของไวรัสชนิดนี้ก็คือการที่เชื้อหุ้มมีลักษณะเป็น spike ยื่นออกไปรอบอนุภาคมองดูคล้ายมงกุฎหรือดวงอาทิตย์ทรงกลด (เป็นที่มาของชื่อ family และ genus โดย คำว่า corona เป็นภาษาละตินที่หมายถึง crown หรือ halo ที่แปลว่า มงกุฎ หรือ ดวงอาทิตย์ทรงกลด ตามลำดับ) ดังภาพที่ 1 [14, 25] บริเวณชั้นไขมันของไวรัสโคโรนาประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ 3 ชนิด คือ

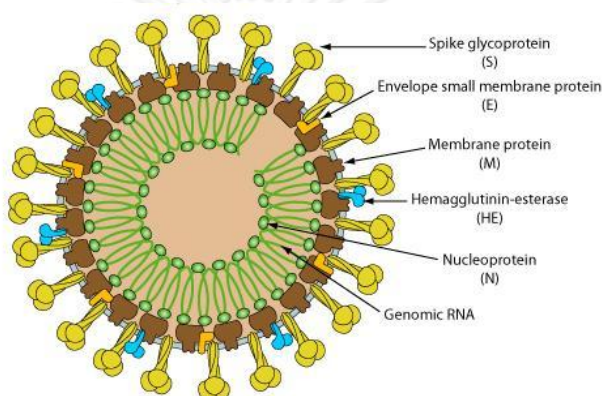
1. Membrane (M) glycoprotein เป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่ได้มาจาก golgi apparatus มีหน้าที่ดังนี้คือ

- ชักนำให้มีการประกอบตัว (assembly) เป็นอนุภาคไวรัส ภายหลังจากมีการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของอนุภาคไวรัสภายในเซลล์
- ทำหน้าที่ร่วมกับ Envelope protein ในการ budding ออกจากเซลล์
- ชักนำให้เซลล์ในร่างกายนสร้าง interferon-alpha ซึ่งเป็นสารโปรตีนที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสภายในเซลล์



ภาพที่ 1: แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสโคโรนาเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนภาพ [26]

2. Envelope (E) protein เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ดังนี้
 - ทำหน้าที่ร่วมกับ Membrane glycoprotein ในการ budding ออกจากเซลล์
3. Spike (S) glycoprotein เป็นไกลโคโปรตีนที่มีลักษณะการม้วนพับตัวเป็น spike ยื่นออกไปรอบนอกอนุภาคตามที่ได้กล่าวข้างต้น โดยมีหน้าที่ดังนี้คือ
 - เกาะติด (attachment) อย่างจำเพาะกับตัวรับ (receptor) บนผิวโฮสต์เซลล์
 - ชักนำให้เกิดการหลอมรวม (fusion) ระหว่างชั้นไขมัน (envelope) ของไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของโฮสต์เซลล์
 - ชักนำให้เซลล์ที่ติดเชื่อเกิดการหลอมตัวเข้าด้วยกัน (cell-cell fusion)
 - เป็นส่วนที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้าง neutralizing antibody



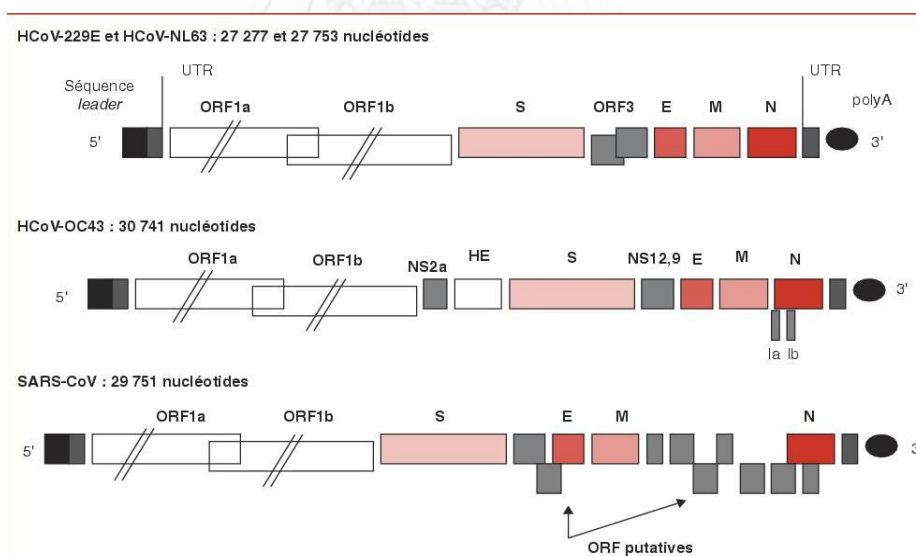
ภาพที่ 2: ลักษณะโครงสร้างของ Human coronavirus [27]

ส่วนโปรตีนอีกตัวที่มีความสำคัญคือ Hemagglutinin-esterase glycoprotein (HE protein) เป็นไกลโคโปรตีนที่มีเฉพาะในไวรัสโคโรนาบางชนิดเท่านั้น มีการสันนิษฐานว่าเป็นตัวช่วยในการ budding ของอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์ [6, 28] ส่วน nucleocapsid (N) protein เป็นโปรตีนที่เป็นแหล่งรวมสารพันธุกรรมของไวรัส โดยอยู่ถัดจากเยื่อหุ้มเข้ามา สาเหตุที่เรียกว่า nucleocapsid นั้นเนื่องจากประกอบด้วยจีโนมของไวรัสกับโปรตีน สำหรับโปรตีนในส่วนของ nucleocapsid มีชื่อว่า nucleocapsid (N) phosphoprotein ทำหน้าที่ช่วยให้จีโนมของไวรัสมีความเสถียรและมีส่วนช่วยในการประกอบเป็นอนุภาคไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นร่างกายให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ (cell-mediated immunity) ต่อไวรัส [29, 30] ดังภาพที่ 2

สารพันธุกรรมและองค์ประกอบของจีโนมไวรัสโคโรนา

จีโนมของไวรัสโคโรนา เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว และเป็นเส้นตรง (Single-stranded RNA) มีขนาดของจีโนมประมาณ 27–32 kb จัดเป็นจีโนมที่มีขนาดยาวที่สุดเมื่อเทียบกับไวรัสที่มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) นอกจากนี้ RNA ของไวรัสชนิดนี้เป็นจะเป็นชนิดสายบวก (positive sense) ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็น messenger RNA และแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ โดยประกอบด้วยส่วนที่เป็น untranslated region (UTR) อยู่ที่ปลาย 5' และ 3' เป็นบริเวณนอกส่วนการแปลรหัสโปรตีน (translation) ในส่วนที่เป็น open reading frame (ORF) ของไวรัสโคโรนาจะเป็นช่วงอนุรักษ์นิยม (conserved) จึงนิยมออกแบบไพรเมอร์ในช่วงยีนบริเวณนี้เพื่อให้สามารถตรวจสอบ HCoV ได้ทุกสายพันธุ์ ส่วนบริเวณยีน *spike* (S gene) จะเป็นช่วงที่มีความหลากหลายของ HCoV จึงใช้ยีนบริเวณนี้ในการจัดจำแนกความแตกต่างของ HCoV แต่ละสายพันธุ์ [20, 31, 32] ดังภาพที่ 3

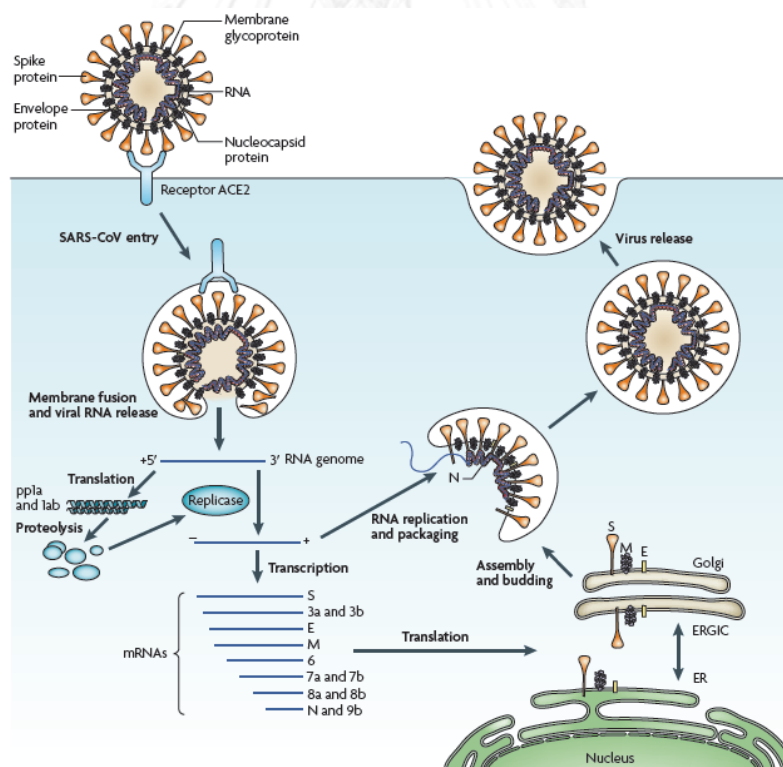
ปัจจุบันนี้ได้จัดจำแนก HCoV ออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มย่อยตามลักษณะทางแอนติเจน คือ กลุ่มที่ 1 แอลฟา (α) โคโรนาไวรัสและกลุ่มที่ 2 บีตา (β) โคโรนาไวรัส ซึ่ง human coronavirus NL63 และ 229E จัดอยู่ในกลุ่มแอลฟาโคโรนาไวรัส ส่วน HCoV OC43, HKU1, SARS และ MERS-CoV จัดอยู่ในกลุ่มบีตาโคโรนาไวรัส โดยลักษณะการเรียงตัวของโปรตีนต่างๆ จะแตกต่างกันไป โปรตีน HE จะพบในกลุ่มบีตา (β) โคโรนาไวรัสบางสายพันธุ์ ยกเว้นใน SARS-CoV และ MERS-CoV



ภาพที่ 3: ลักษณะการจัดเรียงตัวและขนาดของยีนบนจีโนมของ Human coronavirus [33]

การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสโคโรนา

เชื้อ HCoV เข้าสู่เซลล์เยื่อทางเดินหายใจส่วนบนโดยการเกาะติด (attachment) กับตัวรับจำเพาะ (receptor) [34] บนผิวเซลล์และเกิดการหลอมระหว่างชั้นไขมันของไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ (fusion) ทำให้ nucleocapsid ของไวรัสสามารถเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ ต่อมาจึงเกิดกระบวนการแยกสารพันธุกรรมของไวรัสออก (uncoat) จากส่วนของโปรตีน [35] เมื่อสารพันธุกรรมของไวรัสอยู่ภายในไซโตพลาสซึมจะมีการแปลรหัส (translation) เพื่อสร้างเป็น viral polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างสาย RNA สายลบหรือ (-) sense RNA สำหรับทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส และใช้สำหรับสร้างสาย messenger RNA ซึ่งจะมีการแปลรหัสเพื่อใช้สร้างโปรตีนจากนั้นจึงจะเกิดกระบวนการ post translational modification เพื่อให้ได้เป็นโปรตีนที่สมบูรณ์ก่อนที่ประกอบเป็นส่วนโปรตีนส่วนต่าง ๆ ของอนุภาคไวรัสต่อไป [36, 37] หลังการสร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของไวรัสครบแล้วจะมีการประกอบโปรตีนต่างๆ (assembly) เป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่และปล่อยออกจากเซลล์โดยการเกิด budding ต่อไป ดังภาพที่ 4 กระบวนการเจริญเพิ่มจำนวนของ coronaviruses จะค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) โดยใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนประมาณ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ใช้เวลาเพียง 6-8 ชั่วโมงเท่านั้น [38]



ภาพที่ 4: การเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ของเชื้อ HCoV [39]

สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนา

ไวรัสโคโรนาสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยหลักตามลักษณะของแอนติเจน กลุ่มแรกเป็นแอลฟา(α) โคโรนาไวรัส กลุ่มที่ 2 บีตา (β) โคโรนาไวรัส และกลุ่มที่ 3 เป็น แกมมา (γ) โคโรนาไวรัส เชื้อไวรัสโคโรนาสามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายระบบ เช่น ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ตับ เป็นต้น [40, 41] นอกจากนี้ไวรัสโคโรนายังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในสัตว์หลายชนิดและมีการติดเชื้อที่เซลล์เป้าหมายที่แตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด ทำให้สัตว์แต่ละชนิดที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนามีการแสดงอาการที่แตกต่างกันออกไป ดังตารางที่ 1 โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าไวรัสโคโรนาที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 บีตา (β) โคโรนาไวรัสจะทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงหากเกิดการติดเชื้อในมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็น SARS-CoV หรือ MERS-CoV ที่ได้มีการระบาดในช่วงปี ค.ศ. 2003 และปี ค.ศ. 2012 ที่ผ่านมามาตามลำดับ โดยพบว่าจะมีอาการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันรวมถึงอาจเกิดอาการติดเชื้อที่ระบบทางเดินอาหารและไตด้วยร่วมด้วย [37, 42]

ตารางที่ 1: การแบ่งกลุ่มไวรัสโคโรนาตามลักษณะของแอนติเจนและการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ
[1, 30, 43, 44]

Antigenic group	Virus	Host	Respiratory infection	Enteric infection	Hepatitis	Neurologic infection	Other*
α	Human coronavirus 229E	คน	X				
	Transmissible gastroenteritis virus, Porcine respiratory coronavirus	หมู	X	X			X
	Canine coronavirus	สุนัข		X			
	Feline enteric coronavirus	แมว		X			
	Feline infectious peritonitis virus	แมว	X	X	X	X	X
	Human coronavirus NL63	คน	X				
	Rabbit coronavirus	กระต่าย		X			X
β	Human coronavirus OC43	คน	X	?		?	
	Murine hepatitis virus	หนู	X	X	X	X	
	SARS coronavirus	คน	X				
	Sialodacryoadenitis	หนู					X
	Haemagglutinating encephalomyelitis virus	หมู	X	X		X	
	Human coronavirus HKU1	คน	X				
	Bovine coronavirus	วัว		X			
	MERS coronavirus	คน	X	X			
γ	Infectious bronchitis virus	ไก่	X		X		X

* คือ โรคอื่น ๆ ที่เกิดจาก Coronaviruses ประกอบด้วย ความผิดปกติทางระบบภูมิคุ้มกัน, peritonitis, runting, nephritis, pancreatitis, parotitis, myocarditis, sialodacryoadenitis.
[45]

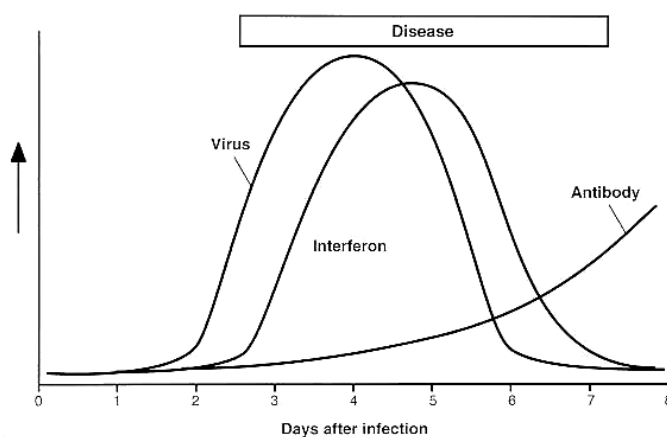
? = ยังไม่แน่ชัดว่ามีอาการติดเชื้อ [46]

พยาธิสภาพของการติดเชื้อไวรัสโคโรนา

พยาธิสภาพของการติดเชื้อไวรัสโคโรนานั้นจะมีความแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รูปแบบการเกิดโรคและความจำเพาะของตัวรับที่จำเพาะบนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น spike protein ของ MERS-CoV จะจำเพาะต่อตัวรับที่จำเพาะ DPP4 (DPP4 receptor) [47] ในเซลล์เยื่อ (epithelial cell) แม้ว่ากลไกการติดต่อกันของเชื้อ HCoV จะยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด แต่สันนิษฐานได้ว่า ส่วนใหญ่จะมีการติดต่อกันทางน้ำมูก น้ำลาย และเสมหะของผู้ป่วย โดยการไอหรือจามโดยตรง (droplet transmission) และ/หรือการสัมผัสกับวัตถุสิ่งของที่เป็นเชื้อจากน้ำมูก น้ำลายหรือเสมหะของผู้ป่วย (contact transmission) เช่น การใช้ของส่วนตัว ผ้าเช็ดตัว ผ้าเช็ดมือ แก้วน้ำ ช้อนส้อม ลูกบิดประตู ราวบันไดร่วมกัน เป็นต้น สำหรับการดำเนินโรคเมื่อเกิดการติดเชื้อ HCoV เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะใช้ระยะเวลาในการฟักตัวประมาณ 2-4 วัน ดังภาพที่ 5 หลังจากมีอาการของโรคแล้วสามารถพบเชื้อไวรัสปนออกมากับสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ ต่อมามีการสร้างอินเตอร์เฟอรอน (interferon) และแอนติบอดี (antibody) โดยเกิดตามมาหลังจากปริมาณไวรัสเริ่มลดลงซึ่งบางครั้งอาจนานถึง 14 วัน เชื้อไวรัสโคโรนา เมื่ออยู่ภายนอกเซลล์ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) จะค่อย ๆ ถูกทำลายไปในสิ่งแวดล้อม จากการศึกษพบว่าไวรัสสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีชั้นไขมันหุ้มจะอยู่ในสภาพแวดล้อมได้ไม่เกิน 3 ชั่วโมง และความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสส่วนใหญ่จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55-60°C ภายในเวลา 2-3 นาที ดังนั้นการทำให้สิ่งส่งตรวจที่เป็นซีรัม มีอุณหภูมิสูงถึง 56°C เป็นเวลา 30 นาที ถือว่าเพียงพอที่จะทำลายเชื้อไวรัสโดยไม่ทำให้คุณภาพของสิ่งส่งตรวจเสียไป แต่ถ้าให้ความร้อนสูงถึง 100°C หรือให้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูง (autoclave) ไวรัสทุกชนิดจะถูกทำลายหมด นอกจากความร้อนแล้วไวรัสยังสามารถถูกทำลายด้วยแสงแดดและรังสีต่าง ๆ ตลอดจนน้ำยาฆ่าเชื้อต่าง ๆ (disinfectants)[48]

ในกรณีของเชื้อ SARS-CoV จากการศึกษาพบว่า SARS-CoV ที่อยู่ในอุจจาระหรือปัสสาวะ จะมีความคงทนอยู่ประมาณ 1-2 วัน ที่อุณหภูมิห้องและอาจนานถึง 4 วันในอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วง นอกจากนี้ น้ำยาฆ่าเชื้อต่าง ๆ (disinfectants) ที่มีใช้ในโรงพยาบาลยังสามารถใช้ทำลายเชื้อ SARS-CoV ได้ [23] สำหรับ MERS-CoV สามารถติดต่อได้โดยการหายใจเอาเชื้อไวรัสที่กระจายอยู่ในละอองเสมหะ น้ำมูก น้ำลายของผู้ป่วย (Airborne transmission) หรือการสัมผัสกับสิ่ง/สารคัดหลั่งเหล่านี้แล้วนำมาสัมผัสกับเยื่อ จมูก ตา หรือปาก ซึ่งเรียกว่าเป็น Droplets transmission หรือการอยู่อาศัยและสัมผัสใกล้ชิด (Close person-to-person contact) ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้ติดโรคได้ เช่น การกอด การจูบ การสัมผัสเนื้อตัว การทักทายโดยการจับมือ การกินอาหารโดยใช้ภาชนะร่วมกัน การดื่มน้ำจากแก้วเดียวกัน เป็นต้น นอกจากนี้ สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสจากอุจจาระในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการถ่ายอุจจาระเหลวได้ ดังนั้นการติดต่ออาจเกิดจากการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนอุจจาระของผู้ป่วยได้เช่นกัน ในกรณีการติดเชื้อของ MERS-CoV เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะใช้ระยะเวลาในการฟักตัวประมาณ 10-14 วัน [49] ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดว่า MERS-CoV เป็นโรคที่คนติดมาจากสัตว์ (Zoonosis) แต่สันนิษฐานว่า MERS-CoV น่าจะแพร่กระจายอยู่ในร่างกายมนุษย์มากกว่า 1 ปี โดยไม่สามารถตรวจพบได้และไม่ทราบว่าจะติดโรคมาร

จากแหล่งใด ถึงแม้ว่ามีการตรวจพบเชื้อไวรัสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อ MERS-CoV ในค้างคาว [17] แต่ยังไม่มียหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มากพอในการที่จะชี้ชัดถึงความเชื่อมโยงระหว่างเชื้อ MERS-CoV กับค้างคาวหรือสัตว์ชนิดอื่น เช่นเดียวกัน แม้จะมีการพบเชื้อไวรัสโคโรนาหรือไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกันมากกับไวรัสโคโรนาอยู่ในตัวอูฐ ก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบว่าไวรัสที่พบนี้เป็นไวรัสสายพันธุ์เดียวกันกับที่พบในมนุษย์หรือไม่ มีการตีพิมพ์ผลการตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ MERS-CoV หรือเชื้อไวรัสที่คล้ายกันในเลือดอูฐหลายตัวอย่าง [50, 51] เลือดอูฐที่ตรวจพบในการศึกษาดังกล่าวมาจากการเก็บตัวอย่างในประเทศโอมาน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ MERS-CoV การค้นพบจากการศึกษานี้บ่งบอกได้ว่าเชื้อ MERS-CoV หรือเชื้อไวรัสโคโรนาที่มีความใกล้เคียงกันกับเชื้อ MERS-CoV ที่พบในมนุษย์นั้นมีการแพร่กระจายอยู่ในฝูงของอูฐ แต่การที่จะยืนยันได้ว่าเชื้อ MERS-CoV ที่ตรวจพบในอูฐเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคนนั้น ต้องมีการยืนยันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อไวรัสและเปรียบเทียบลักษณะพันธุกรรมของเชื้อที่พบในคนและสัตว์ จนถึงขณะนี้เชื้อ MERS-CoV สามารถพบและแยกเชื้อได้เฉพาะที่พบในคนเท่านั้น การศึกษาตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ MERS-CoV ในอูฐที่พบในประเทศโอมานนั้นเป็นหลักฐานการบ่งชี้ถึงขอบเขตการแพร่กระจายของเชื้อ MERS-CoV ซึ่งเป็นปัจจัยทางสถานที่มากกว่าที่จะบ่งบอกว่าสัตว์ใดเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) ของเชื้อ MERS-CoV [52]



ภาพที่ 5: การดำเนินของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ HCoV [53]

จากการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อ HCoV ในประเทศไทยที่ผ่านมาพบว่าการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา ในคนจะเกิดในช่วงฤดูหนาวและช่วงต้นของฤดูใบไม้ผลิเป็นเวลาหลายเดือน รูปแบบการติดเชื้อส่วนใหญ่ในแต่ละช่วงของการระบาดจะสลับกันไปทุกๆ 2-3 ปีจากกลุ่มไวรัส 229E และ OC43 สำหรับในปีที่พบอัตราการติดเชื้อสูงนั้นพบว่ามีสาเหตุมาจากการระบาดของทั้งกลุ่ม 229E และ OC43 มีเพียงบางโอกาสเท่านั้นที่พบการระบาด โดยมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อื่นๆ [8] สำหรับโรคหวัดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อจากไวรัสโคโรนานั้นพบประมาณ 10-30 % ของผู้ป่วยที่เป็นไข้หวัด โดยสามารถพบเชื้อได้ในทุกกลุ่มอายุและอัตราการติดเชื้อในทุกกลุ่มอายุมีจำนวนใกล้เคียงกัน ซึ่งแตกต่างจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอันเนื่องมาจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น

RSV ที่พบการติดเชื้อมากในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อย และพบการติดเชื้อน้อยลงในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากขึ้น อาการของผู้ป่วยในช่วง 2-4 วันแรกอาจไม่ปรากฏหรือน้อยมาก และมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบอาการติดเชื้ออย่างรุนแรงในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างทั้งในเด็กเล็กและผู้สูงอายุ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างของพยาธิสภาพจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ต่างๆ สำหรับการติดเชื้อซ้ำอาจเกิดขึ้นได้ภายใน 4 เดือน ภายหลังจากติดเชื้อครั้งแรก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อครั้งแรกสามารถป้องกันการติดเชื้อได้เพียง 4 เดือนเท่านั้น แม้ว่าประชากรบางรายที่มีภูมิคุ้มกันสูง ภายหลังจากการติดเชื้อครั้งแรกแต่การติดเชื้อซ้ำจากสายพันธุ์เดิมหรือสายพันธุ์อื่นสามารถเกิดขึ้นได้ เป็นปกติ นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสโคโรนาแต่ละกลุ่มไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อจากกลุ่มอื่นได้ [30]

ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนา

ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาจะทำให้เกิดอาการของระบบทางเดินหายใจส่วนบน (ยกเว้นไวรัสที่ทำให้เกิด SARS และ MERS-CoV) ซึ่งส่วนใหญ่คืออาการของโรคหวัดทั่วไป โดยเฉลี่ยแล้ว ผู้ป่วยเป็นโรคหวัดมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสโคโรนาประมาณ 10-30 % ในผู้ป่วยบางรายเชื้ออาจทำให้เกิดอาการของกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบได้ หากเป็นผู้สูงอายุ เด็กทารก ผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่มีโรคเรื้อรังของปอดและโรคหัวใจ[54] เชื้อไวรัสอาจทำให้เกิดอาการของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้ ได้แก่ หลอดลมฝอยอักเสบ หรือปอดอักเสบ นอกจากนี้เชื้ออาจทำให้เกิดกระเพาะอาหารอักเสบ และลำไส้อักเสบร่วมด้วย [1] สำหรับเชื้อไวรัสโคโรนาที่ทำให้เกิด SARS นั้น จะทำให้เกิดอาการของปอดอักเสบที่รุนแรง มีโอกาสเกิดภาวะหายใจล้มเหลวได้มาก ส่วนผู้ที่ติดเชื้อ MERS-CoV นั้นมีอาการของปอดอักเสบเช่นกัน [24] และมีความรุนแรงเทียบเท่ากับผู้ป่วยที่เป็น SARS นอกจากนี้ยังมีอาการไตวายร่วมด้วย แต่เนื่องจากไม่มีการระบาดของโรคเป็นวงกว้างแบบ SARS แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้ มีการติดต่อกันยากกว่า SARS แต่มีอัตราการเสียชีวิตที่สูงกว่า

เมื่อเชื้อ HCoV เข้าสู่ร่างกายจะใช้ระยะเวลาในการฟักตัวของโรคประมาณ 2-4 วัน เมื่อมีอาการของโรคจะมีเชื้อไวรัสปะปนออกมากับสารคัดหลั่งของระบบทางเดินหายใจ การสร้างอินเตอร์เฟอรอน interferon จะเกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อไวรัส ส่วนแอนติบอดี (antibody) จะเกิดตามมาหลังจากปริมาณไวรัสเริ่มลดลง [55] บางครั้งอาจนานถึง 14 วัน อาการแสดงของโรคเริ่มจากการมีไข้ หนาวสั่น ปวดหัว ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ไม่มีอาการจาม หรือน้ำมูกไหล ในบางรายอาจมีอาการท้องเสียถ่ายเป็นน้ำร่วมด้วย [56] หลังจากนั้น 2-7 วัน จะมีอาการไอแห้ง ๆ และอาการปอดบวมตามมา ประมาณ 10-20% ของผู้ป่วยจะมีอาการของโรครุนแรงและบางรายอาจถึงแก่ชีวิตได้ โดยอัตราการตายอยู่ในช่วง 14-15% ของผู้ป่วยทั้งหมด ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 24 ปีจะมีอัตราการตายน้อยกว่า 1% ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 65 ปีอัตราการตายจะมากกว่า 50 % อย่างไรก็ตามสาเหตุของปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้อาการของโรคที่เกิดในเด็กจะรุนแรงน้อยกว่าผู้ใหญ่ ตลอดจนปริมาณเชื้อไวรัสและความสามารถในการติดเชื้อ (degree of infectivity) ในเด็กจะต่ำกว่าในผู้ใหญ่ แต่ถ้าหากเกิดการติดเชื้อในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี อาจทำให้

ความรุนแรงของอาการติดเชื้อนั้นมากขึ้นด้วยเนื่องจากเด็กในวัยนี้มีภูมิคุ้มกันที่ต่ำ สำหรับในผู้ใหญ่พบว่าปริมาณไวรัสในช่วงแรกจะยังต่ำอยู่และจะขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่สองของการป่วย นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไวรัสจะแปรผันตามความรุนแรงของอาการ [15, 57] ส่วนอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MERS-CoV พบว่าอาการของผู้ป่วยเริ่มตั้งแต่ ไม่มีอาการ มีอาการเพียงเล็กน้อย จนถึงอาการรุนแรง สำหรับผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ หรือ มีอาการเพียงเล็กน้อย (Asymptomatic or mild case) พบได้ร้อยละ 13.5 ผู้ป่วยมักมาด้วยอาการไข้สูงมากกว่า 38 °C มีอาการไอ หอบและหายใจเร็วมากกว่า 28 ครั้งต่อนาที Oxygen saturation น้อยกว่าร้อยละ 90 ในรายที่อาการรุนแรง พบว่าผู้ป่วยจะมีอาการทรุดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 สัปดาห์ ผู้ป่วยอาจมีลักษณะของกลุ่มอาการระบบทางเดินหายใจล้มเหลวเฉียบพลันอย่างรุนแรง (Severe Acute Respiratory Distress Syndrome) ตามความรุนแรงของภาวะขาดออกซิเจน จากข้อมูลการวิเคราะห์อาการของผู้ป่วยโดย Centers for Diseases Control and Prevention ประเทศสหรัฐอเมริกา ในผู้ป่วย 47 ราย พบอาการไข้ร้อยละ 98 ร่วมกับอาการไอ หอบ ร้อยละ 72 นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยที่มีอาการของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งพบได้ร้อยละ 26 โดยอาการส่วนใหญ่ที่ปรากฏได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นต้น สำหรับลักษณะอาการที่สำคัญคือในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำจะมีอาการไตวายร่วมด้วย [35, 58] จึงทำให้เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สูง จากการศึกษาในอาสาสมัครและผู้ติดเชื้อ HCoV ตามธรรมชาติ สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อได้ทั้งในซีรัมและสารคัดหลั่งจากจมูก (nasal secretion) แอนติบอดีที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อ S glycoprotein และมีคุณสมบัติเป็นแอนติบอดีที่มีความสามารถในการกลางฤทธิ์ (neutralizing antibodies) สามารถทำลายการติดเชื้อได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะลดลงตามระยะเวลา รวมถึงไวรัสชนิดนี้มีความหลากหลายของสายพันธุ์พอสมควรจึงเป็นเหตุให้สามารถพบการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) ได้เสมอ [48]

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของเชื้อไวรัสโคโรนา

ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจมีมากมายหลายชนิด อาการแสดงที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกันอาจมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสต่างชนิดกันก็ได้ ดังนั้นการที่จะทราบได้ว่าอาการติดเชื้อเหล่านั้นเกิดจากการติดเชื้อ HCoV หรือไม่ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบยืนยัน ซึ่งมีอยู่หลายวิธีดังนี้ [3, 20, 31]

1. การตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง (Viral detection) สิ่งส่งตรวจที่ใช้ได้แก่ nasopharyngeal swab หรือ aspirate, tracheobronchial aspirate หรือ broncheoalveolar lavage อาจจะเป็น tracheal aspiration จากท่อช่วยหายใจซึ่งจะเก็บลงในน้ำยาเก็บตัวอย่าง (viral transport media, VTM) สิ่งส่งตรวจที่ได้มานำมาทำการปั่นเพื่อเอาเซลล์ที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจมาป้ายลงบนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วยแอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะเพื่อตรวจหาแอนติเจน (antigen) ของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค immunofluorescence assay (IFA) วิธีนี้จัดเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็ว

2. **การเพาะเลี้ยงและพิสูจน์เชื้อ (Viral isolation)** สิ่งส่งตรวจสามารถนำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม HCoV ที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจค่อนข้างจะเพาะเลี้ยงลำบากโดยเฉพะ สายพันธุ์ OC43 ต้องทำการเพาะเลี้ยงใน organ culture จาก human embryonic trachea ซึ่งจะให้ความไวในการเพาะเลี้ยงมากที่สุด แต่การเตรียม culture ดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยาก เช่น ในกรณีของ SARS ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการของศูนย์ควบคุมโรคของสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นหนึ่งของเครือข่ายห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลกใช้ Vero และ FRhk-4 cell lines ในการเพาะเลี้ยงหาเชื้อสาเหตุ เชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงได้จะนำไปทำการพิสูจน์ด้วยวิธีการอื่น ๆ ต่อไป เช่น การดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นต้น
3. **การใช้เทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)** สิ่งส่งตรวจสามารถนำมาสกัดแยก RNA เพื่อเปลี่ยนสารพันธุกรรมจาก RNA เป็น cDNA โดยใช้วิธี reverse transcription จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction PCR) วิธีการนี้มีความสะดวกปลอดภัยกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนให้ผลเร็วกว่า และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่ามาก
4. **การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (Serology)** การตรวจหาหรือการตรวจเปรียบเทียบระดับ (titer) ของแอนติบอดีจำเพาะในซีรัมของผู้ป่วยในช่วง acute และ convalescent ด้วยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยาแบบต่างๆ เช่น Immunofluorescence, ELISA, Western blot และ neutralization test ปัญหาสำคัญของการใช้การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาสำหรับ SARS ก็คือ อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อ HCoV โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่าง SARS-CoV กับ HCoV-229E อย่างไรก็ตามการตรวจทางด้านน้ำเหลืองวิทยาจัดเป็นวิธีการที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยเป็นอย่างมาก

ดังนั้นในด้านการตรวจสอบ การเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ MERS-CoV จึงต้องอาศัยความร่วมมือของเจ้าหน้าที่ด้านการแพทย์และสาธารณสุข เพื่อตรวจสอบผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ MERS-CoV นี้ จะช่วยให้สามารถตรวจพบการเข้ามาของเชื้อ MERS-CoV ได้อย่างทันทั่วถึงและจำกัดวงการแพร่ระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุบัติการณ์ของโรค

เชื้อไวรัสโคโรนาที่ก่อโรคในคนสามารถก่อให้เกิดโรคได้ในทุกกลุ่มอายุ แต่กลุ่มอายุที่มีการติดเชื้อ HCoV มากที่สุดได้แก่เด็กที่มีช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 5 ปี และในผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 65 ปี มีอัตราเสี่ยงสูงที่จะติดเชื้อและมีอาการของโรคที่รุนแรง [59] แต่โดยส่วนมากแล้วการติดเชื้อ HCoV อาการของโรคจะสามารถหายได้เองหากสายพันธุ์ที่ติดเชื้อไม่รุนแรงหรือมีอาการแสดงเพียงเล็กน้อย ส่วนการระบาดของเชื้อ HCoV นั้นสามารถตรวจพบเชื้อได้ตลอดทั้งปี แต่พบว่ามีความชุกมากในช่วงฤดูหนาวถึงต้นฤดูใบไม้ผลิ [60] สำหรับความชุกของเชื้อ HCoV ที่เกิดขึ้นในประเทศต่างๆ นั้นได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2: ความชุกของเชื้อ HCoV ในประเทศต่างๆ

ประเทศ	Genotype ที่ศึกษา	วิธีทดสอบ	ความชุก (%)	ปีที่ทดสอบ (ค.ศ.)	เอกสารอ้างอิง
ฮ่องกง	HCoV-HKU1 HCoV-OC43 HCoV-229E HCoV-NL63	RT-PCR	0.3 1.3 0.1 0.4	2004-2005	[61]
สหรัฐอเมริกา	HCoV-HKU1 HCoV-OC43 HCoV-229E HCoV-NL63	RT-PCR	0.1 2.0 0.6 2.2	2004-2005	[7]
จีน	HCoV-HKU1 HCoV-OC43 HCoV-229E HCoV-NL63	RT-PCR	0.2 0.6 0.2 0.1	2005-2009	[62]
ฮ่องกง	HCoV-HKU1	Real-Time PCR	2.5	2007-2008	[63]
ญี่ปุ่น	HCoV-OC43 HCoV-NL63	RT-PCR	2.0 1.4	2010-2011	[64]
อังกฤษ	HCoV-HKU1 HCoV-OC43 HCoV-229E HCoV-NL63	Multiplex Real-Time PCR	0.5 0.8 0.3 0.6	2006-2009	[8]
ไทย	HCoV-HKU1 HCoV-OC43 HCoV-229E HCoV-NL63	RT-PCR	1.2 4.6 1.0 1.1	2003-2005	[12]

การรักษาและป้องกัน

การดูแลตนเองและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา [25]

1. การป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา ใช้หลักการเดียวกันกับการป้องกันการติดเชื้อโรคต่างๆ ที่มากับระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ หลีกเลี่ยงการเข้าไปอยู่ในที่แออัด ผู้คนหนาแน่น อากาศถ่ายเทไม่สะดวก หากจำเป็นต้องเข้าไป ควรสวมหน้ากากอนามัย ป้องกันตนเองจากการสัมผัสกับละอองน้ำมูก น้ำลาย จากผู้อื่น ล้างมือบ่อยๆ ด้วยสบู่หรือน้ำยาล้างมือโดยเฉพาะ ก่อนรับประทานอาหาร หรือก่อนปรุงอาหาร รักษาสุขภาพให้แข็งแรงโดยการออกกำลังกายสม่ำเสมอ กินอาหารที่มีประโยชน์ 5 หมู่ให้ครบถ้วน พักผ่อนให้เพียงพอ เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมา คือ การรักษาสุขภาพอนามัยพื้นฐาน (สุขบัญญัติแห่งชาติ)
2. ผู้ป่วยที่อาการไม่รุนแรงและไม่ได้เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลควรพักอยู่กับบ้านและป้องกันการแพร่เชื้อสู่คนใกล้ชิด โดยการใช้น้ำปิดปากปิดจมูก (หน้ากากอนามัย) ใช้ช้อนกลางกินอาหาร แยกของใช้ส่วนตัว และควรแยกห้องนอน จนกระทั่งอาการหายสนิท
3. สำหรับโรคติดเชื้อ MERS-CoV คาดว่าการแพร่กระจายของเชื้อเกิดขึ้นได้ยากมาก ทั้งนี้ เนื่องจากมีการพบผู้ป่วยเพียงแค่ประเทศในแถบตะวันออกกลางเท่านั้น แต่บุคลากรทางการแพทย์ที่ต้องดูแลรักษาผู้ป่วยต้องมีการป้องกันและดูแลรักษาตัวเองให้ดี เนื่องจากมีรายงานการติดเชื้อของบุคลากรทางการแพทย์ที่ดูแลผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MERS-CoV แล้ว
4. ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสโคโรนา

แนวทางการรักษาหากเกิดการติดเชื้อไวรัสโคโรนา [1]

ปัจจุบันยังไม่มียาสำหรับรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาโดยเฉพาะ ดังนั้นการรักษาจึงทำได้เพียงแค่ประคับประคองตามอาการ และการรับตัวไว้รักษาในโรงพยาบาลขึ้นอยู่กับความรุนแรงของอาการ และสภาพร่างกายของผู้ป่วย การรักษาประคับประคองตามอาการ ได้แก่ การให้ยาลดไข้ ยาแก้ปวด ยาแก้ไอ ยาบรรเทาอาการเจ็บคอ ยาลดน้ำมูก การให้ออกซิเจนในผู้ป่วยที่หอบเหนื่อย และการใส่เครื่องช่วยหายใจในผู้ที่เกิดภาวะหายใจล้มเหลว เป็นต้น นอกจากนี้ผู้ป่วยควรดื่มน้ำให้มาก หากร่างกายผู้ป่วยมีภาวะขาดน้ำ แพทย์จะให้สารน้ำและเกลือแร่ทางหลอดเลือด สำหรับในกรณีของผู้ป่วย SARS หรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MERS-CoV ไม่ว่าจะมียาอาการรุนแรงมากน้อยอย่างไร ผู้ป่วยจะต้องถูกแยกตัวออกจากบุคคลอื่นเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อและทำการรักษาตามอาการของโรค ในส่วนของยาด้านไวรัสสำหรับ MERS-CoV นั้นปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลในส่วนนี้ เนื่องจาก MERS-CoV เป็นเชื้อที่เพิ่งอุบัติขึ้นมาใหม่ ยังไม่มีรายงานการใช้ยาเฉพาะในการรักษาที่ชัดเจน

การเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) [65]

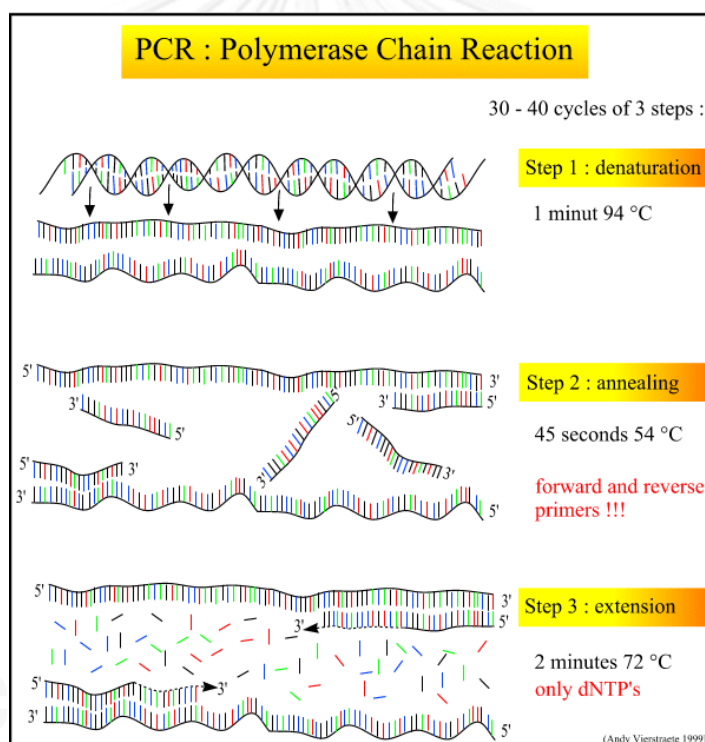
Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือมีอีกชื่อเรียกว่า *In vitro* enzymatic gene amplification ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี 1986 เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอให้ยาวขึ้น โดยจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, oligonucleotide primers, บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรถูกโซ่ โดยในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 6) คือ

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกเกลียวคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C

2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนเพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมโดยการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-60 °C

3. ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5'ไป 3' อุณหภูมิในขั้นนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น หากใช้ *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 70-75 °C

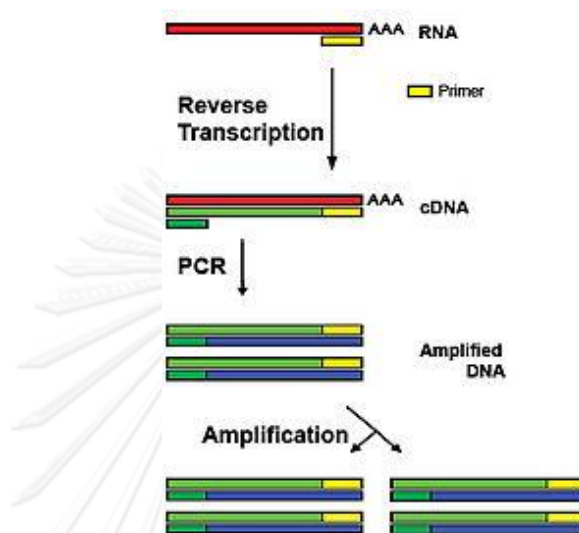
การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 30-40 รอบ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 6: ขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR [66]

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR หรือ RNA-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ RNA ที่ประกอบด้วยสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA, cDNA) จากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7: ขั้นตอนการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยวิธี RT-PCR [67]

รูปแบบการทำ RT-PCR

ในการทำ RT-PCR สามารถทำได้ 2 รูปแบบ คือ

1. แบบสองขั้นตอน (Two-step RT-PCR) ในขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนทำ reverse transcription เพื่อสังเคราะห์สาย cDNA ในขั้นตอนที่สอง cDNA ที่ได้จากหลอดทดลองในปฏิกิริยาแรกที่ทำ reverse transcription จะถูกนำมาใช้ในการทำ PCR ต่อในหลอดทดลองที่สอง
2. แบบขั้นตอนเดียว (One-step RT-PCR) RT-PCR แบบนี้ทั้งปฏิกิริยา reverse transcription และ PCR จะเกิดต่อเนื่องภายในหลอดทดลองเดียวกัน primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription จะต้องใช้ gene-specific primers เท่านั้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (Descriptive Cross-sectional study) โดยการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Ethics Committee of the hospital and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) หมายเลข IRB 388/56

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็น nasopharyngeal aspirate, (NPA) ,nasopharyngeal swab, (NPS) และ nasal swab จากผู้ป่วยซึ่งป่วยด้วยโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ โดยตัวอย่างทั้งหมดถูกส่งมาตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับทางเดินหายใจซึ่งมาจากสถานที่ต่างๆ คือ

- ผู้ป่วยแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลสิรินธร และโรงพยาบาลชลบุรี ซึ่งอยู่ในรูปแบบของตัวอย่าง nasopharyngeal aspirate จำนวน 637 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคมปี ค.ศ. 2012 ถึงเดือนธันวาคมปี ค.ศ. 2013 แบ่งได้เป็น

ตัวอย่างจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลสิรินธร จำนวน 505 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากโรงพยาบาลชลบุรี จำนวน 132 ตัวอย่าง

- โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลในเครือข่ายปะกอกซึ่งอยู่ในรูปแบบของตัวอย่าง nasal swab ที่มีการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคมปี ค.ศ. 2012 ถึงเดือนธันวาคมปี ค.ศ. 2013 จำนวน 4,621 ตัวอย่างโดยเป็นตัวอย่างที่เหลือเก็บจากงานตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (Influenza pH1N1) ซึ่งเป็นงานบริการตรวจประจำวันของทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แบ่งได้เป็น

ตัวอย่างจากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 1,833 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในเครือข่ายปะกอก จำนวน 2,788 ตัวอย่าง

- โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ซึ่งอยู่ในรูปแบบของตัวอย่าง nasopharyngeal swab ที่มีการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนธันวาคมปี ค.ศ. 2013 จำนวน 575 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้รวมทั้งสิ้น 5,833 ตัวอย่าง ถูกเก็บในรูปแบบนิรนาม เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายและเพื่อปกป้องสิทธิของผู้ป่วย

ขนาดของประชากรตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างคำนวณจากสมการ Cochran's samples size formula

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

โดยที่ n คือ จำนวนตัวอย่าง

Z คือ ค่า alpha ที่ระดับความเชื่อถือที่ 95 เปอร์เซนต์ ดังนั้นเท่ากับ 1.96

p คือ อัตราความชุกของ HCoV ในการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.40 [12]

q คือ 1-p

d คือ ค่าความผิดพลาด เท่ากับ 0.05×0.40

เมื่อแทนค่าต่างๆ ในสมการแล้วจะได้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 2,305 ตัวอย่างซึ่งเป็นจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่จะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการศึกษานี้ จึงจะประมาณค่าร้อยละโดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 5 อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งสิ้นรวม 5,833 ตัวอย่าง และจะทำการศึกษาจากตัวอย่างทั้งหมด

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย
 - 1.1 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
 - 1.2 Cuvett: 5 μ l, 10 μ l (MiralBio, Japan)
 - 1.3 Cylinder: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
 - 1.4 Flask: 250 ml (Pyrex, USA)
 - 1.5 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml (Axygen, USA)
 - 1.6 Parafilm (American Nation Can, USA)
 - 1.7 Pipette tip: 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Axygen, USA)
 - 1.8 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
 - 1.9 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, USA)
 - 1.10 Stirring-magnetic bar

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
- 2.2 Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P100 (20-100 μ l) และ P1000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- 2.3 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- 2.5 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 2.6 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- 2.7 Freezer -20 °C (Sanyo, Japan)
- 2.8 Freezer -70 °C (Forma Scientific, USA)
- 2.9 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.10 Incubator (Mettmert, Germany)
- 2.12 Microcentrifuge 0.2 ml (Sprout, USA)
- 2.13 Microcentrifuge 1.5 ml (Eppendorf, Germany)
- 2.14 Microwave oven (Sanyo, Japan)
- 2.15 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.16 PCR Mastercycle personal (Eppendorf, Germany)
- 2.17 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.18 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.19 Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.20 Refrigerator 4 °C (Mitsubishi, Japan)
- 2.21 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.22 UV transilluminator (Fotodyne, USA)
- 2.23 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.24 Water Purification equipment (Water pro PS, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย
 - 3.1 สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง
 - 3.1.1 Dry cotton or polyester swab
 - 3.1.2 Polypropylene conical tube: 15 ml (AxyGen® Scientific)
 - 3.1.3 Phosphate Buffer Saline (BIO BASIC INC., NY, USA)
 - 3.1.4 Penicillin-Streptomycin (10,000 units/mL) (GIBCO., CA, USA)
 - 3.2 วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัด RNA
 - 3.2.1 HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)
 - 3.3 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription หรือการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA
 - 3.3.1 Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma, Singapore)
 - 3.3.2 Improm-II™ Reverse transcriptase (Promega, USA)
 - 3.3.3 Random hexamer primer (Promega, USA)
 - 3.3.4 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega, USA)
 - 3.3.5 RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, USA)
 - 3.4 สารเคมีสำหรับกระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR
 - 3.4.1 5Prime Perfect TaqPlus Master Mix kit (5 prime GmbH, Germany)
 - 3.5 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis
 - 3.5.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)
 - 3.5.2 Boric acid (USB, Hongkong)
 - 3.5.3 EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
 - 3.5.4 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
 - 3.5.5 GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)
 - 3.5.6 Tris base Biotechnology Grade (USB, Hongkong)
 - 3.6 วัสดุและสารเคมีสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์
 - 3.6.1 Agarose Gel Extract mini kit (5 prime GmbH, Germany)
 - 3.7 สารเคมีการทำ DNA cloning และ Transformation ใน *E.Coli*
 - 3.7.1 Agar Bacteriological (GIBCO, NY, USA)
 - 3.7.2 FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)
 - 3.7.3 IPTG (isopropylthio- β -galactoside) (Eppendorf, Germany)
 - 3.7.4 One Shot TOP10 Chemically Competent *E.Coli* (Invitrogen, NY, USA)
 - 3.7.5 pGEM®-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)
 - 3.7.6 Tryptone powder (BIO BASIC INC., NY, USA)
 - 3.7.7 X-Gal (Promega, CA, USA)
 - 3.7.8 Yeast Extract (GIBCO, NY, USA)

4. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatic
 - 4.1 BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.1.3.0)
 - 4.2 Chromas Lite (version 2.1.1)
 - 4.3 EditSeq (DNA STAR, Madison, WI)
 - 4.4 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 6.05)
 - 4.5 Oligos primer design software (version 9.1)
 - 4.6 SeqManTM II (version 6.0)
 - 4.7 Sequin (version 12.3)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

1.1. Nasopharyngeal aspirate (NPA)

สำหรับการเก็บ nasopharyngeal aspiration จะใช้อุปกรณ์ดังต่อไปนี้ คือ กระจกสำหรับเก็บ น้ำล้างโพรงจมูก หลอดยางสำหรับสอดเข้าโพรงจมูก และหลอดยางสำหรับต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่ใช้ในการดูดโดยมีขั้นตอนการเก็บดังนี้ (ภาพที่ 8)



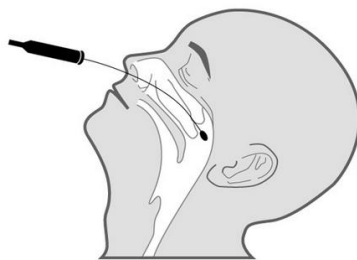
ภาพที่ 8: วิธีการเก็บ nasopharyngeal aspirate (NPA) [68]

ในขั้นแรกแพทย์หรือพยาบาลจะทำการฉีดน้ำเกลือประมาณ 3-4 มิลลิลิตรเข้าไปในโพรงจมูก จากนั้นจะทำการสอดอุปกรณ์ดังภาพที่ 8 แล้วทำการดูดน้ำล้างโพรงจมูกเข้าสู่กระจกเก็บ จากนั้นตัวอย่างจะถูกเก็บใน viral transport media (VTM) ที่ประกอบด้วยสารละลาย PBS ที่มียาปฏิชีวนะ (Penicillin G (2×10⁶ U/L), Streptomycin 200 mg/liter) หลังจากได้รับตัวอย่างแล้วจะทำการแบ่งตัวอย่างลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ด้วย pasteur pipette แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ -70 °C เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 Nasopharyngeal swab (NS)

การทำ nasopharyngeal swab อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างคือไม้พันสำลี (cotton swab) โดยมีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้ คือ (ภาพที่ 9) วัดระยะความลึกให้พอดี วัดไม้สวอบ (Nasopharyngeal swab) จากปลายจมูกถึงติ่งหูของผู้ป่วย แล้วหักครึ่งให้ไม้พันสำลีทำมุม 90 องศา ให้ผู้ป่วยหายใจเข้ายาว 1 ครั้ง และหายใจออกเต็มที่ หลังจากนั้นกลั้นหายใจ สอดไม้พันสำลีเข้าไปในบริเวณโพรงจมูกของผู้ป่วย ให้พยายามขยับทิศทางของไม้เล็กน้อยจนสอดเข้าได้ การสอดไม้พันสำลีควรสอดในทิศทางตั้งฉากกับใบหน้าของผู้ป่วย จะทำให้สามารถสอดไม้พันสำลีเข้าจนสุดได้จากนั้นหมุนไม้ประมาณ 2-3

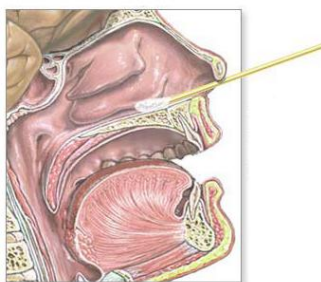
วินาที แล้วดึงไม้ออก จุ่มปลายไม้ลงใน viral transport media (VTM) ปิดหลอดเก็บตัวอย่างให้สนิท หลังจากนั้นจึงแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube เพื่อนำไปสกัด RNA สำหรับตัวอย่างที่เหลือจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -70°C



ภาพที่ 9: วิธีการเก็บ nasopharyngeal swab (NPS) [69]

1.3 Nasal swab

การเก็บตัวอย่างในรูปแบบนี้จะต้องให้ผู้ป่วยแหงนหน้าขึ้นประมาณ 45 องศา วัดไม้ nasal swab จากปลายจมูกถึงบริเวณโพรงจมูกตั้งรูปที่ 10 สอดไม้ nasal swab เข้าจนถึงบริเวณโพรงจมูก หมุนไม้ nasal swab โดยรอบประมาณ 3 วินาที แล้วดึงออก จุ่มปลายไม้ nasal swab ลงใน viral transport media (VTM) หลังจากนั้นจึงแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube เพื่อนำไปสกัด RNA สำหรับตัวอย่างที่เหลือจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -70°C



ภาพที่ 10: วิธีการเก็บ nasal swab, (NS) [70]

2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA)

ตัวอย่างที่ได้จะนำมาทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 2.1 แบ่งตัวอย่างปริมาตร 200 μ l ใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml จากนั้นเติม VB lysis buffer 400 μ l นำไป vortex แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
- 2.2 เติม 95% ethanol ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไป vortex
- 2.3 แบ่งสารละลายที่ได้ใส่ลงใน VB column 600 μ l จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- 2.4 ดูดสารละลายที่เหลือลงใน VB column ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกครั้ง
- 2.5 เติม W1 ปริมาตร 400 μ l ลงใน VB column นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- 2.6 เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน VB column นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- 2.7 นำ VB column ไป centrifuge อีกครั้งเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้สารละลายที่ตกค้างบน filter ตกลงใน collection tube ให้หมด
- 2.8 นำ VB column ใส่ลงใน microcentrifuge 1.5 ml อันใหม่ จากนั้นเติม RNase-free water หรือ DEPC ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วจึงนำไป centrifuge
- 2.9 เก็บ RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อรอนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA

- 3.1. เตรียม microcentrifuge tube 1.5 ml จากนั้นเติม RNA 5 μ l, DEPC 5 μ l และ Random hexamer primer 1 μ l ผสมให้เข้ากัน
- 3.2. นำไป heat ที่ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งอีก 5 นาที แล้วนำไป spin down
- 3.3. เติมสารละลาย Improm II mixture จำนวน 12.5 μ l สำหรับเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดย Improm II mixture ประกอบด้วย

- Distilled water (DW)	2.5 μ l
- 3 mM MgCl_2	2.5 μ l
- 0.5 mM dNTPs	2.5 μ l
- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase inhibitor	0.5 μ l
- Reverse transcription buffer	3.5 μ l
- Reverse transcriptase	1 μ l
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) 5 นาที เพื่อให้ random hexamer primer เข้าไปจับกับสาย RNA ของไวรัส (Annealing)
5. นำไป Incubate ที่ 42°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้มีการสังเคราะห์สาย cDNA (Extension)

6. นำ cDNA ที่ได้ไป Heat ที่ 70 °C เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อ inactivate การทำงานของ เอนไซม์ reverse transcriptase แล้วนำ cDNA ที่ได้ไปเก็บที่ -20 °C เพื่อรอนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. การตรวจสอบผลการสกัด RNA

การตรวจสอบผลการสกัดโดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ซึ่งเป็น house-keeping gene ของมนุษย์ ด้วยวิธี PCR นั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบกระบวนการสกัด RNA ว่ามีประสิทธิภาพดีพอและสามารถสกัดสารพันธุกรรมได้หรือไม่ กระบวนการดังกล่าวเพื่อป้องกันไม่ให้เกิด false negative หรือการเกิดผลปลอมขึ้น สำหรับปริมาณสาร ไพรเมอร์ รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR แสดงอยู่ในตารางที่ 3-5 จากนั้นตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยปริมาณ agarose ในที่นี้จะใช้ 2% โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลาประมาณ 40 นาที แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วทำการเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ 100-1,000 base pair DNA ladder (DNA marker) ผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transluminator)

ตารางที่ 3: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบ GAPDH

Primer	Sequence (5' to 3')	Product size
GAPDH_F112	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	499 bp
GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	

ตารางที่ 4: แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ(μ l)
Nuclease free water	6
2.5 X Master Mix (5 primes)	5
GAPDH_F112 (10 μ M)	0.25
GAPDH_R603 (10 μ M)	0.25
cDNA template	1
Total volume	12.5

ตารางที่ 5: แสดงสถานะที่ใช้ทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH

PCR reaction	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	40 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1

5. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ในการศึกษานี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ HCoV จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ รวมถึงใช้ในการจำแนกกลุ่มของเชื้อออกเป็น HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 และ HCoV-HKU1 โดยจะทำการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับตรวจสอบยีน ดังนี้

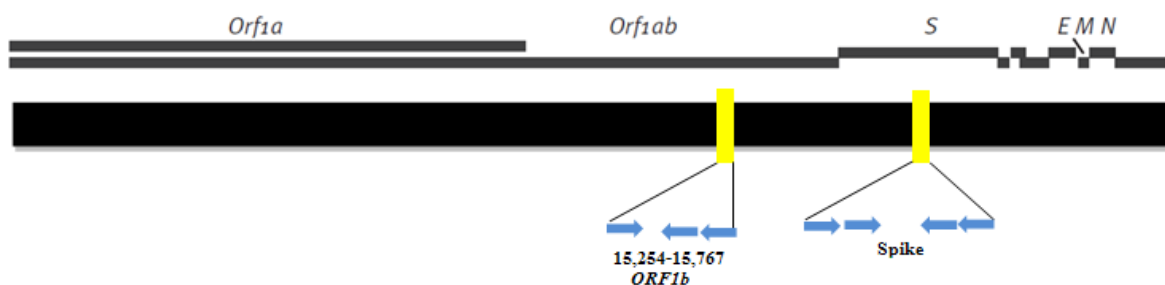
- ยีน *RdRp* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน ORF1b ในส่วน non-structural protein ของเชื้อ HCoV เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีความอนุรักษ์ (conserved region) ระหว่างสายพันธุ์ จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ HCoV ได้ทุกสายพันธุ์ [71, 72]
- ยีน *spike (S gene)* เป็นช่วงที่มีความจำเพาะของเชื้อ HCoV แต่ละสายพันธุ์ จึงนิยมใช้ในการระบุสายพันธุ์หรือจีโนไทป์ของเชื้อ HCoV

สำหรับวิธีการออกแบบขั้นแรกนำลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ทั้งหมดของเชื้อ HCoV ทุกสายพันธุ์ ได้แก่ NL63, 229E, OC43, HKU1, SARS และ MERS จากฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) มาทำการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.1.3.0) เพื่อจำแนกเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และบริเวณที่มีความหลากหลาย (variable region) จากนั้นเลือกบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) มาทำการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับไพรเมอร์ที่มีคุณสมบัติที่ต้นขนาดของนิวคลีโอไทด์ควรอยู่ที่ประมาณ 17-28 นิวคลีโอไทด์ โดยจะต้องมีปริมาณ GC content ประมาณ 50-60% เพื่อให้จับกับ DNA template ได้อย่างเสถียร นอกจากนี้บริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ควรเป็น G หรือ C เพื่อที่การสังเคราะห์ DNA สายใหม่เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับค่า T_m หรือค่า melting temperature ของไพรเมอร์แต่ละคู่ (forward-reverse) ควรที่จะเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เพื่อให้มีประสิทธิภาพของ

การทำ PCR ที่ดี โดยค่า T_m ที่เหมาะสมจะอยู่ที่ประมาณ 55-70 °C สำหรับค่า T_m สามารถคำนวณได้ดังสมการนี้

$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

โดย annealing temperature ที่เหมาะสมจะอยู่ที่ค่า $T_m - 5$ °C



ภาพที่ 11: บริเวณของไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการวิจัย (ดัดแปลงมาจาก [71])

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้งานวิจัยนี้ได้ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบ (screening) เชื้อ HCoV และไพรเมอร์สำหรับจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6: แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการศึกษา

Gene	Primer	Genotype	Sequence (5' to 3')	Position*	Size of PCR product
RdRp	SP6_CoV_16053_F**	All	ATTTAGGTGACACTATAGGGTTGG	16053-16076	454 bp
	CoV_16594_R		GAYTAYCCTAARTGTGA	16568-16594	
	CoV_Pan_16510_R		TATATCARAAYAATGTCTTTATGTC	16486-16510	
Spike	HCoV_S229E_F1	HCoV-229E	GTGGGTGCACTACCTAAGAC	21116-21135	1,057 bp
	HCoV_S229E_R1		CGTGGTTGAACAGCAATTATAGAACC	22244-22269	
	HCoV_S229E_F2		GAGTTTGTATTTCACGCACAGGAC	21143-21167	
	HCoV_S229E_R2		CCATCTGCACAAACGCCAAAAC	22224-22245	
Spike	HCoV_SHKU1_F1	HCoV-HKU1	TCACCTCTTAATTGGGAACGTA	21925-21904	505 bp
	HCoV_SHKU1_R1		CATTAGAACAAGTGGTGCCAC	21141-21121	
	HCoV_SHKU1_F2		GATTTGCAGTTGGGCAGTTCTGG	21745-21723	
	HCoV_SHKU1_R2		AAAGGCATCAGGACTACAAA	21240-21221	
Spike	HCoV_SNL63_F1	HCoV-NL63	GACACCACAATACCTTTTGG	19464-19445	830 bp
	HCoV_SNL63_R1		CTGGTTGGTTACATGGTGTAC	18450-18429	
	HCoV_SNL63_F2		CATGTTAGCACTTTTGTGGGT	19392-19372	
	HCoV_SNL63_R2		CCACCAGCAAGTGACTGGTTTG	18542-18521	
Spike	HCoV_SOC43_F1	HCoV-OC43	GTCGGTGCCCTCTCCATTAATT	22595-22573	965 bp
	HCoV_SOC43_R1		GGCCGCAGAAACACGAC	21591-21575	
	HCoV_SOC43_F2		AATATGAGCAGCCTGATGTC	22540-22521	
	HCoV_SOC43_R2		CCGAAATAGCAATGCTGGTTC	21556-21536	

* RdRp gene primer ที่สอดคล้องกับตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_002645

* Primers ของ S gene genotype 229E: ที่สอดคล้องกับตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_002645

* Primers ของ S gene genotype HKU1: ที่สอดคล้องกับตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_006577

* Primers ของ S gene genotype NL63: ที่สอดคล้องกับตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_005831

* Primers ของ S gene genotype OC43: ที่สอดคล้องกับตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_005147

**SP6 ลำดับนิวคลีโอไทด์คือ ATTTAGGTGACACTATAG

Universal degenerate code: Y=(C/T), R=(A/G), B=(C/G/T) และ N=(A/G/C/G)

6. การตรวจหาเชื้อ HCoV ด้วยวิธี semi-nested PCR

นำ cDNA ที่ได้ไปตรวจหาเชื้อ HCoV โดยทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ในบริเวณยีน *RdRp* ของ ORF1b ของไวรัสด้วยวิธี semi-nested PCR ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 รอบ โดยการทำ PCR รอบแรกจะใช้ไพรเมอร์ SP6_CoV_16053_F และ CoV_16594_R สำหรับการตรวจสอบ HCoV ทุกสายพันธุ์ รวมทั้ง MERS-CoV ส่วนในการทำ PCR รอบที่ 2 จะเปลี่ยนเฉพาะ reverse primer เป็น CoV_Pan_16510_R สำหรับตรวจสอบ

HCoV ทั้งห้าสายพันธุ์รวมทั้งการตรวจสอบกับสายพันธุ์ MERS-CoV โดยรายละเอียดของปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 7 และ 8

ตารางที่ 7: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HCoV

สารเคมีที่ใช้		ปริมาณ (μl)
PCR 1 st	PCR 2 nd	
Rnase free water	Rnase free water	6
2.5 X Master Mix (5 primes)	2.5 X Master Mix (5 primes)	5
SP6_CoV_16053_F (10 μM)	SP6_CoV_16053_F (10 μM)	0.25
CoV_16594_R (10 μM)	CoV_Pan_16510_R (10 μM)	0.25
cDNA template	1 st round PCR product	1

ตารางที่ 8: แสดงสถานะทำ Semi-nested PCR เพื่อ Screen หาเชื้อ HCoV

PCR reaction	PCR 1 st			PCR 2 nd		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	40	94	30 วินาที	40
Annealing	50	30 วินาที		58	30 วินาที	
Extension	72	40 วินาที		72	40 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1

7. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ด้วยวิธี nested PCR

เมื่อตรวจหาเชื้อ HCoV โดยการเพิ่มจำนวนยีนในส่วน *RdRp* แล้ววิเคราะห์ผลเบื้องต้น โดยการนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) เพื่อเทียบผลกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) จะได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าตัวอย่างที่ให้ผลที่เป็นบวก (positive) เป็น HCoV หรือไม่ และเป็น HCoV นั้นเป็นสายพันธุ์ใด จากนั้นจึงนำ cDNA ของตัวอย่างที่ให้ผลที่เป็นบวก (positive) นั้นมาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *spike* ในแต่ละสายพันธุ์ โดยทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ในบริเวณยีน *spike* ของไวรัสด้วยวิธี nested PCR ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนรายละเอียดของปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 9: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อจัดจำแนกเชื้อ HCoV

สารเคมีที่ใช้		ปริมาณ (μl)
PCR 1 st	PCR 2 nd	
Rnase free water	Rnase free water	6
2.5 X Master Mix (5 primes)	2.5 X Master Mix (5 primes)	5
Forward primer (10 μM)	Forward primer (10 μM)	0.25
Reward primer (10 μM)	Reward primer (10 μM)	0.25
cDNA template	1 st round PCR product	1
Total volume		12.5

ตารางที่ 10: แสดงสภาวะที่ใช้ทำ Nested PCR เพื่อจัดจำแนกเชื้อ HCoV

PCR reaction	PCR 1 st			PCR 2 nd		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	40	94	30 วินาที	40
Annealing	50	30 วินาที		55	30 วินาที	
Extension	72	40 วินาที		72	40 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1

8. Agarose gel electrophoresis และ PCR product purification

หลังจากทำ PCR แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยปริมาณ agarose ในที่นี้จะใช้ 2% โดยมวลต่อปริมาตร โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นจึงนำ gel ไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที แล้วจึงทำการตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการโดยเทียบกับ 100 bp DNA ladder โดยตรวจสอบผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transluminator) ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ เป็นดังนี้

- ยีน RdRp ของเชื้อ HCoV คือ 454 bp
- ยีน spike ของ HCoV-229E คือ 1,057 bp
- ยีน spike ของ HCoV-HKU1 คือ 505 bp
- ยีน spike ของ HCoV-NL63 คือ 830 bp
- ยีน spike ของ HCoV-OC43 คือ 965 bp

เมื่อพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการแล้วจึงทำการตัด gel บริเวณนั้นออกมาเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Agarose Gel Extract mini kit (5 prime GmbH, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- 8.1 เติม buffer PS ลงไปใน gel ที่อยู่ใน 1.5 ml collection tube จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 10-15 นาที จนกระทั่ง gel ละลายเป็นเนื้อเดียวกันจนหมด
- 8.2 ระหว่างรอเวลาให้เตรียม PCRExtract Mini Column CB2 ที่มากับชุด kit สำเร็จรูป จากนั้นเติม buffer BL 500 µl แล้ว จึงนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ ขนตอนนี้เพื่อชะล้าง filter ของ column ให้พร้อมสำหรับขั้นตอนต่อไป
- 8.3 ดูด gel ที่ละลายหมดแล้วในข้อ 8.1 ลงใน PCRExtract Mini Column CB2 จากนั้นจึงนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ที่
- 8.4 เติม buffer PW 600 µl นำไป centrifuge เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ที่
- 8.5 ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกครั้งโดยใช้ buffer PW 500 µl จากนั้นเทสารละลายใน collection tube ที่
- 8.6 ทำการ centrifuge เพิ่มอีก 2 นาที เพื่อเป็นการ dry column จากนั้นย้าย PCRExtract Mini Column CB2 ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml ใหม่
- 8.7 เพื่อเป็นการชะ DNA เติม buffer PEB ปริมาตร 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไป centrifuge 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์อยู่ใน microcentrifuge tube 1.5 ml

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ปริมาณ 5 μ l มาตรวจสอบการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งว่าได้ DNA ขนาดที่ต้องการหรือไม่ และมีความเข้มข้นเพียงพอหรือไม่ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่บริษัท First base laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยวิธีของ Sanger

9. การเตรียม Positive Control โดยวิธี DNA Cloning

9.1 Ligation

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาทำการ ligation ระหว่าง PCR product กับ pGEM[®] T-easy Vector (Promega, Madison, WI) มีการเตรียม mixture สำหรับการ ligation ดังตารางที่ 11 ดังนี้

ตารางที่ 11: แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ ligation

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ(μ l)
2x Rapid Ligation buffer	5.0
T4 DNA ligase	1.0
pGEM [®] T-easy Vector	1.0
PCR product	3.0
Total volume	10.0

แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน หลังจากนั้นนำ recombinant plasmid ที่ได้มาทำการ transformation เข้าใน competent cells (*E. Coli*) เพื่อเพิ่มจำนวน recombinant plasmid

9.2 Transformation

ขั้นตอนของการ transformation โดยใช้วิธี heat shock เป็นดังนี้

- 9.2.1 เตรียม competent cells ปริมาตร 50 μl ใน tube 1.5 ml จากนั้นเติม ligation mixture ปริมาตร 3 μl
- 9.2.2 นำ tube ที่มีส่วนผสมของ competent cells และ ligation mixture ไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
- 9.2.3 จากนั้นนำ tube ไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที
- 9.2.4 เติม SOC medium ปริมาตร 950 μl ที่มี 2M Mg^{2+} 10 μl และ 2M Glucose 10 μl
- 9.2.5 หลังจากนั้นนำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 200 rpm ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วจึงนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- 9.2.6 เทส่วน supernatant ที่ให้เหลือส่วนที่เป็น pellet ปริมาตรประมาณ 50 μl
- 9.2.7 จากนั้น spread ลงใน LB agar plate ที่มี Ampicillin, 200 mg/ml, IPTG 4 μl และ X-gal 15 μl เคลือบอยู่ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

9.3 Colony selection

สังเกตโคโลนีที่ขึ้นมาบน Agar plate โดยจะเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR ซึ่งมีรายละเอียดของไพรเมอร์ ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 12-14 เพื่อจำแนกโคโลนีที่มี vector ตามเงื่อนไขต่างๆ ดังนี้

- Blue colony มี empty vector ซึ่งไม่มี inserted DNA จะได้ PCR product ขนาด 250 bp
- White colony มี Recombinant vector ซึ่งมี inserted DNA จะได้ PCR product ขนาด 730 bp

โดยจะเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin , 200 mg/ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ตารางที่ 12: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ colony PCR

Primer	Sequence (5' to 3')
M13F (-20) primer	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R (-20) primer	GCGGATAACAATTTTCACACAGG

ตารางที่ 13: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ colony PCR

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร(μ l)
Rnase free water	6.0
2.5 X Master Mix (5 primes)	5.0
M13F (-20) primer (10 μ M)	0.5
M13R (-20) primer (10 μ M)	0.5
Total volume	12.0

ตารางที่ 14: แสดงสถานะที่ใช้ทำ colony PCR

PCR reaction	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 35
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	40 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1

9.4 Plasmid extraction

การสกัด plasmid ที่ได้จะใช้ FastPlasmid Mini kit (Eppendorf, Germany) ที่เป็นชุดสกัดสำเร็จรูป โดยมีขั้นตอนการสกัด ดังนี้

- 9.4.1 นำโคโลนี *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin 200 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง มาถ่ายลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วนำมา centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งสารละลาย ส่วน supernatant
- 9.4.2 ส่วน pellet ที่เหลือ จะเติม PD1 buffer (แช่เย็น) ที่เติม RNase A ปริมาตร 200 μ l และนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที
- 9.4.3 เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 μ l และกลับ microcentrifuge tube ไปมา จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
- 9.4.4 เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 μ l และกลับ microcentrifuge tube ไปมา จากนั้นนำสารละลาย lysate ลงใน spin column แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 9.4.5 ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใน collection tube อีกครั้ง เติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน PD column
- 9.4.6 จากนั้น centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใน Collection tube อีกครั้ง แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 9.4.7 จากนั้นใส่ PD column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 9.4.8 จะได้สารละลาย positive control ปริมาตร 50 μ l เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

10. การทดสอบ sensitivity

นำ stock plasmid มาวัดความเข้มข้น (ng/ul) ด้วย spectrometer แล้วคำนวณ copy number ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$N = \frac{g \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{M.W.}$$

M.W. = plasmid length+ pcr product size (bp)) × 660

เมื่อได้จำนวน copy number แล้วจะทำ 10-fold serial dilution เพื่อให้ได้ copy number ต่างๆ ได้แก่ 10^6 , 10^5 ,, 10^1 แล้วนำมาเป็น template ในการทำ PCR โดยรายละเอียดของไพรเมอร์ ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 6, 7 และ 8 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยปริมาณ agarose ในที่นี้จะใช้ 2% โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาผ่านกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นจึงนำ gel ไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที แล้วจึงทำการตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการโดยเทียบกับ 100 bp DNA ladder โดยดูผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transluminator) ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการตรวจสอบ คือ 454 bp

Sensitivity ของเทคนิคสามารถแปลผลได้จากปริมาณ copy ของ template ที่น้อยที่สุด ที่ยังสามารถให้ผลบวก (positive) ด้วยเทคนิค nested PCR

11. การทดสอบ specificity

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสอื่นๆที่ก่อโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจในคน ได้แก่ influenza A virus subtype H1N1 (pandemic 2009), influenza A virus subtype H3N2, influenza B virus, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human Parainfluenza (HPIVs) และ human adenovirus (HAdV) โดยคัดเลือกจากตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยวิธี PCR โดยรายละเอียดของไพรเมอร์ ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงใน ตารางที่ 6, 7 และ 8

Specificity ของเทคนิคนี้สามารถแปลผลได้จากไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ HCoV จะให้ผลบวกต่อตัวอย่างที่เป็น HCoV เท่านั้น ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ ไพรเมอร์จะไม่สามารถตรวจสอบได้จึงให้ผลที่เป็นลบเมื่อทดสอบกับไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ

12. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยใช้โปรแกรม

- Chromas Lite (version 2.1.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์ (chromatogram)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.1.3.0) ใช้สำหรับการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิจัยนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 6.05) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree
- SeqMan เป็นโปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนการเผยแพร่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์
- EditSeq เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการ export นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบแล้วจาก SeqMan

13. การวิเคราะห์ข้อมูล

การตรวจสอบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์

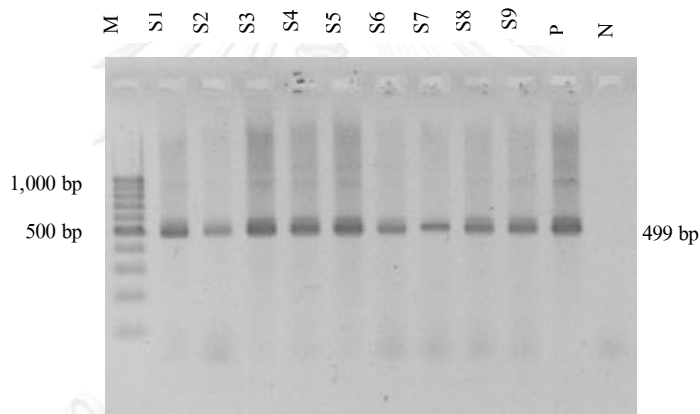
- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.1.1) จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันในขั้นต้นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นของเชื้อ HCoV หรือไม่ และจัดอยู่ในจีโนไทป์ใด
- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HCoV ที่ทราบจีโนไทป์แล้วมาทำการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.1.3.0) เพื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือน หรือต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อจำแนกว่าจีโนไทป์ใดบ้างที่สามารถพบในการศึกษานี้ และพบมากหรือน้อยเท่าไร โดยการศึกษาที่ใช้ค่าพารามิเตอร์คือ Neighbor-joining method โดยรูปแบบที่ใช้ คือ Kimura มีค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000 รูปแบบที่ใช้เป็นรูปแบบทดแทน (substitution model) คือ K80 model (Kimura, 1980)
- วิเคราะห์ข้อมูลในส่วนของตัวอย่างที่ให้ผล positive ไม่ว่าจะเป็นข้อมูลในด้าน เพศ อายุ จังหวัด และช่วงเวลา พบตัวอย่างที่ positive เพื่อจัดจำแนกข้อมูลต่างๆ ในด้านการระบาดของเชื้อ HCoV

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจสอบการสกัด RNA

หลังจากสกัด RNA ของไวรัสจากตัวอย่างของผู้ป่วยแล้วจึงทำการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA จากนั้นทำการตรวจสอบ cDNA ด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น housekeeping gene และถูกนำมาใช้เป็น internal control ในการทดลองนี้ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่มือมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 499 base pair (bp) ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 12

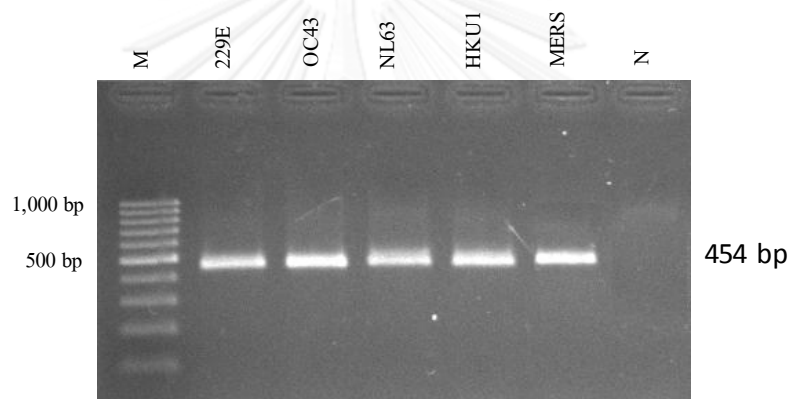


ภาพที่ 12: แสดงตัวอย่างผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ด้วยวิธี PCR ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR คือ 499 bp โดย M แทน 100-1,000 base pair DNA ladder, S1-S9 คือ ตัวอย่างที่ 1 ถึง 9 ตามลำดับ, P คือ positive control และ N คือ negative control

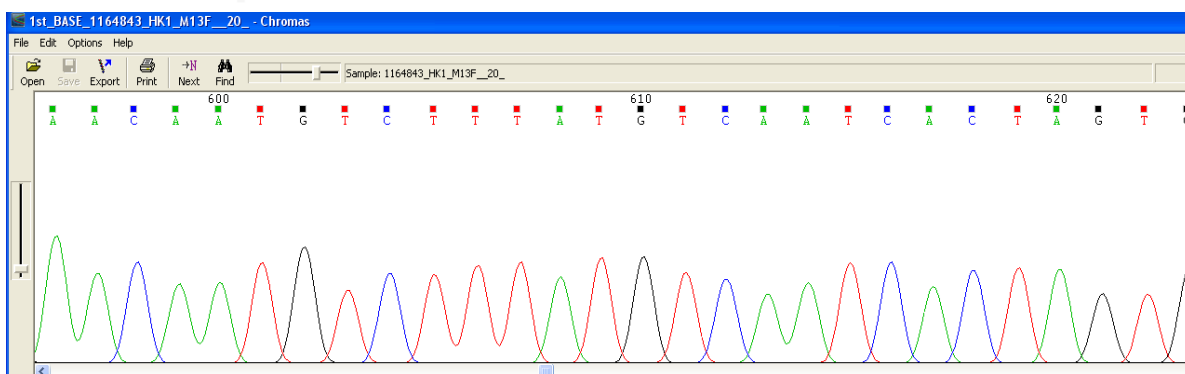
ผลการทำ PCR สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH พบว่าให้ผลบวกกับทุกตัวอย่าง แต่สำหรับตัวอย่างใดที่ให้ผลลบจะต้องทำการสกัด RNA ใหม่ ซึ่งเมื่อทำการสกัด RNA และเปลี่ยนเป็น cDNA แล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH อีกครั้งแล้วพบว่าให้ผลบวกกับทุกตัวอย่างที่ทำการสกัด RNA ใหม่

2. ผลการเตรียม Positive Control โดยวิธี DNA Cloning

ผลจากการเตรียม positive control จากตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อ HCoV ที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ หลังจากทำการสกัดพลาสมิดได้แล้วจึงนำพลาสมิดที่ได้มาทำการเจือจาง 100 เท่า จากนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทดลองคือ 454 bp ดังแสดงในภาพที่ 13 แล้วจึงทำการยืนยันว่า positive control ที่ได้ว่าเป็น HCoV รวมถึงป็นสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาหรือไม่ โดยการส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่บริษัท First base laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยวิธีของ Sanger ซึ่งผลที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ตามภาพที่ 14 ทำให้ทราบว่าพลาสมิดที่ได้จากการ cloning เป็น HCoV และเป็นสายพันธุ์ที่ศึกษาอยู่จริง และจะถูกนำมาใช้เป็น positive control ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 13: ผลการตรวจสอบการเตรียม Positive control ด้วยวิธี PCR ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR คือ 454 bp โดย M แทน 100-1,000 base pair DNA ladder, lane ที่ 2-6 แสดง Positive control ของ HCoV แต่ละสายพันธุ์ และ N คือ negative control



ภาพที่ 14: ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์จากการสกัดพลาสมิด

3. ผลการทดสอบ sensitivity

Sensitivity ของ primer ที่ใช้ทำ nested-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HCoV

ตารางที่ 15: แสดงความเข้มข้นและจำนวน copy number ของพลาสมิดที่ positive ต่อ HCoV

พลาสมิด	ความเข้มข้น (ng/μl)	Copy number × 10 ⁹
HCoV-HKU1	6.02	1.54
HCoV-OC43	24.4	6.26
HCoV-229E	20.3	5.21
HCoV-NL63	11.1	2.85
MERS-CoV	6.92	1.78

ผลการคำนวณ copy number ของพลาสมิดที่ให้ผลบวกต่อ HCoV สายพันธุ์ต่างๆ จากสมการ

$$N = \frac{g \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{M.W.}$$

เมื่อขนาดของ insert DNA = 539 bp

ดังนั้น M.W. = length × 660 = (plasmid + insert) × 660 = (3015 + 539) × 660 = 2,345,640

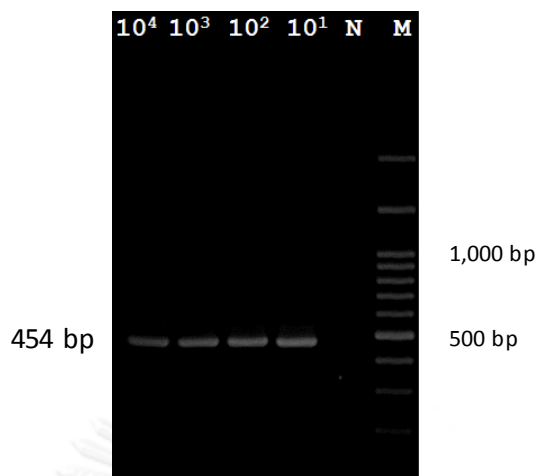
plasmid = pGEM Teasy vector

ยกตัวอย่างการคำนวณ copy number ของ plasmid MERS-CoV

$$\text{MERS-CoV} \quad N = \frac{6.92 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{2,345,640}$$

$$N = 1.78 \times 10^9$$

เมื่อได้จำนวน copy number แล้วจะทำ 10-fold serial dilution เพื่อให้ได้ copy number ต่างๆ ได้แก่ 10⁶, 10⁵,, 10¹ แล้วนำมาเป็น template ในการทำ PCR โดยรายละเอียดของไพรเมอร์ ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 6, 7 และ 8 โดยใช้ไพรเมอร์ในส่วนยีน *RdRp* ส่วนผลการทำ sensitivity โดยวิธี PCR แสดงในภาพที่ 15



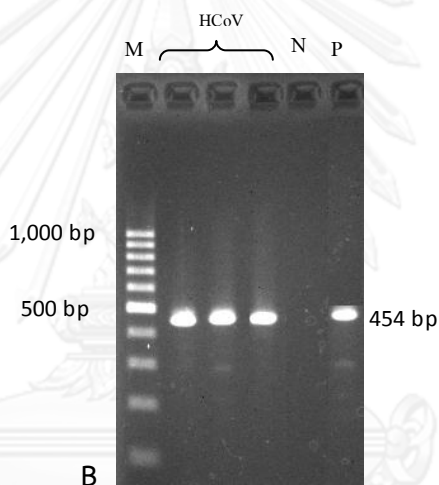
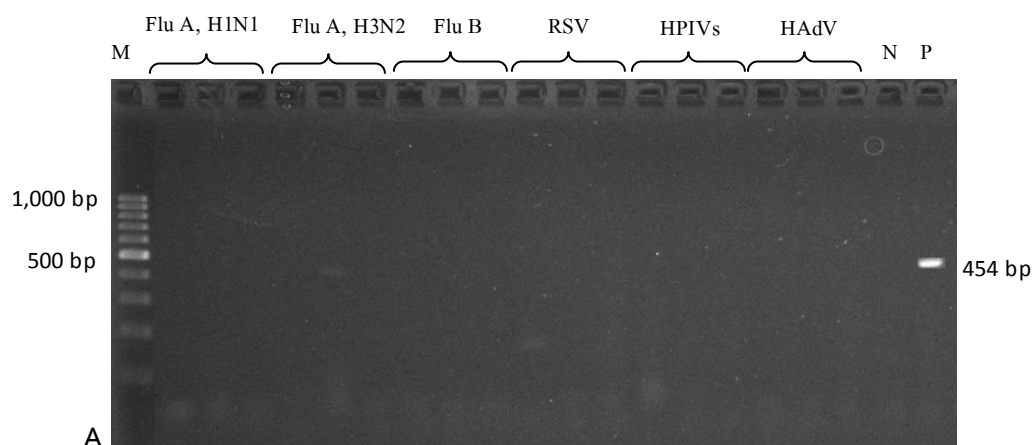
ภาพที่ 15: ผลการทำ PCR ทดสอบ sensitivity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ HCoV

เมื่อ M แทน 100-1,000 base pair DNA ladder, lane ที่ 1-4 แสดง Copy number ที่เจือจางความเข้มข้นตั้งแต่ 1×10^4 μg DNA/ μl จนถึง 1×10^1 μg DNA/ μl ของ MERS-HCoV และ N คือ negative control

Sensitivity ของเทคนิคสามารถแปลผลได้จากปริมาณ copy ของ template ที่น้อยที่สุด ที่ยังสามารถให้ผลบวก (positive) ด้วยเทคนิค nested PCR ซึ่งจากผลการศึกษพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความไวในการศึกษาต่อปริมาณ copy ของ template ที่น้อยที่สุดถึง 10 copy/ μl ในทุกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV จึงกล่าวได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความไวสูงต่อการตรวจหาเชื้อ HCoV

4. ผลการทดสอบ specificity Viral RNA

เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างที่ positive ต่อเชื้อไวรัสอื่นๆที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจในคนด้วยวิธี PCR โดยรายละเอียดของไพรเมอร์ ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 6, 7 และ 8 พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ มีความจำเพาะต่อเชื้อ HCoV เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 16 A และ 16 B



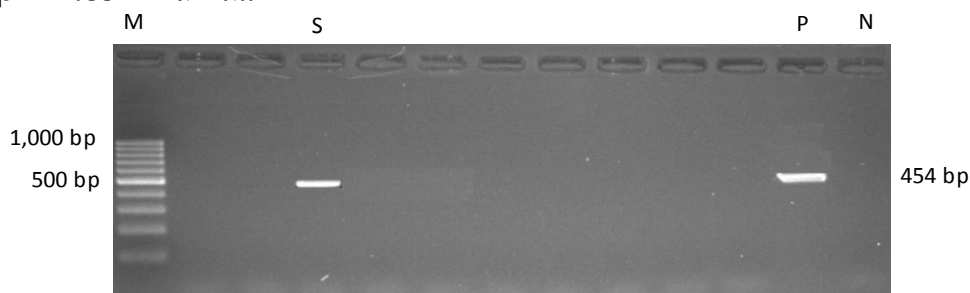
ภาพที่ 16: ผลการทำ PCR ทดสอบ specificity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดเชื้อ HCoV

A) ทดสอบ specificity ของไพรเมอร์โดยตรวจกับตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ คือ Influenza A virus subtype H1N1, H3N2, Influenza B virus, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human Parainfluenza (HPIVs) และ human adenovirus (HAdV) ตามลำดับ

B) ทดสอบ specificity ของไพรเมอร์โดยตรวจกับตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อเชื้อ HCoV เมื่อ M แทน 100-1,000 base pair DNA ladder, M แทน positive control และ N คือ negative control

5. ผลการตรวจหาเชื้อ HCoV

จากการตรวจคัดกรองเชื้อ HCoV โดยใช้วิธี semi-nested PCR ในการเพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณยีน *RdRp* ในส่วน ORF1b ของไวรัส ซึ่งรายละเอียดของไพรเมอร์ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 6, 7 และ 8 โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 454 bp ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17: แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาเชื้อ HCoV ด้วยวิธี semi-nested PCR ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 454 bp โดย M แทน 100-1,000 base pair DNA ladder, S คือ ตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อ HCoV ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่เหลือให้ผล negative ต่อเชื้อ HCoV, P คือ positive control และ N คือ negative control

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลที่ได้จากการทำ PCR พบว่าในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 5,833 ตัวอย่าง โดยมาจาก ตัวอย่างที่เป็น nasal swab (NS) จำนวน 4,621 ตัวอย่าง nasopharyngeal swab (NPS) จำนวน 575 ตัวอย่าง และ nasopharyngeal aspirate (NPA) จำนวน 637 ตัวอย่าง พบว่ามี 46 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HCoV คิดเป็น 0.79 % จากตัวอย่างทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบตามจำนวนของตัวอย่างในแต่ละกลุ่มพบว่าตัวอย่างที่ให้ผล positive นั้นมาจาก nasal swab จำนวน 30/4,621 (0.65%) nasopharyngeal swab จำนวน 7/575 (1.22%) ส่วนตัวอย่างที่เป็น nasopharyngeal aspirate ให้ผลที่เป็น positive ต่อ HCoV จำนวน 9/637 (1.41%) ดังแสดงในตารางที่ 16 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงร้อยละของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HCoV แยกตามโรงพยาบาลในแต่ละจังหวัด พบว่าโรงพยาบาลในกรุงเทพฯมีผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HCoV จำนวน 18 ตัวอย่างคิดเป็น 0.55 % จากตัวอย่างทั้งหมดของโรงพยาบาลในเขตกรุงเทพฯ (3,293 ราย) โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น มีผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HCoV จำนวน 27 ตัวอย่างคิดเป็น 1.12 % จากตัวอย่างทั้งหมดของโรงพยาบาลชุมแพ (2,408 ราย) ส่วนโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี มีผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HCoV จำนวน 1 ตัวอย่างคิดเป็น 0.76 % จากตัวอย่างทั้งหมดของโรงพยาบาลชลบุรี (132 ราย) ดังแสดงในตารางที่ 16 แต่จากการตรวจเชื้อ HCoV จากตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดไม่พบตัวอย่างใดที่ให้ผล positive ต่อ MERS-CoV

ตารางที่ 16: ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เมื่อจำแนกตามชนิดของตัวอย่าง

จังหวัด	Nasopharyngeal swab		Nasopharyngeal aspirate		Nasal swab		รวมตัวอย่างที่ให้ผลบวก/จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละจังหวัด (%)
	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (n=575)	ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HCoV (n=7) (%)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (n=637)	ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HCoV (n=9) (%)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (n=4,621)	ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HCoV (n=30) (%)	
กรุงเทพฯ n (%)	-	-	505	8 (1.58)	2,788	10 (0.36)	18/3,293 (0.55)
ขอนแก่น n (%)	575	7 (1.22)	-	-	1,833	20 (1.09)	27/2,408 (1.12)
ชลบุรี, n (%)	-	-	132	1 (0.76)	-	-	1/132 (0.76)
รวม	575	7 (1.22)	637	9 (1.41)	4,621	30 (0.65)	46/5,833 (0.79)

6. ผลการวิเคราะห์อายุและเพศของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ HCoV

ตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อเชื้อ HCoV นั้นคิดเป็น 0.79 % (46/5,833) พบว่าเป็นผู้หญิง 43.48% (20/46) และผู้ชาย 56.52% (26/46) โดยอัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายเท่ากับ 1:1.08 ในการศึกษารั้งนี้พบกลุ่มของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HCoV มากที่สุดในช่วงอายุ 0-5 ปี คือ 25/46 (54.35%) รองลงมาคือกลุ่มของผู้ป่วยในช่วงอายุมากกว่า 60 ปี คือ 7/46 (15.22%) เมื่อเทียบกับจำนวนผู้ที่ติดเชื้อ HCoV ทั้งหมด (46 ราย) แต่เมื่อเทียบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มอายุจะพบว่าช่วงอายุที่มีการติดเชื้อ HCoV ได้มากที่สุดคือช่วงอายุที่มากกว่า 60 ปี คือ 7/398 (1.76%) รองลงมาคือในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี คือ 25/2,197 (1.14%) จะสังเกตได้ว่าเชื้อ HCoV จะสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยทุกช่วงอายุ ดังแสดงในตารางที่ 17 แต่ช่วงอายุที่มีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับการติดเชื้อนั้นจะอยู่ในเด็กที่มีอายุในช่วงแรกเกิดจนถึง 5 ปี เด็กอายุ 11-15 ปี และในผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 60 ปี ก็มีโอกาสพบการติดเชื้อได้สูงเช่นกัน โดยอายุเฉลี่ยของผู้ที่ติดเชื้อจะเป็น 21.37 ปี (อายุต่ำสุด 4 เดือน อายุสูงสุด 93 ปี SD = 27.04, mode = 1, median = 8.5) ดังแสดงในตารางที่ 16

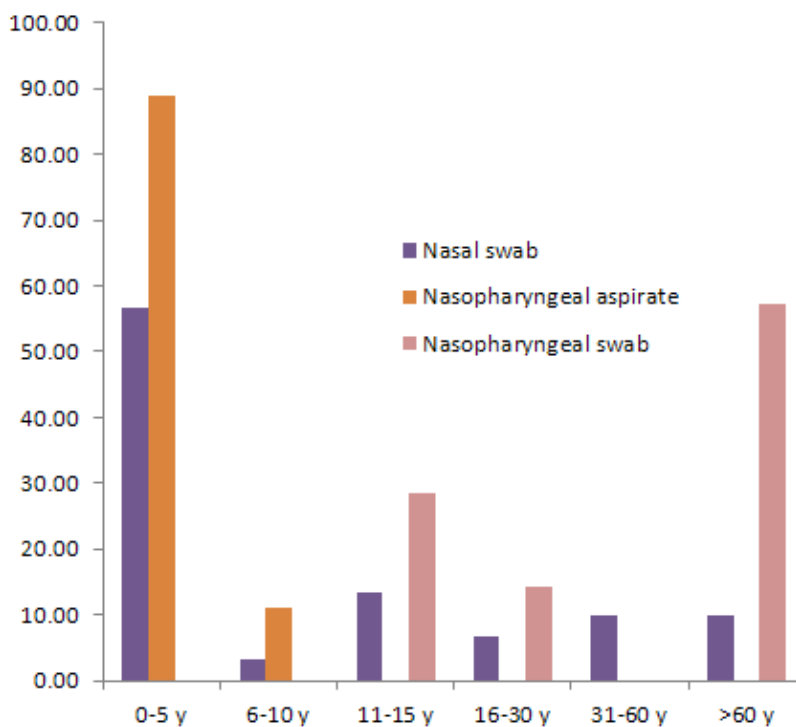
ตารางที่ 17: ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ลักษณะที่ใช้ศึกษา	ตัวอย่าง		ตัวอย่างที่ให้ผลบวก/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด ในแต่ละกลุ่มอายุ (%)
	จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมด (n=5,833)	ตัวอย่างที่ให้ผลบวก ต่อ HCoV (n=46) (%)	
เพศ			
ผู้ชาย, จำนวน (%)	2,934 (50.31)	26 (56.52)	
ผู้หญิง, จำนวน (%)	2,898 (49.69)	20 (43.48)	
อายุ(ปี)			
Median	11	8.5	
Mode	1	1	
Mean (SD)	19.57 (19.93)	21.37 (27.04)	
กลุ่มอายุ (ปี)			
0-5 (%)	2,197 (37.67)	25 (54.35)	25/2,197 (1.14)
6-10 (%)	732 (12.55)	2 (4.35)	2/732 (0.27)
11-15 (%)	538 (9.22)	6 (13.04)	6/538 (1.11)
16-30 (%)	866 (14.85)	3 (6.25)	3/866 (0.35)
31-60 (%)	1,102 (18.89)	3 (6.25)	3/1,102 (0.27)
>60 (%)	398 (6.82)	7 (15.22)	7/398 (1.76)

ตารางที่ 18: ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแบ่งตามช่วงอายุ

อายุ (ปี)	จำนวน ตัวอย่างที่ positive	Nasal swab		Nasopharyngeal aspirate		Nasopharyngeal swab	
		จำนวนตัวอย่างที่ positive (N=30)	อัตรา positive (%)	จำนวนตัวอย่าง ที่ positive (N=9)	อัตรา positive (%)	จำนวนตัวอย่าง ที่ positive (N=7)	อัตรา positive (%)
0-5	25	17	56.67	8	88.89	-	-
6-10	2	1	3.33	1	11.11	-	-
11-15	6	4	13.33	-	-	2	28.57
16-30	3	2	6.67	-	-	1	14.29
31-60	3	3	10.00	-	-	-	-
>60	7	3	10.00	-	-	4	57.14

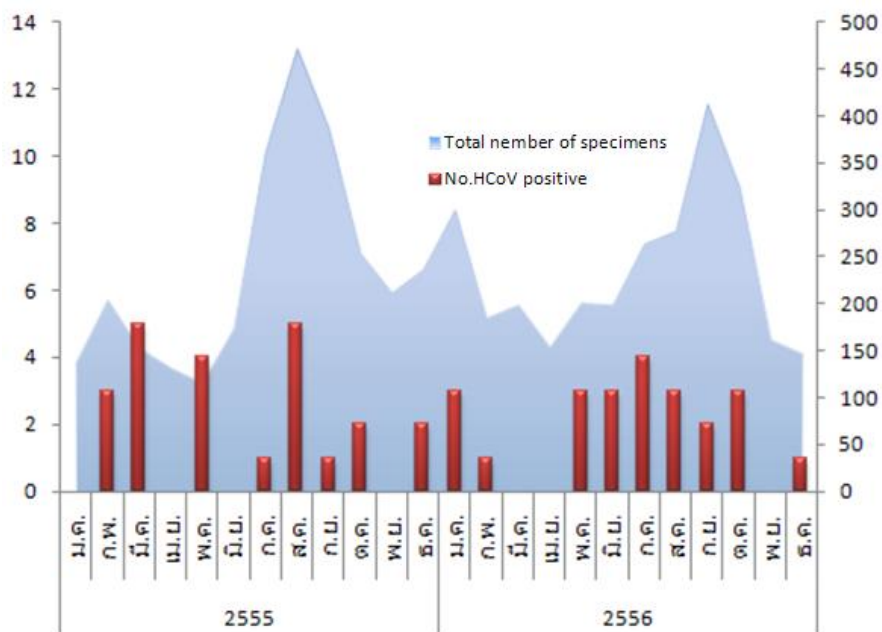
เมื่อพิจารณาถึงประเภทของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าตัวอย่างในรูปแบบ nasopharyngeal aspirate และ nasopharyngeal swab จะพบผลที่ positive ต่อ HCoV มากกว่า ตัวอย่างในรูปแบบ nasal swab เมื่อเทียบเป็นอัตราการพบผล positive ต่อ HCoV ดังแสดงใน ตารางที่ 18 และภาพที่ 18



ภาพที่ 18: การกระจายตัวของช่วงอายุผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCoV

7. ผลการวิเคราะห์ฤดูกาลและปีที่ตรวจพบเชื้อ HCoV

การติดเชื้อ HCoV ในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 พบว่าอัตราการติดเชื้อยังคงมีอัตราการกระจายตัวที่คงที่ สามารถพบการติดเชื้อของไวรัสชนิดนี้ได้ตลอดทั้งปี โดยทั้ง 2 ปีนี้ยังไม่พบการระบาดที่รุนแรงเพราะยังพบความชุกของเชื้อในช่วงฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาว โดยในปี ค.ศ. 2012 จะพบความชุกของเชื้อ HCoV ในเดือนมีนาคม พฤษภาคม และสิงหาคม ส่วนในปี ค.ศ. 2013 จะพบความชุกของเชื้อ HCoV ในเดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคม ดังแสดงในภาพที่ 19 อย่างไรก็ตามในช่วงฤดูร้อน เช่น เดือนเมษายนนั้นจะไม่พบการระบาดของเชื้อ HCoV ในช่วงปี 2012-2013 สำหรับอัตราความชุกในแต่ละปีได้แสดงไว้ในตารางที่ 19



ภาพที่ 19: ความชุกของเชื้อ HCoV ในแต่ละเดือนตั้งแต่ปี ค.ศ. 2012-2013

ตารางที่ 19: ความชุกของเชื้อ HCoV ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013

ปี ค.ศ	NPS specimens			NPA specimens		
	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ความชุกต่อปีของเชื้อ HCoV (%)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ความชุกต่อปีของเชื้อ HCoV (%)
2012	2,362	15	0.64	505	8	1.58
2013	2,834	22	0.78	132	1	0.76

8. ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อ HCoV

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าผู้ป่วยที่มีอาการจากการติดเชื้อ HCoV มักเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract infection, URTI) ส่วนใหญ่จะมีอาการคล้ายไข้หวัดทั่วไป คือ มีไข้ ไอ เจ็บคอ แต่จะมีบางรายที่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory tract infection, LRTI) ที่มีอาการหลอดลมฝอยอักเสบเฉียบพลัน หรือปอดอักเสบ หายใจลำบาก ซึ่งจะพบได้น้อย ดังแสดงรายละเอียดด้าน เพศ อายุ และกลุ่มอาการของโรคเมื่อเกิดการติดเชื้อ HCoV สายพันธุ์ต่างๆ ในตารางที่ 20 และ 21

ตารางที่ 20: รายละเอียดด้าน เพศ อายุ วันที่เก็บตัวอย่าง สายพันธุ์ที่ติดเชื้อ HCoV ในผู้ป่วย

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บตัวอย่าง	HCoV genotype
1	C 2715	12 ปี	10 มี.ค. 55	NL63
2	C 2728	11 ปี	29 มี.ค. 55	NL63
3	C 2734	1 ปี	29 มี.ค. 55	NL63
4	C 2735	3 ปี	29 มี.ค. 55	NL63
5	C 2824	12 ปี	10 พ.ค. 55	NL63
6	C 2826	12 ปี	10 พ.ค. 55	NL63
7	C 2994	1 ปี	10 ก.ค. 55	NL63
8	C 3130	10 เดือน	22 ส.ค. 55	NL63
9	C 3131	1 ปี	22 ส.ค. 55	NL63
10	C 3132	6 เดือน	22 ส.ค. 55	NL63
11	C 3275	3 ปี	17 ต.ค. 55	HKU1
12	C 3432	10 ปี	14 ธ.ค. 55	NL63
13	C 3446	2 ปี	18 ธ.ค. 55	NL63
14	C 3483	3 ปี	08 ม.ค. 56	HKU1
15	C 3487	2 ปี	08 ม.ค. 56	HKU1
16	-C 3810	4 ปี	15 พ.ค. 56	OC43
17	C 3880	4 ปี	21 มิ.ย. 56	HKU1
18	C 3966	3 ปี	18 ก.ค. 56	HKU1
19	C 3983	3 ปี	31 ก.ค. 56	HKU1
20	C 4091	5 ปี	3 ก.ย. 56	HKU1
21	C 4371	1 ปี	18 ธ.ค. 56	OC43
22	A 31	64 ปี	7 พ.ค. 56	HKU1
23	A 54	81 ปี	15 พ.ค. 56	229E
24	A 154	14 ปี	4 ก.ค. 56	HKU1

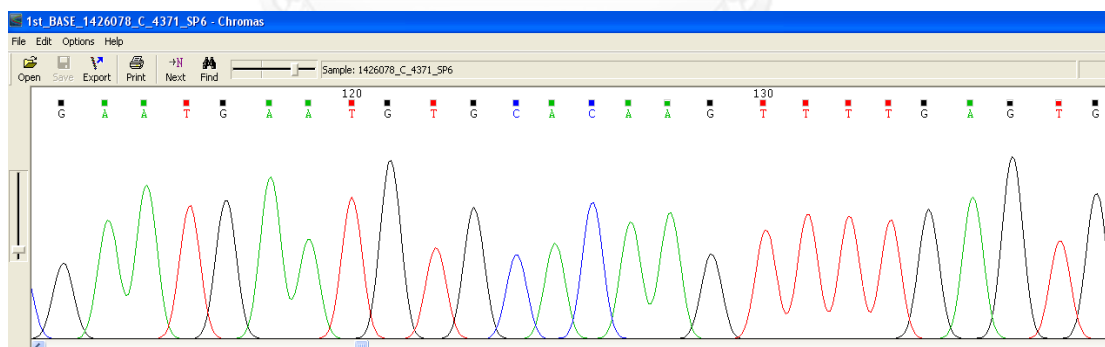
ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บตัวอย่าง	HCoV genotype
25	A 210	29 ปี	25 ก.ค. 56	HKU1
26	A 250	15 ปี	7 ส.ค. 56	HKU1
27	A 396	71 ปี	9 ต.ค. 56	HKU1
28	A 431	72 ปี	17 ต.ค. 56	NL63
29	B 6163	32 ปี	28 มี.ค. 55	NL63
30	B 6637	2 ปี	12 ส.ค. 55	HKU1
31	B 7479	70 ปี	17 ม.ค. 56	NL63
32	B 7625	40 ปี	07 ก.พ. 56	HKU1
33	B 7963	72 ปี	01 มิ.ย. 56	HKU1
34	B 8003	30 ปี	12 มิ.ย. 56	229E
35	B 8244	23 ปี	24 ส.ค. 56	HKU1
36	B 8462	93 ปี	28 ก.ย. 56	NL63
37	B 8568	42 ปี	12 ต.ค. 56	HKU1
38	CU 124	7 ปี	26 ส.ค. 55	HKU1
39	CU 148	10 เดือน	7 ก.ย. 55	NL63
40	CU 198	10 เดือน	10 ธ.ค. 55	NL63
41	CU 284	4 เดือน	08 ก.พ. 55	OC43
42	CU 328	1 ปี	29 มี.ค. 55	HKU1
43	CU 331	1 ปี	4 ก.พ. 55	229E
44	CU 334	1 ปี	4 ก.พ. 55	229E
45	CU 359	2 ปี	22 พ.ค. 55	229E
46	CB 39	2 ปี	12 ส.ค. 56	NL63

ตารางที่ 21: อาการทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อ HCoV สายพันธุ์ต่างๆ

ลักษณะอาการ	จำนวนที่ให้ผลบวก (%)			
	229E	OC43	NL63	HKU1
จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก	5	3	19	19
URTI	2 (40.00)	2 (66.67)	16 (100)	15 (78.95)
LRTI	3 (60.00)	1 (33.33)	-	4 (21.05)
อาการทางคลินิก				
ไข้	5 (100)	3 (100)	18 (94.74)	16 (84.21)
ไอ	2 (40)	2 (66.67)	11 (57.89)	10 (52.63)
เสมหะ	-	1 (33.33)	5 (26.32)	2 (10.53)
น้ำมูก	4 (80)	2 (66.67)	16 (84.21)	17 (89.47)
อาเจียน	3 (60)	-	10 (52.63)	12 (63.16)

9. ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม(GenBank) ผ่านโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษานี้เป็นของ HCoV ดังแสดงไว้ในภาพที่ 20-22



ภาพที่ 20: ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain OC43/human/USA/008-5/2000, complete genome	760	760	98%	0.0	98%	KF530092.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain OC43/human/USA/9712-31/1997, complete genome	760	760	98%	0.0	98%	KF530080.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain OC43/human/USA/9612-29/1996, complete genome	760	760	98%	0.0	98%	KF530078.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain OC43/human/USA/9712-13/1997, complete genome	760	760	98%	0.0	98%	KF530072.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain OC43/human/USA/9612-9/1996, complete genome	760	760	98%	0.0	98%	KF530064.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain OC43/human/USA/965-6/1996, complete genome	756	756	98%	0.0	98%	KF530098.1

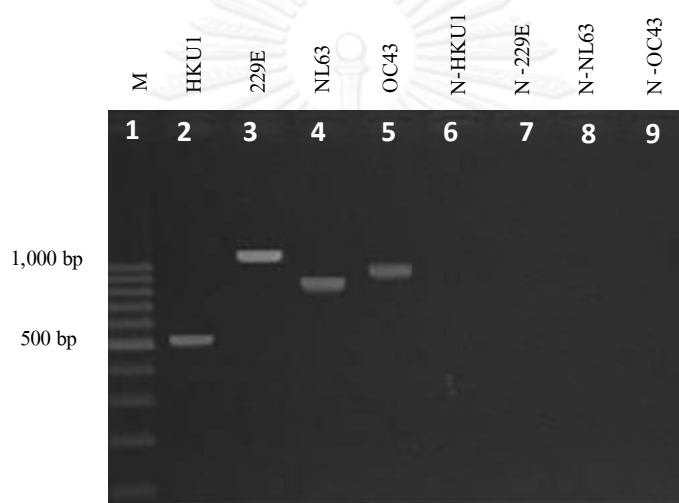
ภาพที่ 21: ตัวอย่างผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp ของเชื้อ HCoV ผ่านโปรแกรม BLAST

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
760 bits(842)	0.0	434/441(98%)	1/441(0%)	Plus/Plus
Query 6	T A A G G G T G A T C G T G C T A T G C C A A - C C T A C T A C G C A I T T G T T A G T A G T T T T G G T A T T A G C C C G	64		
Sbjct 15144	T A A G T G T G A T C G T G C T A T G C C A A A C C T A C T A C G C A I T T G T T A G T A G T T T G G T A T T A G C C C G	15203		
Query 65	A A A A C A T G A G A C A T G T T G T T C G C A A A G C G A T A G G T T T T A T C G A C T T G C G A A T G A A T G T G C	124		
Sbjct 15204	A A A A C A T G A G A C A T G T T G T T C G C A A A G C G A T A G G T T T T A T C G A C T T G C G A A T G A A T G C G C	15263		
Query 125	A C A A G T T T T G A G T G A A A T T G T T A T G T G T G G T G G C T G T T A T T A T G T T A A G C C T G G T G G C A C	184		
Sbjct 15264	A C A A G T T T T G A G T G A A A T T G T T A T G T G T G G T G G C T G T T A T T A T G T T A A G C C T G G T G G C A C	15323		
Query 185	T A G T A G T G G T G A T G C A A C T A C T G C T T T T G C T A A T T C A G T C T T T A A C A T A T G T C A A G C T G T	244		
Sbjct 15324	T A G T A G T G G T G A T G C A A C T A C T G C T T T T G C T A A T T C A G T C T T T A A C A T A T G T C A A G C T G T	15383		
Query 245	T T C A G C C A A T G T A T G T G C T T T A A T G T C A T G C A A T G G C A A T A A G A I T G A A G A T C T T A G T A T	304		
Sbjct 15384	T T C A G C C A A T G T A T G T G C T T T A A T G T C A T G C A A T G G C A A T A A G A I T G A A G A T C T T A G T A T	15443		
Query 305	A C G T G C T C T T C A G A A G C G C T T A T A C T C A C A T G T G T A T A G A A G T G A T A A G G T T G A T T C A A C	364		
Sbjct 15444	A C G T G C T C T T C A G A A G C G C T T A T A C T C A C A T G T G T A T A G A A G T G A T A A G G T T G A T T C A A C	15503		
Query 365	C T T T G T C A C A G A A T A T T A T G A A T T T T A A A T A A G C A T T T T A G T A T G A T G A T T T T G A G T G A	424		
Sbjct 15504	C T T T G T C A C A G A A T A T T A T G A A T T T T A A A T A A G C A T T T T A G T A T G A T G A T T T T G A G T G A	15563		
Query 425	C G A C G G C G T T G T G T T A A A A 445			
Sbjct 15564	T G A T G G G G T T G T G T T A T A A 15584			

ภาพที่ 22: ตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน RdRp ของเชื้อ HCoV ผ่านโปรแกรม BLAST

10. ผลการจัดจำแนกเชื้อ HCoV

เมื่อทราบจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อเชื้อ HCoV แล้ว จากนั้นนำผล sequence ที่ได้ จากตัวอย่างเหล่านั้นไปทำการ BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับ HCoV ในฐานข้อมูลของ GenBank จะได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อ HCoV นั้นเป็นสายพันธุ์ใด แล้วจึงนำ cDNA ที่ให้ผลที่ positive นั้นมาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์อีกครั้งด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ ของ HCoV โดยทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ในบริเวณยีน *spike* ของไวรัสด้วยวิธี nested PCR โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR แตกต่างกันไป ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ เชื้อ HCoV-229E มีขนาด 1,057 bp เชื้อ HCoV-HKU1 มีขนาด 505 bp เชื้อ HCoV-NL63 มีขนาด 830 bp และเชื้อ HCoV-OC43 มีขนาด 965 bp ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 23

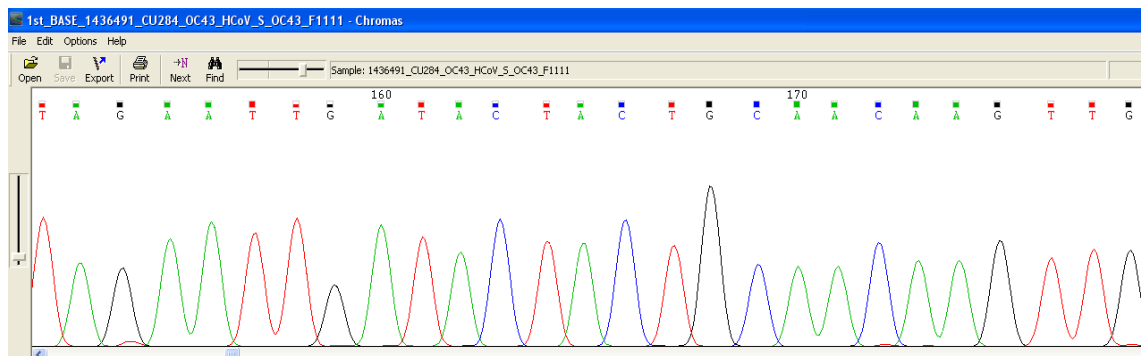


ภาพที่ 23: แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อ HCoV ด้วยวิธี nested PCR ซึ่งให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดต่างๆ ดังนี้ เชื้อ HCoV-HKU1 มีขนาด 505 bp เชื้อ HCoV-229E มีขนาด 1,057 bp เชื้อ HCoV-NL63 มีขนาด 830 bp และเชื้อ HCoV-OC43 มีขนาด 965 bp โดย M แทน 100-1,000 base pair ladder, lane ที่ 2-5 แทนตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อ HCoV, lane ที่ 6-9 แทนตัวอย่างที่เป็น negative control ของแต่ละสายพันธุ์ของ HCoV

11. ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการยืนยันโดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank database ผ่านโปรแกรม

BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษานี้เป็นยีนในส่วน spike ของ HCoV ในแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงตัวอย่างไว้ในภาพที่ 24-26



ภาพที่ 24: ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike ของ HCoV-OC43

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 isolate CU-H1187/2010 spike protein (S) gene, partial cds	1617	1617	98%	0.0	99%	JX513260.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 isolate CU-H1772/2010 spike protein (S) gene, partial cds	1613	1613	98%	0.0	99%	JX513268.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 isolate CU-H1367/2010 spike protein (S) gene, partial cds	1599	1599	98%	0.0	99%	JX513261.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 isolate CU-H967/2009 spike protein (S) gene, partial cds	1599	1599	98%	0.0	99%	JX513258.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 isolate CU-H1444/2010 spike protein (S) gene, partial cds	1590	1590	98%	0.0	99%	JX513262.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 isolate CU-H1597/2010 spike protein (S) gene, partial cds	1581	1581	96%	0.0	99%	JX513266.1
<input type="checkbox"/>	Human coronavirus OC43 strain HK04-02, complete genome	1573	1573	98%	0.0	98%	JN129835.1

ภาพที่ 25: ตัวอย่างผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike ของเชื้อ HCoV ผ่านโปรแกรม BLAST

Download ▾ GenBank Graphics

Human coronavirus OC43 isolate CU-H1187/2010 spike protein (S) gene, partial cds
Sequence ID: [gb|JX513260.1](#) Length: 2801 Number of Matches: 1

Range 1: 1153 to 2058 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1617 bits(1792)	0.0	903/906(99%)	1/906(0%)	Plus/Plus
Query 13	TITACTTGTA-TAATAITGATGCTGCTAAGATATATGGTATGTGTTTTCCAGCATAACT	71		
Sbjct 1153	TITACTTGTAATAATATTGATGCTGCTAAGATATATGGTATGTGTTTTCCAGCATAACT	1212		
Query 72	ATAGATAAGTTTGCTATACCCAATCCGAGGAAGTTGACCTACAATTGGGCAATTTGGGC	131		
Sbjct 1213	ATAGATAAGTTTGCTATACCCAATCCGAGGAAGTTGACCTACAATTGGGCAATTTGGGC	1272		
Query 132	TATTTGCAGTCATCCAACATATAGAATTGATACTACTGCAACAAGTTGTCAGTTGTATTAT	191		
Sbjct 1273	TATTTGCAGTCATCCAACATATAGAATTGATACTACTGCAACAAGTTGTCAGTTGTATTAT	1332		
Query 192	AATTTACCTGCTGCTAATGTCTCTGTTAGCAGGTTTAAATCCTTCTACTTGGAAATAAGAGA	251		
Sbjct 1333	AATTTACCTGCTGCTAATGTCTCTGTTAGCAGGTTTAAATCCTTCTACTTGGAAATAAGAGA	1392		
Query 252	TTTGGTTTTATAGAAGATTCCTGTTTTTGTGCCTCAACCTACAGGTGTTTTACTAATCAC	311		
Sbjct 1393	TTTGGTTTTATAGAAGATTCCTGTTTTTGTGCCTCAACCTACAGGTGTTTTACTAATCAC	1452		
Query 312	AGTGTAGTTTTATGCACAACACTGTTTTAAAGCCCTAAAAATTTCTGTCGGTGTAGTTCC	371		
Sbjct 1453	AGTGTAGTTTTATGCACAACACTGTTTTAAAGCCCTAAAAATTTCTGTCGGTGTAGTTCC	1512		
Query 372	TGTCCTGGTAAAAATAATGGTATAGGCACCTTGTCTGCAGGTACTAATCATTAACTTGT	431		
Sbjct 1513	TGTCCTGGTAAAAATAATGGTATAGGCACCTTGTCTGCAGGTACTAATCATTAACTTGT	1572		
Query 432	GATAATTTATGTACTCTTGATCCTATTACATTTAAAGCTCCAGATACTTATAAGTGCCCC	491		
Sbjct 1573	GATAATTTATGTACTCTTGATCCTATTACATTTAAAGCTCCAGATACTTATAAGTGCCCC	1632		
Query 492	CAAACATAATCTTTAGTTGGTATAGGTGAGCACTGTTCCGGGTCTTGTGTTAAAAAGTGAT	551		
Sbjct 1633	CAAACATAATCTTTAGTTGGTATAGGTGAGCACTGTTCCGGGTCTTGTGTTAAAAAGTGAT	1692		
Query 552	TATTGTGGAATAATCTTGTACTTGCCAACCAAGCATTTTTGGGTTGGTCTGCAGAC	611		

ภาพที่ 26: ตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน spike ของเชื้อ HCoV ผ่านโปรแกรม BLAST

12. ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อ HCoV

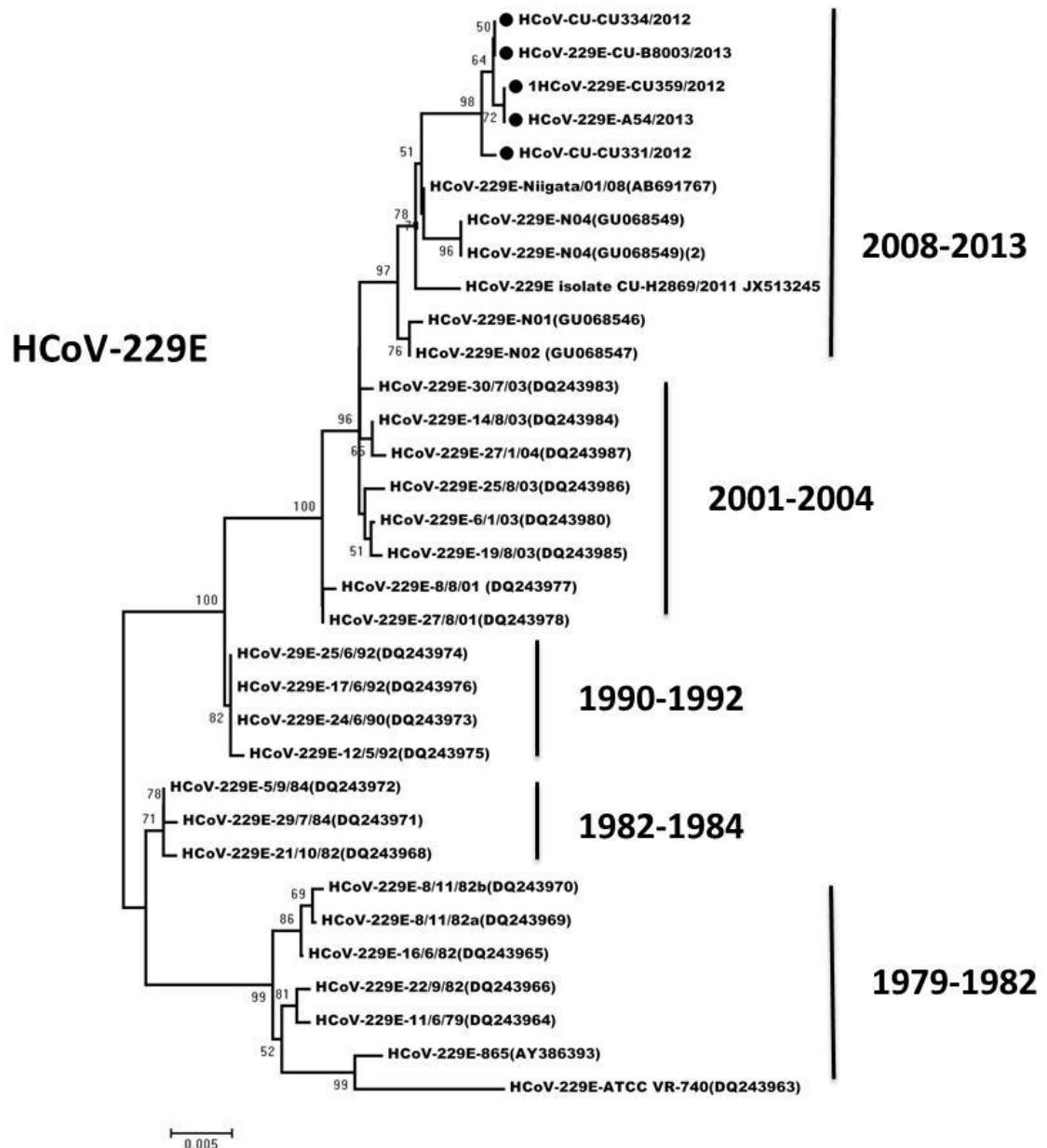
การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของเชื้อ HCoV นี้จะวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน spike โดยเริ่มจากการนำตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อ HCoV ที่ได้จากการ screening ที่บริเวณยีน RdRp มาทำ nested-PCR ที่บริเวณยีน spike อีกครั้งเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสออกมาได้อย่างจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV จากนั้นทำการ direct sequencing แล้วจึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA (version 6.05) ด้วยวิธี Neighbor-Joining Method โดยรูปแบบที่ใช้ คือ Kimura กำหนดค่า bootstap ไว้ที่ 1,000 สร้าง Phylogenetic tree โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน spike ทำให้สามารถที่จะจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ได้ โดยเปรียบเทียบข้อมูลกับ reference strains ที่ได้เก็บข้อมูลไว้ในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) ซึ่งผลที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 26 โดย HCoV-229E จะอยู่ในตำแหน่ง 21,206 -22,229 nt ที่อ้างอิงจากตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_002645 มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ 1,023 bp, identity matrix 96% HCoV-NL63 จะอยู่ในตำแหน่ง 21,587-22,417 nt ที่อ้างอิงจากตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_005831 มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ 830 bp, identity matrix 95% HCoV-

OC43 จะอยู่ในตำแหน่ง 24,787-25,714 nt ที่อ้างอิงจากตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_005831 มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ 927 bp, identity matrix 99% HCoV-HKU1 จะอยู่ในตำแหน่ง 24,205-24,655 nt ที่อ้างอิงจากตำแหน่งจาก GenBank accession number NC_006577 มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ 450 bp, identity matrix 98% จาก Phylogenetic tree จะพบว่าตัวอย่างที่เป็น HCoV-OC43 จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่างอ้างอิงที่อยู่ใน clade B และ clade C ส่วน HCoV-229E จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่างอ้างอิงที่อยู่ในปี 2008-2013 HCoV-HKU1 จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่างอ้างอิงที่อยู่ใน clade A และ clade B ส่วน HCoV-NL63 จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่างอ้างอิงที่อยู่ใน clade B ทั้งหมด

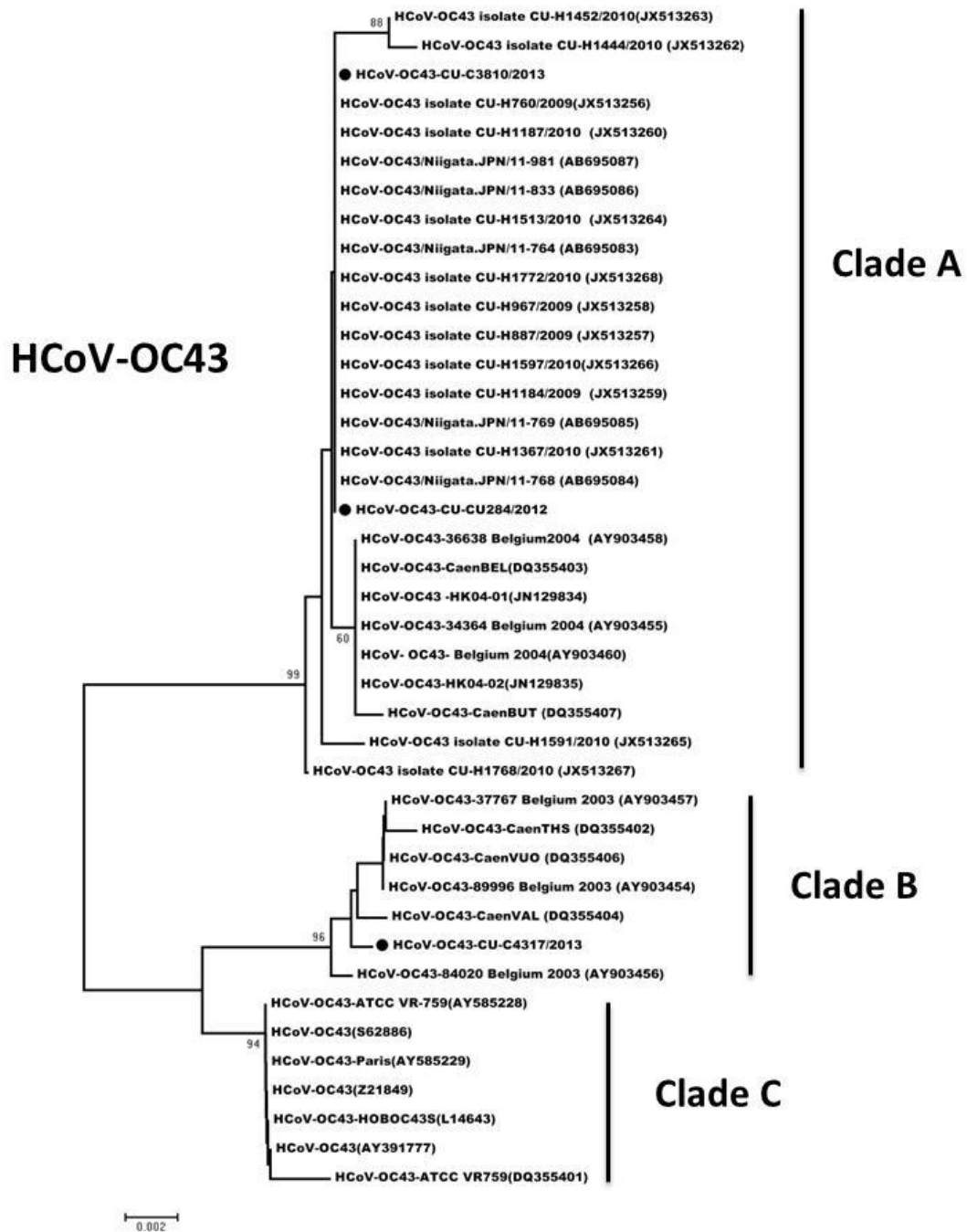


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

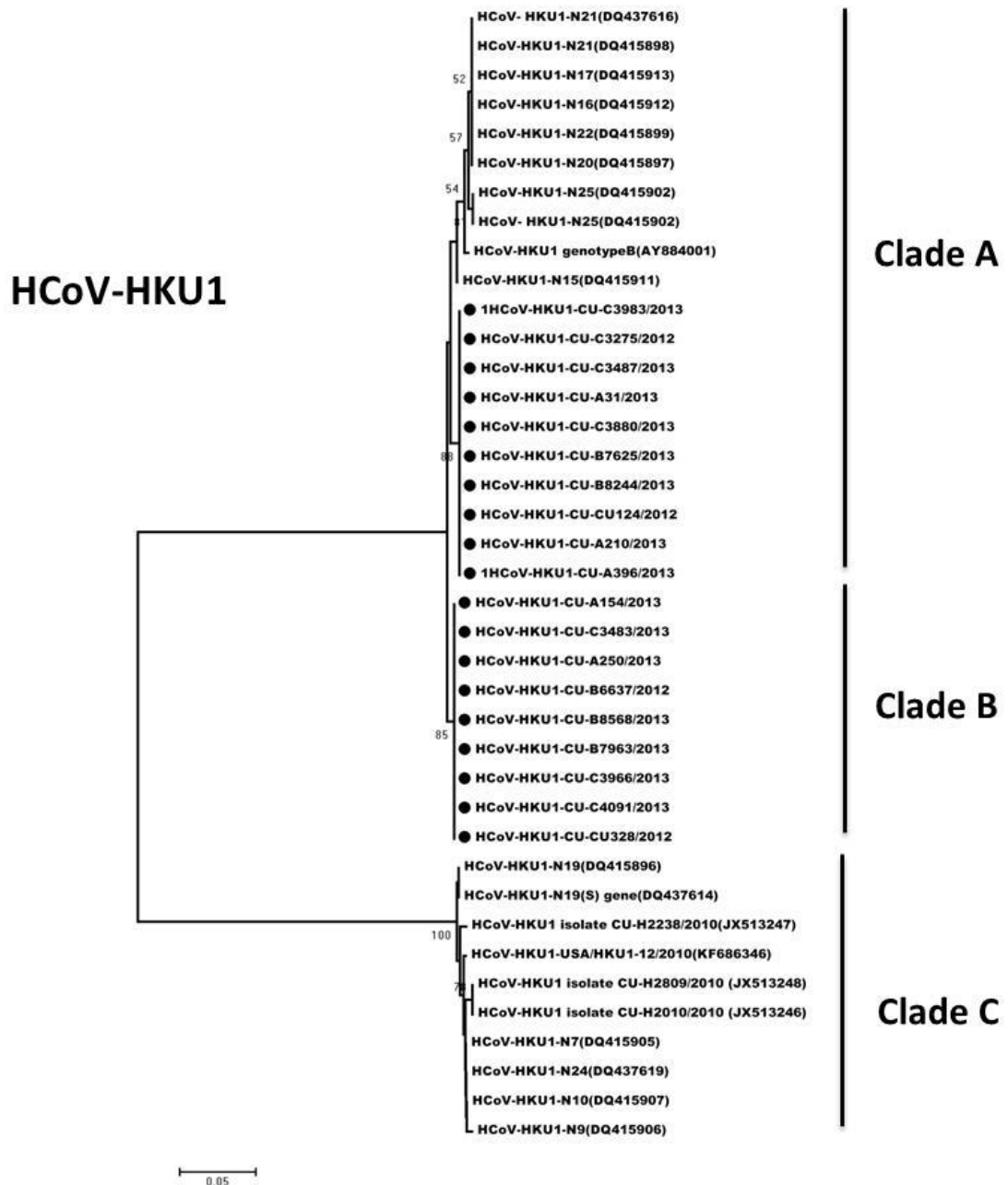
ภาพที่ 27: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-229E โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน *spike* ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-229E ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้



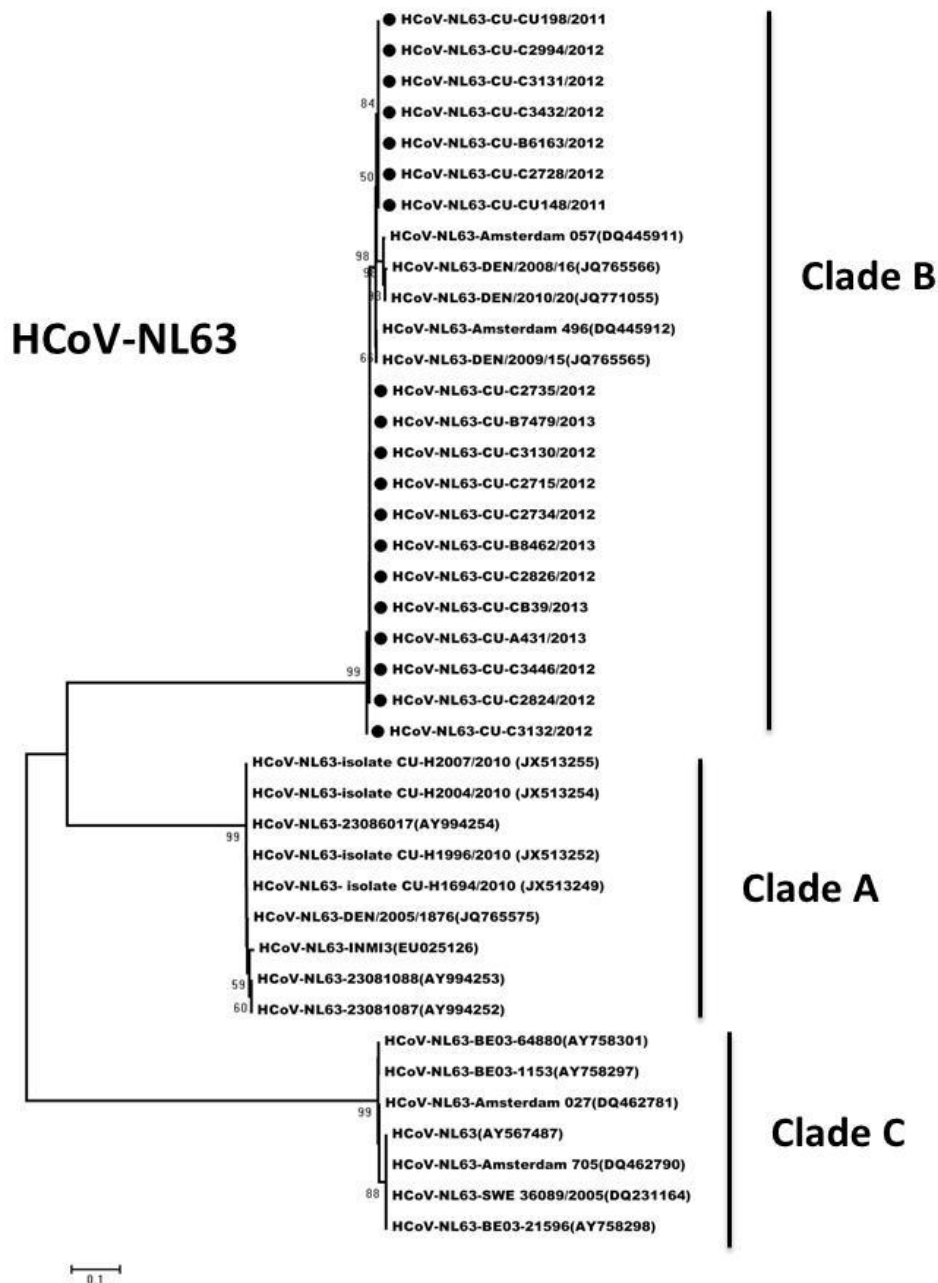
ภาพที่ 28: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-OC43 โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน *spike* ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-OC43 ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้



ภาพที่ 29: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-HKU1 โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน *spike* ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-HKU1 ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้

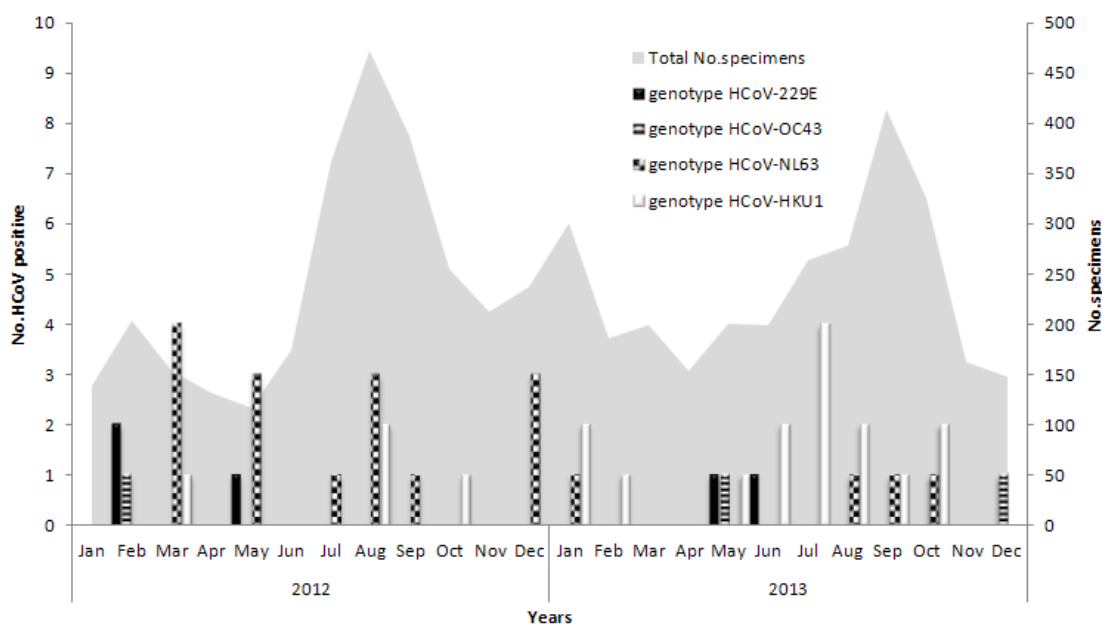


ภาพที่ 30: Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV-NL63 โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของยีน *spike* ของตัวอย่างที่พบในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เก็บในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) โดยที่ ● แทนตัวอย่าง HCoV-NL63 ที่ตรวจพบจากการศึกษานี้



13. ผลการวิเคราะห์การกระจายของเชื้อ HCoV แยกตามสายพันธุ์

จากการศึกษาความชุกของเชื้อ HCoV ในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 แล้วจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่พบว่ามีในแต่ละปีการกระจายตัวของแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสแตกต่างกันออกไป โดยสามารถจัดจำแนก HCoV ที่ศึกษาในครั้งนี้ออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ HCoV-229E 10.87% (5/46), HCoV-OC43 6.52% (3/46), HCoV-NL63 41.30 (19/46) และ HCoV-HKU1 41.30 (19/46) โดยจะพบว่าในปี ค.ศ. 2012 จะพบการกระจายตัวของสายพันธุ์ HCoV-NL63 มากที่สุด ส่วนในปี ค.ศ. 2013 จะพบการกระจายตัวของสายพันธุ์ HCoV-HKU1 มากที่สุด ส่วนการกระจายของสายพันธุ์อื่นๆ เช่นสายพันธุ์ HCoV-OC43 จะสามารถพบได้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ของปี ค.ศ. 2012 และสามารถพบได้ในช่วงเดือนพฤษภาคมและธันวาคมของปี ค.ศ. 2013 ส่วนสายพันธุ์ HCoV-229E จะสามารถพบได้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์และพฤษภาคมปี ค.ศ. 2012 และสามารถพบได้ในช่วงเดือนพฤษภาคมและมิถุนายนปี ค.ศ. 2013 ดังแสดงในภาพที่ 31

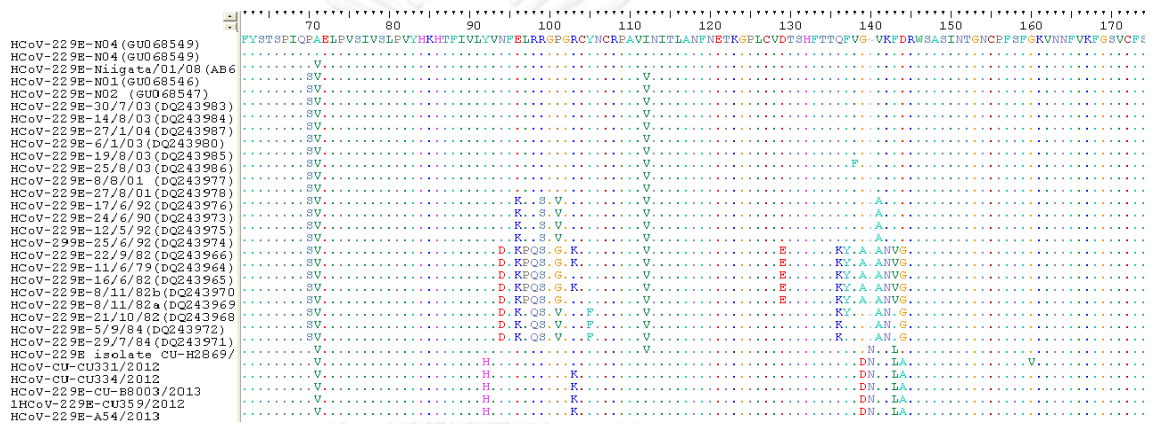


ภาพที่ 31: การกระจายตัวของเชื้อ HCoV สายพันธุ์ต่างๆ ตั้งแต่เดือนมกราคมปี ค.ศ. 2012- ธันวาคมปี ค.ศ. 2013

14. ผลการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน Spike

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อสายพันธุ์ HCoV-229E จำนวน 5 ตัวอย่างจากการศึกษาในครั้งนี้มาวิเคราะห์ถึงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน Spike โดยการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าขนาดของกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-229E คือ 990 อะมิโน โดยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-229E เป็น 96–100%

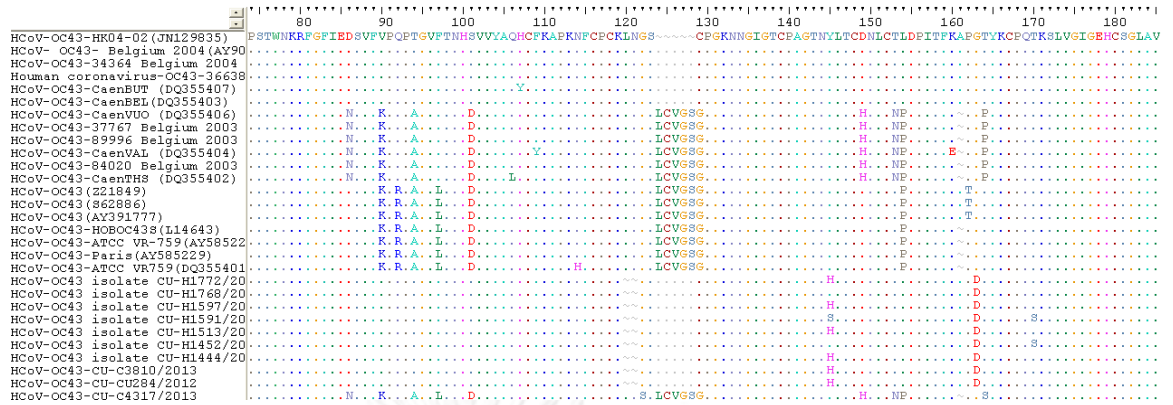
เมื่อวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับลำดับกรดอะมิโนเทียบกับสายพันธุ์ HCoV-229E อื่นๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้า พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Y92H, G193D, D144A และมีการเพิ่มเติมเข้ามาของ Asparagine (N) ในตำแหน่งที่ 140 ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-229E

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อสายพันธุ์ HCoV-OC43 จำนวน 3 ตัวอย่างจากการศึกษาในครั้งนี้มาวิเคราะห์ถึงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน Spike โดยการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าขนาดของกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-OC43 คือ 292 อะมิโน โดยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-OC43 เป็น 99–100%

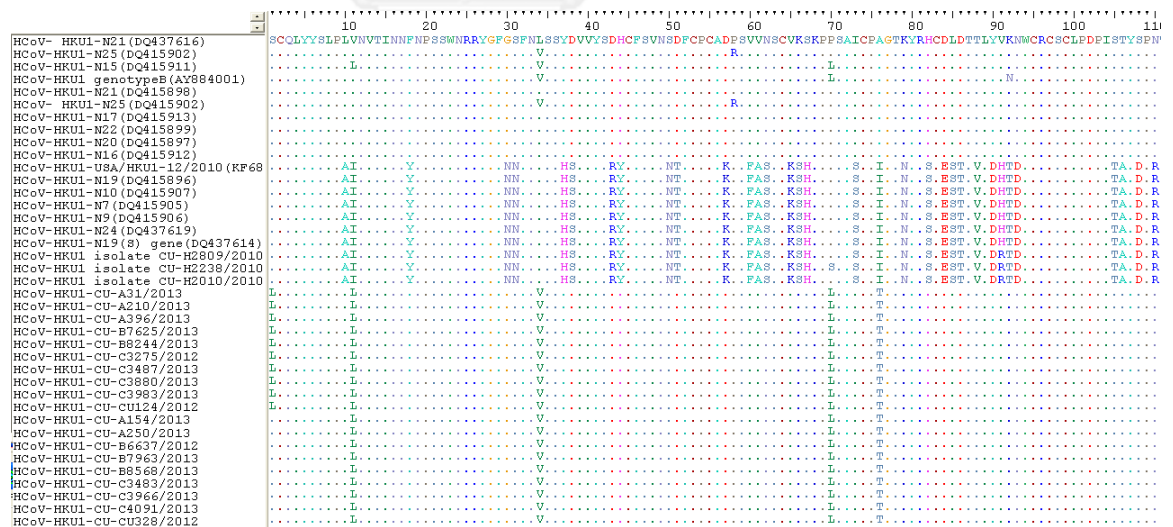
เมื่อวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับลำดับกรดอะมิโนเทียบกับสายพันธุ์ HCoV-OC43 อื่นๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้า พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Y145H และ G163D และมีตัวอย่าง CU-C4317 ที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ HCoV-OC43 ที่จัดอยู่ใน clade B ดังแสดงในภาพที่ 33



ภาพที่ 33: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-OC43

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อสายพันธุ์ HCoV-HKU1 จำนวน 19 ตัวอย่างจากการศึกษาในครั้งนี้ มาวิเคราะห์ถึงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน Spike โดยการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าขนาดของกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-HKU1 คือ 133 อะมิโน โดยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-HKU1 เป็น 98-100%

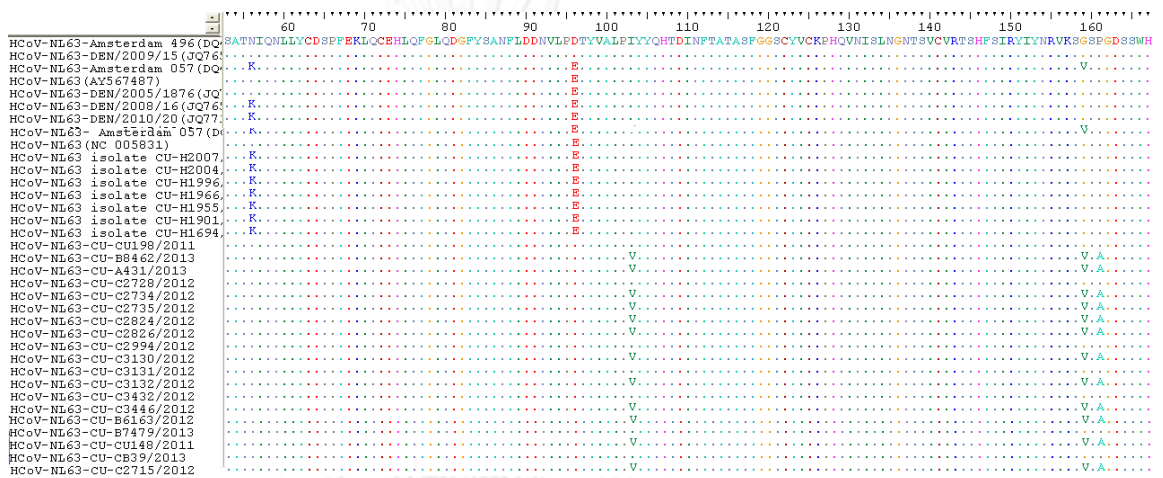
เมื่อวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับลำดับกรดอะมิโนเทียบกับสายพันธุ์ HCoV-HKU1 อื่นๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้า พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนดังนี้ S1L, V11L, L34V, P70L และ A76T ดังแสดงในภาพที่ 34



ภาพที่ 34: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-HKU1

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อสายพันธุ์ HCoV-NL63 จำนวน 19 ตัวอย่างจากการศึกษาในครั้งนี้ มาวิเคราะห์ถึงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณโปรตีน Spike โดยการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าขนาดของกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-NL63 คือ 257 อะมิโน โดยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนในสายพันธุ์ HCoV-NL63 เป็น 95–100%

เมื่อวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับลำดับกรดอะมิโนเทียบกับสายพันธุ์ HCoV-NL63 อื่นๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้า พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนดังนี้ I103V, G159V, และ P161A ดังแสดงในภาพที่ 35



ภาพที่ 35: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-NL63

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCoV มักเกิดจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน โดยมีการแสดงอาการของโรค เช่น โรคหวัดและหุ้ขึ้นกลางอกเสบเฉียบพลัน เชื้อ HCoV-NL63 พบว่าสัมพันธ์กับการเกิด croup (โรคที่มีการอักเสบของระบบทางเดินหายใจส่วนต้น (จมูกและลำคอ) ลงไปถึงทางเดินหายใจส่วนกลาง (กล่องเสียง ท่อลม และหลอดลม) ทำให้มีอาการไอเสียงแหบห้าว และหายใจลำบาก) ในเด็ก [73] เชื้อ HCoV 229E, OC43 และ HKU1 อาจทำให้เกิดอาการหลอดลมฝอยอักเสบเฉียบพลัน หรือปอดอักเสบได้แต่พบได้ไม่บ่อย [74, 75] ซึ่งผู้ที่ติดเชื้อ HCoV ส่วนใหญ่ในงานวิจัยนี้ก็มีอาการทางคลินิกที่คล้ายกับรายงานก่อนหน้า คือ มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน เช่น ไข้ ไอ มีเสมหะ มีน้ำมูก แต่จะมีส่วนน้อยที่เป็นอาการการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เช่น มีอาการหายใจลำบาก หรือมีความผิดปกติของเสียงหายใจ อาการปอดบวม เป็นต้น ส่วนในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ SARS-CoV จะมีอาการของกลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง ปอดบวมติดเชื้อซึ่งทำให้เกิดการเสียชีวิตได้สูง [36] สำหรับ HCoV อีกสายพันธุ์ที่พบการระบาดเมื่อไม่นานมานี้ในปี ค.ศ. 2012 นี้คือ MERS-CoV เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้ผู้ป่วยมีลักษณะของกลุ่มอาการระบบทางเดินหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน(Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) อย่างรุนแรง ตามความรุนแรงของภาวะขาดออกซิเจน นอกจากนี้ยังมีอาการไตวายร่วมด้วย [19] จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCoV นั้นสามารถเกิดอาการของโรคได้ตั้งแต่ลักษณะอาการไข้หวัดธรรมดาจนไปถึงอาการของกลุ่มระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันจนอาจทำให้เสียชีวิตได้ขึ้นอยู่กับว่าการติดเชื้อ HCoV นั้นเป็นสายพันธุ์ใด การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาถึงระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อให้ทราบถึงรูปแบบการระบาดรวมทั้งสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่มีการติดเชื้อในผู้ป่วยไทย รวมทั้งเป็นการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ MERS-CoV ในประเทศไทยอีกด้วย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาการติดเชื้อ HCoV โดยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจระดับโมเลกุลในตัวอย่างจากประชากรไทยในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 โดยใช้สิ่งส่งตรวจที่เป็น nasopharyngeal aspirate, nasal swab และ nasopharyngeal swab ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ส่งมาตรวจจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลศิรินคร โรงพยาบาลชลบุรี โรงพยาบาลในเครือบางปะกอก และโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น โดยเริ่มจากการเตรียม positive control ด้วยวิธี DNA cloning แล้วนำพลาสมิดที่ให้ผล positive ต่อ HCoV นั้นมาทดสอบความไว (sensitivity) ของ primer ที่ใช้ในการศึกษา โดยค่า sensitivity ช่วยบอกเราว่าการทดสอบนี้มีความสามารถในการค้นหาผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้ดีเพียงใด ยังมีค่า sensitivity มากก็ยิ่งมีความสามารถในการค้นหาผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้ดี ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความไวในการศึกษาต่อความ

เข้มข้นของพลาสมิดถึง $1 \times 10^1 \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$ ต่อทุกสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV นั้นหมายความว่าหากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาปริมาตร $1 \mu\text{l}$ มีปริมาณไวรัส (viral load) เพียงแค่ $1 \times 10^1 \mu\text{g}$ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ก็สามารถที่จะตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ ซึ่งการทดลองในส่วนนี้เป็นเพียงการยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ใช้นั้นมีความไวในการตรวจสอบเชื้อไวรัสมากหรือน้อยเท่าไรเมื่อใช้วิธี semi-nested PCR ต่อมาเมื่อทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer ที่ใช้ในการศึกษา พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้นั้นมีความจำเพาะในการตรวจสอบเฉพาะเชื้อ HCoV เท่านั้นเนื่องจากเมื่อนำมาใช้ทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อไวรัสตัวอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจในคน พบว่าตัวอย่างเหล่านั้นให้ผลที่เป็นลบ (negative) จึงสามารถสรุปได้เบื้องต้นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความไวและความจำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อ HCoV เท่านั้น

ผลการตรวจหาเชื้อ HCoV ในตัวอย่างโดยวิธี PCR นั้น พบว่ามี 46 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HCoV คิดเป็น 0.79 % จากตัวอย่างทั้งหมดทั้ง 5,833 ตัวอย่าง ซึ่งนับว่ามีความใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น ในประเทศจีน [62] พบความชุก 1% ประเทศอังกฤษ [8] พบความชุก 0.85% อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการพบความชุกของเชื้อในอัตราที่ต่ำเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา [7] พบความชุก 5% ประเทศสวีเดน [76] พบความชุก 6% ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย [12] พบความชุก 5.9% ซึ่งอัตราความชุกของเชื้อไวรัสที่พบมากกว่านี้อาจเป็นเนื่องมาจากประเภทของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและกฎเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาไม่ว่าจะเป็น อายุ อาการของโรค นอกจากนี้มีบางการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการคัดเลือกใช้ตัวอย่างของผู้ป่วยที่มีอาการปอดบวมร่วมด้วยมาใช้ในการวิเคราะห์ทำให้ผลการศึกษาค้นหาความชุกของเชื้อ HCoV มีอัตราที่สูงขึ้น ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ได้ศึกษาจากตัวอย่างในผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ (Influenza-like illness) เท่านั้นจึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้อัตราความชุกของเชื้อ HCoV จากงานวิจัยในครั้งนี้ต่ำกว่าที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย อีกทั้งการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยยังได้มีการคัดเลือกผู้ป่วยที่มีอายุไม่เกิน 5 ปีซึ่งเป็นช่วงอายุที่พบการติดเชื้อ HCoV ได้มากที่สุดมาใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวอย่างที่ใช้ศึกษาจึงอาจจะทำให้ความชุกในการศึกษาเชื้อ HCoV นั้นสูงกว่างานวิจัยในครั้งนี้ได้

สำหรับประเภทของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาก็มีความสำคัญในแง่ของปริมาณไวรัสเนื่องจากตัวอย่างที่เป็น nasopharyngeal aspirate นั้นเป็นตัวอย่างที่มีคุณภาพดีสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส เพราะมีปริมาณของเชื้อไวรัสที่สูงในตัวอย่างตรวจ อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บตัวอย่างประเภทนี้ผู้ป่วยจะได้รับความเจ็บปวดมากกว่าการเก็บตัวอย่างประเภท nasopharyngeal swab และ nasal swab จึงทำให้ตัวอย่างประเภท nasopharyngeal aspirate 10.92% (637/5,833) มีจำนวนน้อยกว่าตัวอย่างประเภท nasopharyngeal swab 89.08% (5,196/5,833) โดยจากผลการศึกษาค้นต้นพบว่าตัวอย่างประเภท nasopharyngeal aspirate มีอัตราความชุกของเชื้อ HCoV 1.41% ส่วนตัวอย่าง

ประเภท nasopharyngeal swab มีอัตราความชุกของเชื้อ HCoV 0.71% เนื่องจากการเก็บตัวอย่างในรูปแบบ nasopharyngeal aspirate ผู้เก็บตัวอย่างจะต้องมีความชำนาญและมีทักษะในการเก็บจึงจะทำให้เก็บตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นถึงแม้จะมีจำนวนตัวอย่าง nasopharyngeal aspirate ที่น้อยกว่าตัวอย่างประเภท nasopharyngeal swab แต่ก็มีอัตราความชุกของเชื้อในตัวอย่าง nasopharyngeal aspirate ที่มากกว่า

จากผลการวิเคราะห์เพศและอายุของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ HCoV พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นผู้ชายมากกว่าผู้หญิงโดยคิดเป็นอัตราส่วน 1.08:1 (26:20) อย่างไรก็ตามอัตราส่วนที่พบนั้นยังแตกต่างกันไม่มากนัก ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้ไม่ว่าจะเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MERS-CoV [77] ก็ม้อัตราส่วนการติดเชื้อในผู้ชายสูงกว่าในผู้หญิงเช่นกัน แต่ในปัจจุบันก็ยังไม่มีการอธิบายหรือรายงานใดที่อธิบายถึงเหตุผลว่าเพราะเหตุใดในเพศชายจึงมีอัตราส่วนในการติดเชื้อ HCoV ได้มากกว่าในเพศหญิง สำหรับช่วงอายุที่พบการติดเชื้อ HCoV ในจำนวนที่สูงนั้นเมื่อเทียบอัตราส่วนของจำนวนตัวอย่างในช่วงอายุนั้นๆ ต่อจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อเชื้อ HCoV นั้นพบว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 60 ปี พบการติดเชื้อ HCoV สูงที่สุด (1.76%) รองลงมาคือ ช่วงอายุน้อยกว่า 5 ปี (1.14%) แต่เมื่อดูจำนวนที่พบตัวอย่างที่ให้ผล positive ต่อ HCoV เพียงอย่างเดียวโดยไม่นำมาเทียบกับจำนวนตัวอย่างในช่วงอายุนั้นๆ กลับพบว่าตัวอย่างในช่วงอายุน้อยกว่า 5 ปี ให้ผล positive ต่อเชื้อ HCoV มากที่สุดโดยมีจำนวน 25/46 (54.35%) รองลงมาคือตัวอย่างในช่วงอายุมากกว่า 60 ปี ให้ผล positive จำนวน 7/46 (15.22%) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าช่วงอายุดังกล่าวมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะติดเชื้อ HCoV ได้อาจเนื่องมาจากในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปีนั้นไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อจึงทำให้ติดเชื้อได้ง่ายกว่า หรือระบบภูมิคุ้มกันของผู้สูงอายุอาจจะมีประสิทธิภาพลดลงทำให้ติดเชื้อได้ง่ายขึ้น [78] หรืออาจเป็นเพราะเชื้อ HCoV นั้นก็มีหลายสายพันธุ์เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ทำให้แม้จะมี neutralizing antibody ที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อตามธรรมชาติของสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งก็ไม่มีผลป้องกันการเกิดโรคข้ามไปยังสายพันธุ์ใหม่ๆ ของเชื้อ HCoV ดังเช่นในงานวิจัยนี้ พบว่าผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 60 ปี ส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อ HCoV-NL63 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่งมีรายงานมาเร็วๆ นี้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่มีอายุสูงนี้จะเกิดการติดเชื้อ HCoV ได้ง่ายเพราะเหตุผลดังกล่าวข้างต้น

จากการศึกษาการติดเชื้อ HCoV ในช่วงเวลาสองปีที่ผ่านมาในประเทศไทย พบว่าเชื้อ HCoV มีการระบาดหรือมีความชุกของการติดเชื้อมากในช่วงฤดูฝนถึงต้นฤดูหนาว และจะพบความชุกของเชื้อได้น้อยในช่วงฤดูร้อนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าความชุกของการติดเชื้อ HCoV จะอยู่ในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว [8, 54, 61, 62] ในปี ค.ศ. 2012 ประเทศไทยพบความชุกของเชื้อ HCoV ในเดือนมีนาคม พฤษภาคม และสิงหาคมหรือช่วงฤดูฝนและต้นฤดูร้อน แต่เนื่องจากสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันมีความเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาโดยจะเห็นได้จากช่วงเดือนมีนาคมได้เกิดปรากฏการณ์อากาศหนาวกลางฤดูร้อนทำให้อากาศเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน อุณหภูมิลดลงอย่าง

รวดเร็วอาจเป็นสาเหตุให้ในช่วงเดือนมีนาคมมีการพบความชุกของเชื้อ HCoV ได้ค่อนข้างมาก [79] ส่วนในปี ค.ศ. 2013 ประเทศไทยจะพบความชุกของเชื้อ HCoV ในเดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคม ซึ่งก็คือช่วงฤดูฝนที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศลักษณะนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อไวรัสหลายชนิดสามารถแพร่ระบาดได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น [80] จึงอาจกล่าวได้ว่าทั้งสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศมีความสัมพันธ์กับการระบาดของเชื้อไวรัสได้ โดยสภาพภูมิประเทศก็อาจมีผลต่อสัดส่วนของสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่พบในแต่ละประเทศได้ เนื่องจากในแต่ละประเทศมีอัตราการระบาดของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการจัดจำแนก HCoV ออกเป็นกลุ่มของแอลฟา (α) โคโรนาไวรัสและกลุ่มที่ 2 บีตา (β) โคโรนาไวรัส นั้นอาศัยข้อมูลจากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนในยีน *RdRp* ที่มีขึ้นส่วนของยีนประมาณ 816 bp โดยยึดตามหลักของ RdRp-based grouping units (RGU) ที่กำหนดไว้ว่าถ้าหาก amino acid distance $>4.8-6.3\%$ จะจัดเป็น HCoV ที่อยู่ในกลุ่มแอลฟา (α) โคโรนาไวรัส แต่ถ้า amino acid distance $> 6.3\%$ จะจัดเป็น HCoV ที่อยู่ในกลุ่ม บีตา (β) โคโรนาไวรัส [81] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้นั้นได้ทำการศึกษาถึงความชุกของเชื้อโดยจำแนกออกเป็นกลุ่มและสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าในแต่ละปี การกระจายตัวของแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสแตกต่างกันออกไป โดยจะพบว่าในปี ค.ศ. 2012 พบการกระจายตัวของสายพันธุ์ HCoV-NL63 มากที่สุด ส่วนในปี ค.ศ. 2013 พบการกระจายตัวของสายพันธุ์ HCoV-HKU1 มากที่สุด สำหรับการกระจายของสายพันธุ์อื่นๆ เช่นสายพันธุ์ HCoV-OC43 สามารถพบได้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ของปี ค.ศ. 2012 และสามารถพบได้ในช่วงเดือนพฤษภาคมและธันวาคมของปี ค.ศ. 2013 ส่วนสายพันธุ์ HCoV-229E จะสามารถพบได้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์และพฤษภาคมปี ค.ศ. 2012 และสามารถพบได้ในช่วงเดือนพฤษภาคมและมิถุนายนปี ค.ศ. 2013 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าในการศึกษาครั้งนี้พบความชุกของเชื้อ HCoV สายพันธุ์ HCoV-NL63 และ HCoV-HKU1 มากที่สุด รองลงมาคือ HCoV-229E และ HCoV-OC43 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาในประเทศฝรั่งเศสที่พบความชุกของสายพันธุ์ HCoV-HKU1 มากที่สุด และการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่พบความชุกของสายพันธุ์ HCoV-NL63 มากที่สุด [82] อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Ren, L. และคณะ [62] ได้ศึกษาในประชากรจีนพบว่ามีความชุกของสายพันธุ์ HCoV-OC43 มากที่สุด Dare, R. และคณะ [12] ได้ศึกษาในประชากรไทยในช่วงปี 2003-2005 พบว่ามีความชุกของสายพันธุ์ HCoV-OC43 มากที่สุด ซึ่งสาเหตุของความชุกในแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันอาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย อาจเป็นเพราะสภาพภูมิประเทศและสภาพภูมิอากาศของแต่ละประเทศที่แตกต่างกันทำให้ไวรัสแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการแพร่ระบาดได้แตกต่างกัน หรือความชุกในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่พบนั้นมีปัจจัยทางด้านปริมาณของ receptor ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ อาจเป็นไปได้ว่าในปี 2012-2013 ที่ผ่านมามีผู้ป่วยที่เป็นประชากรไทยที่ทำการศึกษามีปริมาณของ receptor ACE2 ที่

จำเพาะต่อโปรตีน spike ในสายพันธุ์ HCoV-NL63 และปริมาณของ receptor Neu5,9Ac2-containing moiety ที่จำเพาะต่อโปรตีน spike ในสายพันธุ์ HCoV-HKU1 จึงทำให้พบการติดเชื้อด้วยสายพันธุ์ HCoV-NL63 และ HCoV-HKU1 มีอัตราที่สูง เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของ HCoV ที่ศึกษาได้แล้วจึงนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ทาง phylogenetic tree เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่ศึกษาในครั้งนี้เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลที่มีความสัมพันธ์กันอย่างไร ซึ่งศึกษาโดยอาศัยข้อมูลจากยีน spike ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ผลปรากฏว่าในกลุ่มสายพันธุ์ HCoV-OC43 ตัวอย่างที่ศึกษาจัดอยู่ใน clade C จำนวน 2 ตัวอย่าง และ clade B จำนวน 1 ตัวอย่าง แต่ยังไม่พบรายงานของข้อมูลในฐานข้อมูลมากนัก HCoV-OC43 มีสองตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ศึกษาในประเทศญี่ปุ่นส่วนในสายพันธุ์ HCoV-229E นั้นได้มีการจัดจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์ตามปีที่มีการค้นพบเนื่องจากข้อมูลทางด้านพันธุกรรมมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอด [83] และตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้จำนวน 5 ตัวอย่างพบว่ามีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ HCoV-229E ที่มีการศึกษาในช่วงปี ค.ศ. 2008-2013 สำหรับสายพันธุ์ HCoV-HKU1 จัดออกเป็น 3 clade คือ clade A, B และ C โดยตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ clade A จำนวน 13 ตัวอย่างและ clade B จำนวน 6 ตัวอย่าง สุดท้ายในสายพันธุ์ HCoV-NL63 ถูกจัดความสัมพันธ์ออกเป็น 3 clade เช่นกันนั่นคือ clade A, B และ C และอาจมีการเพิ่มเติมของ clade R ซึ่งเกิดจากการรวมกลุ่มกันของ clade A และ C โดยตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ clade B ทั้งหมด 19 ตัวอย่าง

เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-229E ที่ได้จากการศึกษาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนไปบางตำแหน่งแต่ก็ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการศึกษาในช่วงปี 2008-2013 และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ศึกษาในประเทศญี่ปุ่นและในประเทศไทยก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มเข้ามา (insert) ของกรดอะมิโน Asparagine ที่ตำแหน่ง 140 ที่มีความเหมือนกับตัวอย่างที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยในช่วงปี 2009-2011 ส่วนการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ HCoV-OC43 พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับตัวอย่างที่เคยศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศที่จัดอยู่ใน clade A แต่มีเพียงหนึ่งตัวอย่างที่มีลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายกับตัวอย่างที่เคยศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศแถบทวีปยุโรป ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าตัวอย่างนี้อาจจะได้รับการติดเชื้อจากประเทศในแถบทวีปยุโรป ส่วนสายพันธุ์ HCoV-HKU1 มีการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนแล้วพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนไปบางตำแหน่ง แต่ส่วนใหญ่แล้วจะคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนที่จัดอยู่ใน clade A และ clade B ส่วนสายพันธุ์ HCoV-NL63 จะมีการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับตัวอย่างที่มีการศึกษาก่อนหน้าก็ไม่พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนมากนัก ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า HCoV ที่จัดอยู่ในกลุ่มแอลฟา (α) โคโรนาไวรัสจะมีการกลายพันธุ์ที่น้อยกว่ากลุ่มบีตา (β) โคโรนาไวรัส

โดยสรุปแล้วการศึกษานี้ได้รายงานถึงระบาดวิทยาของเชื้อ HCoV ในรูปแบบของการวิเคราะห์ด้าน อายุ เพศ ฤดูกาลในการติดเชื้อ สายพันธุ์ของเชื้อ HCoV ที่พบในการศึกษาและแนวโน้มการระบาดของเชื้อในปีที่ศึกษา และที่สำคัญในช่วงปี ค.ศ. 2012-2013 ที่ผ่านมาพบการระบาดของเชื้อ MERS-CoV ในประเทศแถบตะวันออกกลาง งานวิจัยนี้จึงดำเนินการเพื่อศึกษาถึงการระบาดของ MERS-CoV ในประเทศไทยด้วย แต่จากผลการศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดไม่พบว่าตัวอย่างใดให้ผล positive ต่อ MERS-CoV ดังนั้นสถานการณ์การระบาดของเชื้อ MERS-CoV ในประเทศไทยจึงยังไม่ได้รับรายงาน จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้จึงคาดหวังว่าจะช่วยให้ผู้ที่สนใจที่จะศึกษาเชื้อ HCoV มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ในประเทศไทยได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ปัจจุบันยังไม่มียารักษาผู้ป่วยหรือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีพอในการป้องกันการติดเชื้อ HCoV ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจึงเป็นประโยชน์ในแง่ของการเฝ้าระวังการระบาดของโรคและป้องกันการติดเชื้อ HCoV ในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี และในผู้สูงอายุ อย่างไรก็ตามในอนาคตข้อมูลนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนไวรัสและผลิตวัคซีนสำหรับเชื้อ HCoV ต่อไป

รายการอ้างอิง

- [1] Bulla, A., Hitze, K. L. Acute Respiratory Infections: A Review. Bull World Health Organ. 1978;56:481-98.
- [2] Corman, V. M., Kallies, R., Philipps, H., et al. Characterization of a Novel Betacoronavirus Related to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in European Hedgehogs. Journal of virology. 2014;88:717-24.
- [3] Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., Fouchier, R. A. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med. 2012;367:1814-20.
- [4] Zhou, N., Zhang, Y., Zhang, J. C., Feng, L., Bao, J. K. The Receptor Binding Domain of Mers-Cov: The Dawn of Vaccine and Treatment Development. Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi. 2013.
- [5] Vijaykrishna, D., Smith, G. J., Zhang, J. X., Peiris, J. S., Chen, H., Guan, Y. Evolutionary Insights into the Ecology of Coronaviruses. Journal of virology. 2007;81:4012-20.
- [6] Lai, M. M., Cavanagh, D. The Molecular Biology of Coronaviruses. Adv Virus Res. 1997;48:1-100.
- [7] Dominguez, S. R., Robinson, C. C., Holmes, K. V. Detection of Four Human Coronaviruses in Respiratory Infections in Children: A One-Year Study in Colorado. Journal of medical virology. 2009;81:1597-604.
- [8] Gaunt, E. R., Hardie, A., Claas, E. C., Simmonds, P., Templeton, K. E. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229e, Hku1, NL63, and Oc43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time Pcr Method. J Clin Microbiol. 2010;48:2940-7.
- [9] Tai, D. Y. Pharmacologic Treatment of Sars: Current Knowledge and Recommendations. Annals of the Academy of Medicine, Singapore. 2007;36:438-43.
- [10] Guan, Y., Peiris, J. S., Zheng, B., et al. Molecular Epidemiology of the Novel Coronavirus That Causes Severe Acute Respiratory Syndrome. Lancet. 2004;363:99-104.
- [11] Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., et al. Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. Science. 2003;300:1394-9.

- [12] Dare, R. K., Fry, A. M., Chittaganpitch, M., Sawanpanyalert, P., Olsen, S. J., Erdman, D. D. Human Coronavirus Infections in Rural Thailand: A Comprehensive Study Using Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. The Journal of infectious diseases. 2007;196:1321-8.
- [13] Theamboonlers, A., Samransamruajkit, R., Thongme, C., Amonsin, A., Chongsrisawat, V., Poovorawan, Y. Human Coronavirus Infection among Children with Acute Lower Respiratory Tract Infection in Thailand. Intervirology. 2007;50:71-7.
- [14] Brian, D. A., Baric, R. S. Coronavirus Genome Structure and Replication. Current topics in microbiology and immunology. 2005;287:1-30.
- [15] Cheng, V. C., Lau, S. K., Woo, P. C., Yuen, K. Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus as an Agent of Emerging and Reemerging Infection. Clinical microbiology reviews. 2007;20:660-94.
- [16] Pasternak, A. O., Spaan, W. J., Snijder, E. J. Nidovirus Transcription: How to Make Sense...? The Journal of general virology. 2006;87:1403-21.
- [17] Winter, C., Herrler, G. [About Bats, Viruses and Humans: Coronaviruses on the Rise?]. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift. 2013;126:509-13.
- [18] Al-Tawfiq, J. A., Memish, Z. A. Emerging Respiratory Viral Infections: Mers-Cov and Influenza. The lancet Respiratory medicine. 2014;2:23-5.
- [19] Mers-Cov - Eastern Mediterranean [Internet]. 2014. Available from: <http://www.promedmail.org/>.
- [20] Tobler, K., Ackermann, M. [Identification and Characterization of New and Unknown Coronaviruses Using Rt-Pcr and Degenerate Primers]. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde. 1996;138:80-6.
- [21] Bartlam, M., Xu, Y., Rao, Z. Structural Proteomics of the Sars Coronavirus: A Model Response to Emerging Infectious Diseases. Journal of structural and functional genomics. 2007;8:85-97.
- [22] van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., et al. Identification of a New Human Coronavirus. Nature medicine. 2004;10:368-73.
- [23] Knudsen, T. B., Kledal, T. N., Andersen, O., Eugen-Olsen, J., Kristiansen, T. B. Severe Acute Respiratory Syndrome--a New Coronavirus from the Chinese Dragon's Lair. Scandinavian journal of immunology. 2003;58:277-84.
- [24] Josset, L., Menachery, V. D., Gralinski, L. E., et al. Cell Host Response to Infection with Novel Human Coronavirus Emc Predicts Potential Antivirals and Important Differences with Sars Coronavirus. mBio. 2013;4:e00165-13.

- [25] Brown, D. The Encyclopedia of Virology Plus. Trends Biochem Sci. 1997;22:34-5.
- [26] Epidemiologists Trying to Track Down Novel Coronavirus [Online] [Internet]. 2012. Available from: <http://scitechdaily.com/epidemiologists-trying-to-track-down-novel-coronavirus/>.
- [27] Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Morphology [Internet]. 2011. Available from: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/764.html.
- [28] Gump, D. W., Phillips, C. A., Forsyth, B. R., McIntosh, K., Lamborn, K. R., Stouch, W. H. Role of Infection in Chronic Bronchitis. Am Rev Respir Dis. 1976;113:465-74.
- [29] Lauber, C., Gorbalenya, A. E. Partitioning the Genetic Diversity of a Virus Family: Approach and Evaluation through a Case Study of Picornaviruses. Journal of virology. 2012;86:3890-904.
- [30] Cruz, J. L., Becares, M., Sola, I., Oliveros, J. C., Enjuanes, L., Zuniga, S. Alphacoronavirus Protein 7 Modulates Host Innate Immune Response. Journal of virology. 2013;87:9754-67.
- [31] Druce, J., Tran, T., Kelly, H., et al. Laboratory Diagnosis and Surveillance of Human Respiratory Viruses by Pcr in Victoria, Australia, 2002-2003. Journal of medical virology. 2005;75:122-9.
- [32] Moes, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., et al. A Novel Pancoronavirus Rt-Pcr Assay: Frequent Detection of Human Coronavirus NL63 in Children Hospitalized with Respiratory Tract Infections in Belgium. BMC infectious diseases. 2005;5:6.
- [33] Coronavirus Humains [Internet]. 2005. Available from: http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/vir/e-docs/00/04/10/FF/article.phtml?fichier=images.htm.
- [34] Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., Whittaker, G. R. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. Viruses. 2012;4:1011-33.
- [35] Sampath, R., Hofstadler, S. A., Blyn, L. B., et al. Rapid Identification of Emerging Pathogens: Coronavirus. Emerging infectious diseases. 2005;11:373-9.
- [36] Ng, L. F., Hibberd, M. L., Ooi, E. E., et al. A Human in Vitro Model System for Investigating Genome-Wide Host Responses to Sars Coronavirus Infection. BMC infectious diseases. 2004;4:34.
- [37] Wang, J. T., Chang, S. C. Severe Acute Respiratory Syndrome. Current opinion in infectious diseases. 2004;17:143-8.

- [38] Navas-Martin, S., Weiss, S. R. Sars: Lessons Learned from Other Coronaviruses. Viral immunology. 2003;16:461-74.
- [39] The Life Cycle of Sars-Cov in Host Cells. [Internet]. 2009. Available from: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n3/full/nrmicro2090.html>.
- [40] Aita, T., Kuwabara, M., Murayama, K., et al. Characterization of Epidemic Diarrhea Outbreaks Associated with Bovine Torovirus in Adult Cows. Archives of virology. 2012;157:423-31.
- [41] Gonzalez, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L. A Comparative Sequence Analysis to Revise the Current Taxonomy of the Family Coronaviridae. Archives of virology. 2003;148:2207-35.
- [42] Buscho, R. O., Saxtan, D., Shultz, P. S., Finch, E., Mufson, M. A. Infections with Viruses and Mycoplasma Pneumoniae During Exacerbations of Chronic Bronchitis. The Journal of infectious diseases. 1978;137:377-83.
- [43] Greenberg, S. B. Update on Rhinovirus and Coronavirus Infections. Semin Respir Crit Care Med. 2011;32:433-46.
- [44] Borucki, M. K., Allen, J. E., Chen-Harris, H., et al. The Role of Viral Population Diversity in Adaptation of Bovine Coronavirus to New Host Environments. PLoS one. 2013;8:e52752.
- [45] Fouchier, R. A., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., et al. A Previously Undescribed Coronavirus Associated with Respiratory Disease in Humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101:6212-6.
- [46] Vabret, A., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J., Freymuth, F. An Outbreak of Coronavirus Oc43 Respiratory Infection in Normandy, France. Clin Infect Dis. 2003;36:985-9.
- [47] Wang, N., Shi, X., Jiang, L., et al. Structure of Mers-Cov Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Human Receptor Dpp4. Cell research. 2013;23:986-93.
- [48] Rezza, G. Prevention and Control of Emerging Infections: A Challenge for the 3rd Millennium. The new microbiologica. 2007;30:358-61.
- [49] Abdel-Moneim, A. S. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Mers-Cov): Evidence and Speculations. Archives of virology. 2014.
- [50] Haagmans, B. L., Al Dhahiry, S. H., Reusken, C. B., et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Dromedary Camels: An Outbreak Investigation. The Lancet infectious diseases. 2014;14:140-5.

- [51] Reusken, C. B., Haagmans, B. L., Muller, M. A., et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Neutralising Serum Antibodies in Dromedary Camels: A Comparative Serological Study. The Lancet infectious diseases. 2013;13:859-66.
- [52] Lu, L., Liu, Q., Du, L., Jiang, S. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Mers-Cov): Challenges in Identifying Its Source and Controlling Its Spread. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2013;15:625-9.
- [53] Coronavirus Infection of the Central Nervous System: Host-Virus Stand-Off [Internet]. 2006. Available from: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n2/full/nrmicro1343.html>.
- [54] Talbot, H. K., Crowe, J. E., Jr., Edwards, K. M., et al. Coronavirus Infection and Hospitalizations for Acute Respiratory Illness in Young Children. Journal of medical virology. 2009;81:853-6.
- [55] Pyrc, K., Sims, A. C., Dijkman, R., et al. Culturing the Unculturable: Human Coronavirus Hku1 Infects, Replicates, and Produces Progeny Virions in Human Ciliated Airway Epithelial Cell Cultures. Journal of virology. 2010;84:11255-63.
- [56] Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., et al. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. Journal of virology. 1999;73:152-60.
- [57] Bermingham, A., Chand, M. A., Brown, C. S., et al. Severe Respiratory Illness Caused by a Novel Coronavirus, in a Patient Transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. Euro Surveill. 2012;17:20290.
- [58] Lu, L., Liu, Q., Zhu, Y., et al. Structure-Based Discovery of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion Inhibitor. Nature communications. 2014;5:3067.
- [59] Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., et al. Human (Non-Severe Acute Respiratory Syndrome) Coronavirus Infections in Hospitalised Children in France. J Paediatr Child Health. 2008;44:176-81.
- [60] Dominguez, S. R., Sims, G. E., Wentworth, D. E., et al. Genomic Analysis of 16 Colorado Human NL63 Coronaviruses Identifies a New Genotype, High Sequence Diversity in the N-Terminal Domain of the Spike Gene and Evidence of Recombination. The Journal of general virology. 2012;93:2387-98.
- [61] Lau, S. K., Woo, P. C., Yip, C. C., et al. Coronavirus Hku1 and Other Coronavirus Infections in Hong Kong. J Clin Microbiol. 2006;44:2063-71.

- [62] Ren, L., Gonzalez, R., Xu, J., et al. Prevalence of Human Coronaviruses in Adults with Acute Respiratory Tract Infections in Beijing, China. Journal of medical virology. 2011;83:291-7.
- [63] Lee, W. J., Chung, Y. S., Yoon, H. S., Kang, C., Kim, K. Prevalence and Molecular Epidemiology of Human Coronavirus Hku1 in Patients with Acute Respiratory Illness. Journal of medical virology. 2013;85:309-14.
- [64] Kon, M., Watanabe, K., Tazawa, T., et al. Detection of Human Coronavirus NL63 and OC43 in Children with Acute Respiratory Infections in Niigata, Japan, between 2010 and 2011. Jpn J Infect Dis. 2012;65:270-2.
- [65] Stanek, L. [Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Applications in Molecular Pathology]. Ceskoslovenska patologie. 2013;49:119-21.
- [66] Principle of the Pcr [Internet]. 1999. Available from: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- [67] Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction [Internet]. 2014. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction.
- [68] Collecting Vacuum-Assisted Nasopharyngeal Aspirates (Npas) [Internet]. 2014. Available from: <http://www.nhspathology.fph.nhs.uk/Core-Service/Test-Directory/microbiology/CollectingVacuumAssisted.aspx>.
- [69] Nasopharyngeal Culture [Internet]. 2011. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9687.htm>.
- [70] Mobius, N., Hille, K., Verspohl, J., Wefstaedt, P., Kreienbrock, L. Owner-Collected Swabs of Pets: A Method Fit for the Purpose of Zoonoses Research. Epidemiology and infection. 2013;141:1892-6.
- [71] Corman, V. M., Eckerle, I., Bleicker, T., et al. Detection of a Novel Human Coronavirus by Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. Euro Surveill. 2012;17.
- [72] Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med. 2003;348:1967-76.
- [73] Koetz, A., Nilsson, P., Linden, M., van der Hoek, L., Ripa, T. Detection of Human Coronavirus NL63, Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus in Children with Respiratory Tract Infections in South-West Sweden. Clin Microbiol Infect. 2006;12:1089-96.

- [74] Vabret, A., Mouthon, F., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J., Freymuth, F. Direct Diagnosis of Human Respiratory Coronaviruses 229e and Oc43 by the Polymerase Chain Reaction. J Virol Methods. 2001;97:59-66.
- [75] Sloots, T. P., McErlean, P., Speicher, D. J., Arden, K. E., Nissen, M. D., Mackay, I. M. Evidence of Human Coronavirus Hku1 and Human Bocavirus in Australian Children. J Clin Virol. 2006;35:99-102.
- [76] McIntosh, K., Chao, R. K., Krause, H. E., Wasil, R., Mocega, H. E., Mufson, M. A. Coronavirus Infection in Acute Lower Respiratory Tract Disease of Infants. The Journal of infectious diseases. 1974;130:502-7.
- [77] Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Mers-Cov) – Update [Internet]. 2014. Available from: http://www.who.int/csr/don/2014_02_07mers/en/.
- [78] Reguera, J., Santiago, C., Mudgal, G., Ordone, D., Enjuanes, L., Casasnovas, J. M. Structural Bases of Coronavirus Attachment to Host Aminopeptidase N and Its Inhibition by Neutralizing Antibodies. PLoS pathogens. 2012;8:e1002859.
- [79] Karsch-Volk, M., Barrett, B., Kiefer, D., Bauer, R., Ardjomand-Woelkart, K., Linde, K. Echinacea for Preventing and Treating the Common Cold. The Cochrane database of systematic reviews. 2014;2:CD000530.
- [80] Allan, G. M., Arroll, B. Prevention and Treatment of the Common Cold: Making Sense of the Evidence. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 2014;186:190-9.
- [81] Drexler, J. F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., et al. Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses Based on Partial Rna-Dependent Rna Polymerase Gene Sequences. Journal of virology. 2010;84:11336-49.
- [82] Litwin, C. M., Bosley, J. G. Seasonality and Prevalence of Respiratory Pathogens Detected by Multiplex Pcr at a Tertiary Care Medical Center. Archives of virology. 2013.
- [83] Chibo, D., Birch, C. Analysis of Human Coronavirus 229e Spike and Nucleoprotein Genes Demonstrates Genetic Drift between Chronologically Distinct Strains. The Journal of general virology. 2006;87:1203-8.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

1. Phosphate buffered saline (PBS) ตวง phosphate buffer saline สำเร็จรูป ชนิดผงจำนวน 9.88 g จากนั้นเติมน้ำกลั่น (distilled water) จนมีปริมาตร 1,000 ml แล้วจึงนำไปผ่านการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. Viral transport medium (VTM) สำหรับ 500 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
1. Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	5.35 g
2. Lactalbumin hydrolysate	1.25 g
3. 10% Glycerol 5	50 ml
4. 200 U/ml Penicilin + 200 mg/ml Streptomycin	10 ml
5. Polymycin B sulfate (1,000 U)	500 µl
6. Nystacin (5,000 U)	25 µl
7. 40 mg/ml Gentamycin 1	15.625 ml

เมื่อเตรียมสารต่างๆ ได้ตามปริมาตรที่ต้องการแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตร 500 ml จากนั้นจึงนำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 µm ก่อนนำไปใช้

การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัด RNA

1. DEPC เป็นน้ำที่ไม่มีเอนไซม์ RNase เตรียมได้โดยเติม 0.1% DEPC ในน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave

2. 95% Ethanol เตรียมโดยตวง absolute ethanol มา 95 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml

3. Wash buffer สำหรับพร้อมใช้งาน เตรียมโดยเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ml ลงใน wash buffer ที่เตรียมมาให้ จากนั้นผสมให้เข้ากัน

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. 5x Tris borate buffer (5x TBE) ปริมาตร 1,000 ml เตรียมโดยดวงสารต่างๆ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
1. Tris-base	54 g
2. Boric acid	27.5 g
3. 0.5 M EDTA	20 ml

เมื่อเตรียมสารต่างๆ ได้ตามปริมาณที่ต้องการแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml แล้ว ผสมให้เข้ากัน เมื่อจะใช้งานจะเตรียมเป็น 1x Tris borate buffer (1x TBE) โดยตวง 5x TBE ปริมาตร 200 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 800 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

2. 2% โดยมวลต่อปริมาตร (w/v) agarose gel

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
1. Agarose	2 g
2. 1x TBE buffer	100 ml

จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose จะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อละลายแล้วปล่อยให้เย็นลงสักระยะเวลาหนึ่งก่อนนำไปใช้

3. 10% ethidium bromide

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร
1. Ethidium bromide	30 μ l
2. น้ำกลั่น	300 μ l

5. Loading dye 0.25% Bromphenol blue และ 40% (w/v) sucrose in water จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารเคมีในการทำ DNA cloning

1. LB agar 100 ml

สารเคมีที่ใช้	น้ำหนัก (g)
1. Agar	1.5
2. Yeast extract	0.5
3. Peptone	1
4. NaCl	0.5

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave จากนั้นรอกให้อุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติม ampicilin 100 µg/ml แล้วจึงเทใส่ plate ปริมาตร 35 ml/plate

2. LB broth 50 ml

สารเคมีที่ใช้	น้ำหนัก (g)
1. Yeast extract	0.25
2. Peptone	0.5
3. NaCl	0.25

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 50 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave

3. SOC medium 100 ml

สารเคมีที่ใช้	น้ำหนัก
1. Yeast extract	0.5 g
2. Peptone	2 g
3. NaCl	1 mg
4. KCl	0.25 mg

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml จากนั้นเติมกลูโคส และ Mg^{2+} อย่างละ 100 µl

ภาคผนวก ข

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

วารสารกุมารเวชศาสตร์ (Thai Journal of Pediatrics)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล รพีพรรณ สุณรังค์ เพศ หญิง

อายุ 24 ปี เกิดวันที่ 17 มกราคม 2533

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

สถานที่เกิด โรงพยาบาลร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด

ที่อยู่ปัจจุบัน ห้อง 422 พีเอสเฮ้าส์สี่พระยา อพาร์ทเมนต์ 439 ซ.แก้วฟ้า ถ.สี่พระยา แขวงมหาพฤฒาราม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร 10500

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี ทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY