

การตรวจหาอีวแมนโนโรไวรัสสายพันธุ์ GII.17 ในประเทศไทย



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.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Detection of human norovirus GII.17 in Thailand

Mr. Thanundorn Thanusuwannasak



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาอิวแมนโนโรไวรัสสายพันธุ์ GII.17 ในประเทศไทย
โดย	นายฐานันดร ธนสุวรรณศักดิ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณชัย พยุงภร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิษฐ์ ประพันธ์วัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. อธิพร ชินชัย)

ฐานันดร อนุสุวรรณศักดิ์ : การตรวจหาฮิวแมนโนโรไวรัสสายพันธุ์ GII.17 ในประเทศไทย (Detection of human norovirus GII.17 in Thailand) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สัญชัย พยุภร, 73 หน้า.

Human norovirus (HuNoV) เป็นสาเหตุสำคัญ ในการก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน พบได้ทั่วโลก และในทุกวัย ลักษณะอาการที่พบคือ ท้องเสีย และอาเจียน ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการป้องกันการติดเชื้อ HuNoV เพราะเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์การระบาดอยู่เสมอ โดยเชื่อว่าสายพันธุ์ที่ระบาดจะเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 2-4 ปี สายพันธุ์ที่ระบาดอยู่ในปัจจุบันคือ สายพันธุ์ GII.4 Sydney 2012 งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสายพันธุ์ของ HuNoV ที่ระบาดในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ.2558-2559 ได้รับตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ทั้งหมดจำนวน 1,391 ตัวอย่าง ตรวจหาเชื้อ HuNoV ด้วยวิธี RT-PCR และถอดรหัสพันธุกรรม พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HuNoV จำนวน 184 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.2 ของตัวอย่างทั้งหมด จำแนกสายพันธุ์ประกอบด้วย GII.4, GII.17, GII.P12/GII.3, GII.P16/GII.2 และสายพันธุ์อื่น ๆ (GII.7, GII.15, GII.16, GII.P7/GII.6, GII.P7/GII.14 และ GII.P16/GII.4) คิดเป็นร้อยละ 35, 13, 9, 36 และ 7 ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HuNoV ทั้งหมด สายพันธุ์ GII.17 เริ่มพบตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2558 และพบเรื่อยมาจนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 แต่ไม่ได้มาแทนที่สายพันธุ์ GII.4 เดิม ขณะที่ปลายปี พ.ศ. 2559 ประเทศไทยพบการระบาดของ HuNoV สูงขึ้นในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม พ.ศ.2559 จนกลายเป็นสายพันธุ์หลักในการระบาด สายพันธุ์ดังกล่าวที่พบคือ GII.P.16/GII.2 การตรวจสอบเบื้องต้นนี้สามารถสรุปได้ว่า สายพันธุ์ที่กำลังระบาดอาจเปลี่ยนไปจาก GII.4 เดิม เป็นสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 และ GII.17 พบการระบาดได้ทั่วไป การติดตามอย่างต่อเนื่องเพื่อทำนายการระบาด และช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ HuNoV และป้องกันการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5874020930 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: ACUTE GASTROENTERITIS / NOROVIRUS / RECOMBINATION / EMERGING / PREVALENCE

THANUNDORN THANUSUWANNASAK: Detection of human norovirus GII.17 in Thailand. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., 73 pp.

Human norovirus (HuNoV) is a major cause of acute gastroenteritis and affects people of all ages worldwide. Symptoms include vomiting and watery diarrhea. Outbreak of HuNoV infection often occurs in schools, hospitals, ships, and in close-contact settings. There is currently no vaccine or therapy available for HuNoV infection because there are multiple circulating strains. Therefore, HuNoV reinfection in the same individual is possible over the lifetime. The predominance of HuNoV has been observed to change every 2 – 4 years and the most common strain currently circulating is GII.4 Sydney 2012. To assess the HuNoV strains circulating in Thailand between 2015 and 2016, we screened 1,391 stool samples obtained from hospitalized patients with diarrhea. Stool samples were analyzed for HuNoV by RT-PCR, nucleotide sequencing, and phylogenetic analysis. We found HuNoV among 184 (13.2%) stool samples, which consisted of 35% GII.4, 13% GII.17, 9% GII.P12/GII.3, 36% GII.P16/GII.2 and 7% of other strains (GII.7, GII.15, GII.16, GII.P7/GII.6, GII.P7/GII.14 and GII.P16/GII.4). GII.17 strain was detected from September 2015 to December 2016, but did not replace GII.4 to become the major HuNoV. In addition, there were major outbreaks of HuNoV at the end of 2016 in Thailand in which GII.P16/GII.2 was the major outbreak strain. In summary, evidence suggests an epidemiological shift from the previously more common GII.4 Sydney 2012 to the GII.P16/GII.2 strain. Given past HuNoV outbreaks in primary schools, it is important to monitor HuNoV strains in circulation to better contain potential future outbreaks in the community.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากปราศจากโอกาสจาก ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้การศึกษาต่อในระดับปริญญาโทมาบัดนี้ พวกเขาให้คำปรึกษาที่มีประโยชน์และคุณค่าทั้งการศึกษาเล่าเรียนและการใช้ชีวิตแก่ผู้วิจัยเสมอ แนวทางการแก้ปัญหาต่างๆชี้นำไปสู่ความสำเร็จเป็นนักวิจัยที่ดีให้สถานที่ในการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมทั้งทางด้านวัสดุและอุปกรณ์ที่มีความทันสมัย ตลอดจนช่วยพิจารณา ตรวจสอบและแก้ไขข้อผิดพลาดของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารระชาเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร. พิสิษฐ์ ประพันธ์วัฒน์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และรองศาสตราจารย์ ดร. ชีรพร ชินชัย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์รวมถึงให้คำแนะนำและแก้ไขข้อผิดพลาดของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ ตลอดจนบุคลากรภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้มอบความรู้ ความช่วยเหลือทางด้านต่างๆ จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโทมาบัดนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยา ทางคลินิกที่ส่งเสริมและสนับสนุนการทำงานวิจัย ให้คำปรึกษา ปฏิบัติต่อกันด้วยความอบอุ่น และความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ตลอดจนถึงเพื่อนทั้งในภาควิชาชีวเคมี และนอกภาควิชาชีวเคมี ที่เป็นกำลังใจให้ประสบความสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโทมาบัดนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในโอกาสที่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงเจริญพระชนมายุ 60 พรรษา ทำให้ผู้วิจัยสามารถศึกษา และทำงานวิจัยได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ นายพรชัย ธนสุวรรณศักดิ์ และนางวรรณิ ธนสุวรรณศักดิ์ ผู้เป็นบิดาและมารดาของผู้วิจัย ที่ให้กำเนิดและอบรมสั่งสอนพื้นฐานการใช้ชีวิตให้ดำเนินไปในทางที่ถูกต้อง อีกทั้งสนับสนุน ส่งเสริม ช่วยเหลือในการเข้ามาศึกษาในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พระคุณนี้ผู้วิจัยระลึกถึง และตอบแทนคุณตลอดไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย.....	1
1.2 คำถามงานวิจัย	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.4 สมมติฐาน	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	5
1.7 ข้อจำกัดงานวิจัย.....	5
1.8 นิยามเชิงปฏิบัติการ	5
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 ประวัติความเป็นมา	7
2.2 ไวรัสวิทยา.....	7
2.3 การแบ่งกลุ่มของ norovirus	9
2.4 ลักษณะอาการและความสำคัญ	12
2.5 การติดต่อ.....	13

2.6 การเข้าสู่เซลล์โฮสต์	14
2.7 การวิวัฒนาการ.....	17
2.8 Recombination.....	17
2.9 การศึกษาวิจัย	18
2.10 วัคซีน.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
3.1 ระเบียบวิธีวิจัย.....	21
3.2 กลุ่มตัวอย่าง	21
3.3 จำนวนประชากร.....	21
3.4 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	22
3.4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	22
3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
3.4.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA (RNA extraction)	23
3.4.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA	23
3.4.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis และ สกัด cDNA ออกจาก gel	24
3.5 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล.....	24
3.5.1 การวิเคราะห์ข้อมูล sequencing	24
3.5.2 การจัดเก็บข้อมูล และข้อมูลทางสถิติ	24
3.6 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง	25
3.6.2 การสกัดสารพันธุกรรม.....	25
3.6.3 การแปลงสารพันธุกรรมจาก RNA เป็น cDNA.....	26

3.6.4 การตรวจหาตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HuNoV ที่ตำแหน่ง RdRp gene	27
3.6.5 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HuNoV โดยอาศัยบางส่วนของตำแหน่ง VP1 gene	29
3.6.6 การสกัดผลของ PCR ให้บริสุทธิ์.....	31
3.6.7 การถอดรหัสนิวคลีโอไทด์.....	32
3.6.8 ระบุ genotype จากตัวอย่างที่ติดเชื้อ HuNoV	32
3.6.9 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HuNoV GII.17 ตำแหน่ง complete VP1 gene.....	33
3.6.10 เรียบเรียงข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	34
3.6.11 การตรวจประสิทธิภาพของชุดทดสอบแบบรวดเร็วเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR	34
3.6.12 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)	35
3.6.13 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	35
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	37
4.1 การจัดการตัวอย่างอุจจาระ	37
4.2 การตรวจหาความชุกของ norovirus ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 โดยเทคนิค nested RT-PCR.....	37
4.3 การตรวจสอบสายพันธุ์ของ norovirus ที่พบในประเทศไทย	39
4.4 เปรียบเทียบกลุ่มอายุในแต่สายพันธุ์ของ norovirus	42
4.5 การจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยกระบวนการทาง Bioinformatic	43
4.6 ยืนยันการเกิด recombination	46
4.7 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GII.17 ที่พบในประเทศไทย	47
4.8 วิเคราะห์คุณภาพชุดตรวจแบบรวดเร็วเทียบกับวิธีทางโมเลกุล.....	52
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง	53
รายการอ้างอิง	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	73

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 สารเคมี ปริมาตร และความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง.....	27
ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะต่อ HuNoV ในตำแหน่งบางส่วนของ RdRp gene	28
ตารางที่ 3 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนในตำแหน่งบางส่วนของ RdRp gene.....	28
ตารางที่ 4 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene ของ HuNoV ในรอบที่ 1.....	29
ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene รอบที่ 1.....	30
ตารางที่ 6 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene ของ HuNoV รอบที่ 2.....	30
ตารางที่ 7 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene รอบที่ 2.....	31
ตารางที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะต่อ HuNoV ในตำแหน่ง complete VP1 gene.....	33
ตารางที่ 9 แสดงสภาวะของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนในตำแหน่ง complete VP1 gene.....	34
ตารางที่ 10 แสดงกลุ่มอายุของผู้ป่วยด้วยลำไส้อักเสบเฉียบพลันจาก norovirus ในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน.....	42
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างวิธีการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปและวิธี RT-PCR....	52

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสบน genome ของ HuNoV.....	8
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ ORF2 ด้านซ้ายแสดงจีโนม และด้านขวาแสดง VP1 monomer โดย สีเขียวแสดง N-terminal ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนประมาณ 10-49 อยู่ด้านในของผิวไวรัส สีเหลือง แสดงส่วนของ Shell domain ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนประมาณ 50-225 สีแดงแสดง P1 domain ที่ตำแหน่ง 226-278 และ 406-520 สีฟ้าแสดง P2 domain ที่ตำแหน่ง 279-405 (32).....	9
รูปที่ 3 แสดง phylogenetic tree แบ่งกลุ่ม genogroup และ genotype ของ norovirus ที่ ตำแหน่ง RdRp และ VP1 และโฮสต์ที่มีความสัมพันธ์กัน (36).....	11
รูปที่ 4 แสดงสาเหตุการก่อให้เกิดโรคซึ่งมีความสัมพันธ์กับ genogroup ของ norovirus (54)	14
รูปที่ 5 แสดงวงจรชีวิตการเข้าไปในเซลล์ของเจ้าบ้านและเพิ่มจำนวนของ HuNoV (36).....	16
รูปที่ 6 รูปแบบการเกิด recombination ของ RNA ไวรัสในลักษณะ genome ที่แตกต่างกันซึ่ง เกิดจาก co-infection ในเซลล์เดียวกัน	18
รูปที่ 7 ตัวอย่างผลของผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR บน 2% gel agarose ในตำแหน่งของยีนบน ORF1 หรือ RdRp โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder แถวที่ 2-10 คือ ผลการตรวจหา norovirus ในกลุ่มตัวอย่างซึ่งพบว่ามีกรดดีเอ็นเอ norovirus ในตัวอย่างที่ 10 และแถวที่ 11 และ 12 คือ Positive control และ Negative control ตามลำดับ.....	38
รูปที่ 8 ตัวอย่างผลของผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR บน 2% gel agarose ในตำแหน่งของยีนบน ORF2 หรือ VP1 โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder แถวที่ 2-10 คือ ผลการตรวจหา VP1 ของ norovirus ในกลุ่มตัวอย่างที่พบว่ามีกรดดีเอ็นเอ norovirus จากการตรวจหา RdRp และแถวที่ 11 คือ Negative control ตามลำดับ.....	38
รูปที่ 9 Pie chart แสดงอัตราส่วนของตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของ norovirus โดยแยกเป็น genotype ต่างๆที่พบ A.) แสดงสายพันธุ์ของ norovirus ที่พบในช่วงปี พ.ศ. 2558 - พ.ศ. 2559 B.) แสดงสายพันธุ์ที่พบในปี พ.ศ. 2558 และ C.) แสดงสายพันธุ์ที่พบในปี พ.ศ. 2559.....	40
รูปที่ 10 กราฟแสดงการระบาดของ norovirus ภายในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 โดย area graph แสดงจำนวนของตัวอย่างที่ได้รับในแต่ละ ช่วงเดือนเมื่อเทียบกับแกน y ด้านซ้าย และกราฟ stacked graph แสดงจำนวนของตัวอย่างที่	

พบการปนเปื้อนของ norovirus โดยแบ่งเป็น genotype ที่พบในแต่ละช่วงเดือนเทียบกับแกน y ด้านขวา..... 41

รูปที่ 11 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและตัวอย่างบนยีนของ RdRp ความยาว 435 nt โดยตัวเลขแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 70% ในตัวอ้างอิงจะถูกเขียนด้วย accession number/strain (code)/สายพันธุ์/ปีที่พบ/ประเทศที่พบ ส่วนในตัวอย่างจะถูกแสดงโดยนำหน้าด้วย “•” 44

รูปที่ 12 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและตัวอย่างบนยีนของ VP1 ความยาว 206 nt ตัวเลขแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 70% โดยตัวเลขแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 70% ในตัวอ้างอิงจะถูกเขียนด้วย accession number/strain (code)/สายพันธุ์/ปีที่พบ/ประเทศที่พบ ส่วนในตัวอย่างจะถูกแสดงโดยนำหน้าด้วย “•” 45

รูปที่ 13 ผลที่ได้จากซอฟต์แวร์ SimPlot โดยที่แกน Y แสดงค่าความเหมือน (similarity) และแกน X แสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่าง B3344 ถูกตั้งค่าเป็น Query โดยเส้นกำหนดเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสีแดงแทนสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 (KY771081.1) สีฟ้าแทน GII.16 (AY772730.1) และสีเขียวแทน GII.2 (X81879.1) พบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ 5071... 46

รูปที่ 14 ผลที่ได้จากซอฟต์แวร์ SimPlot โดยที่แกน Y แสดงค่าความเหมือน (similarity) และแกน X แสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่าง B2886 ถูกตั้งค่าเป็น Query โดยเส้นกำหนดเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสีแดงแทนสายพันธุ์ GII.P12/GII.3 (KU529182.1) สีฟ้าแทน GII.12 (KJ196299.1) และสีเขียวแทน GII.3 (AB039782.1) พบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ 5068..... 47

รูปที่ 15 ตัวอย่างผลของผลิตภัณฑ์จาก Nested RT-PCR บน 2% gel agarose ในตำแหน่งของยีน VP1 โดยแถวที่ 1a และ 1b คือ 100 bp DNA ladder แถวที่ 2a-5a และ 2b-5b คือ ผลการเพิ่มจำนวนของยีน VP1 ครั้งแรกและครั้งหลัง และ แถวที่ 6a และ 6b คือ Negative control..... 48

รูปที่ 16 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและตัวอย่าง norovirus GII.17 ที่ตำแหน่งยีน VP1 ความยาว 1623 nt ที่พบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 – 2559 ตัวอย่างของงานวิจัยนี้จะถูกแสดงโดยนำหน้าด้วย “•” 50

รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่พบระหว่างตัวอย่างที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 – 2558 ถูกแสดงโดยซอฟต์แวร์ BioEdit..... 51

รูปที่ 18 แสดง phylogenetic tree จาก PopArt โดยการจำแนกตามปีแสดงสัญลักษณ์เป็นจุดสีเขียวแทนปีพ.ศ.2556 จุดสีน้ำเงินแทนปีพ.ศ.2557 จุดสีแดงแทนปีพ.ศ.2558 และจุดสีฟ้าแทนปีพ.ศ.2559 จากรูปแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ และขีดขวางตามกิ่งแสดงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจุดสีดำคือ node หรือจุดแยก..... 51



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

Human Norovirus (HuNoV) เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อที่ไม่ได้เกิดจากแบคทีเรีย ก่อให้เกิดลำไส้อักเสบเฉียบพลัน พบได้ทั่วโลก และเกิดขึ้นกับทุกวัย นอกเหนือจาก norovirus ไวรัสชนิดอื่นที่สามารถก่อให้เกิดลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ได้แก่ sapovirus, astrovirus, rotavirus และ adenovirus เป็นต้น (1) จากข้อมูลของ CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ระบุว่า 1 ใน 5 ของผู้ป่วยที่มาด้วยลำไส้อักเสบเฉียบพลันซึ่งมีอาการท้องเสีย และอาเจียนร่วมด้วย มักเกิดจากการติดเชื้อ HuNoV โดยภายใน 1 ปีทั่วโลกพบผู้ป่วยด้วยลำไส้อักเสบเฉียบพลันสูงถึง 685 ล้านคนโดยประมาณ มีผู้เสียชีวิตถึง 50,000 คนต่อปี (2) อาการที่พบจากการติดเชื้อ HuNoV ได้แก่ ท้องเสีย คลื่นไส้ และอาเจียน ในบางรายอาจมีไข้ เจ็บที่บริเวณท้องเกิดขึ้นร่วมได้ เป็นต้น HuNoV มีระยะฟักตัวเป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากผู้ป่วยรับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย ร่างกายจะสามารถรักษาตัวได้เอง ภายใน 2-3 วัน (3) การติดเชื้อ HuNoV อาจเป็นอันตรายต่อเด็ก คนชราและผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (4-6) ในประเทศที่พัฒนาแล้วได้ให้ความสำคัญต่อการติดเชื้อ HuNoV เนื่องจากสาเหตุการเกิดท้องเสียจากปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากการติดเชื้อไวรัส ได้แก่แบคทีเรีย โปรโตซัว หรือสารเคมีพบได้น้อยลง จากการมีสุขอนามัยที่ดีมากกว่าในอดีต (7) กลุ่มเด็กในประเทศพัฒนาแล้วได้รับวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ rotavirus หรือลดความรุนแรงจากการติดเชื้อ ช่วยลดสาเหตุการติดเชื้อ rotavirus เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการเกิดท้องเสียจากการติดเชื้อไวรัสในเด็ก (8) นอกจากนี้การขาดวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการป้องกัน หรือลดความรุนแรงของการติดเชื้อ HuNoV ส่งผลให้พบการระบาดของเชื้อมีเพิ่มสูงขึ้น

ปัจจัยที่ส่งผลให้พบการระบาดของ HuNoV เพิ่มสูงขึ้นเนื่องมาจากการขาดวัคซีนหรือยาที่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่เป็นผลจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยอาศัยวิธี cell culture ทำได้ยาก HuNoV ต้องอาศัยปัจจัยบางอย่างนอกเหนือจากการเลี้ยงเซลล์แบบปกติทั่วไปในการช่วยให้เชื้อ HuNoV สามารถเข้าไปภายในเซลล์ และเพิ่มจำนวนได้ (9) เมื่อไม่นานมานี้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาเพื่อให้ HuNoV สามารถเพิ่มจำนวนใน cell culture ได้ซึ่งจะทำให้มีแนวโน้มในการวิจัย

norovirus เพิ่มมากขึ้น และส่งเสริมให้มีการสร้างวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกัน หรือลดความรุนแรงในอนาคต นอกจากการเลี้ยงใน cell culture ที่เป็นปัญหาต่อการวิจัยวัคซีนหรือยาแล้วนักวิจัยยังพบว่า HuNoV มีการเปลี่ยนแปลงตัวเองอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะที่ตำแหน่งของ antigen บน capsid protein ของ HuNoV ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ จึงพบว่าผู้ป่วยหลายรายซึ่งเคยติดเชื้อ HuNoV แล้วสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้อีก (10) และมีการรายงานในหลายฉบับกล่าวว่าทุก 2-4 ปี (11) HuNoV จะมีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ที่ระบดส่งผลให้การผลิตวัคซีนไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการป้องกันได้ อาจต้องคอยพัฒนาวัคซีนตามการเปลี่ยนแปลงไปของเชื้อไวรัส (12, 13) ซึ่งอาจเป็นผลเสียต่อการลงทุนในการผลิตวัคซีน และเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์หลักในการระบดซึ่งนอกเหนือความครอบคลุมของวัคซีน

HuNoV สายพันธุ์ GII.4 Sydney 2012 เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดโดยการระบดของสายพันธุ์ดังกล่าวเริ่มตั้งแต่ช่วงปลายปี พ.ศ.2554 จนถึงปัจจุบัน ในอดีตสายพันธุ์ GII.4 เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดตั้งแต่ก่อนปี พ.ศ.2543 เป็นต้นมา ทว่าภายในช่วงปลายปี พ.ศ.2557 มีการรายงานในประเทศจีนพบการระบดของ HuNoV GII.17 มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (14, 15) และในปี พ.ศ.2558 มีการรายงานในหลายประเทศ ถึงการระบดของ GII.17 เพิ่มมากขึ้น ประเทศที่มีการรายงาน ได้แก่ สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา จีน ญี่ปุ่น ฮองกงและอีกหลายๆประเทศทั่วโลก (16-23) แต่ทว่ายังไม่มีการรายงานความชุกในประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงการระบดของ HuNoV GII.17 แต่มีการรายงานการพบ GII.17 มาก่อนในสถานเลี้ยงเด็กแห่งหนึ่ง ในประเทศไทย (24) จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจหาความชุกของ HuNoV และจำแนกสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ.2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 อีกทั้งบอกถึงความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของ HuNoV GII.17 ในอดีตกับปัจจุบัน เพื่อนำไปพิจารณาปรับใช้กับวัคซีนหรือยารักษาโรคให้มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการป้องกันและควบคุมได้

1.2 คำถามงานวิจัย

1. ในประเทศไทยพบการระบาดของ HuNoV GII.17 มากน้อยเพียงใด รวมถึงมีการกระจายของ HuNoV สายพันธุ์อื่นๆในช่วงปี พ.ศ.2559 - พ.ศ.2560 อย่างไร
2. HuNoV GII.17 ที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างทางชีวโมเลกุลกับในอดีตหรือแหล่งอื่นหรือไม่อย่างไร
3. สายพันธุ์ใดของ HuNoV ที่จะเป็นสายพันธุ์หลักในการระบาด ในช่วงปีพ.ศ.2559 - พ.ศ. 2560

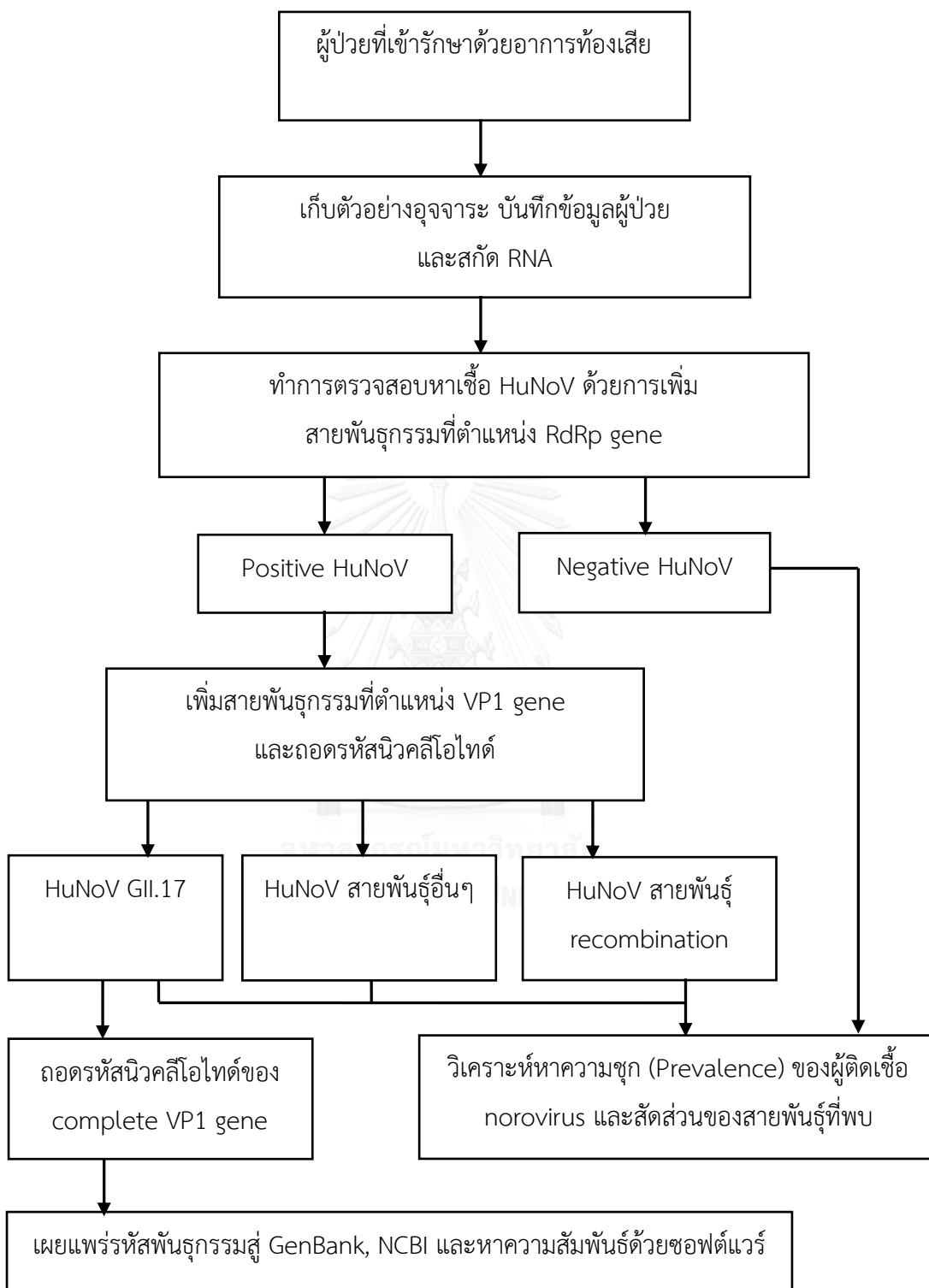
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาความชุกของการระบาดของ HuNoV GII.17 ในประเทศไทย ภายในช่วงเดือนเดือนมกราคม พ.ศ.2558 ถึงธันวาคม พ.ศ.2559
2. เพื่อหาความสัมพันธ์ทางชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันของ HuNoV GII.17 ที่พบในประเทศไทยในระยะเวลาเดือนมกราคม พ.ศ.2558 ถึงธันวาคม พ.ศ.2559 เมื่อเทียบกับแหล่งอื่นและในอดีตที่มีการค้นพบมาก่อน
3. เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์หลักในการระบาดของ HuNoV ที่อาจมาแทนที่สายพันธุ์ GII.4 จากการศึกษาทางระบาดวิทยา

1.4 สมมติฐาน

1. ถ้าการระบาดของ HuNoV GII.17 ถูกพบได้ในหลายประเทศแล้วประเทศไทยอาจมีการระบาดเช่นเดียวกัน
2. ถ้าพบการระบาดของ HuNoV GII.17 ในประเทศไทยแล้วสายพันธุ์กรรมของสายพันธุ์ที่พบ อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงไปจากอดีต และใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ระบาดทั่วโลกในระยะเวลาเดียวกัน
3. ถ้า HuNoV GII.17 พบมากกว่าสายพันธุ์ GII.4 เช่นเดียวกับในประเทศอื่นอาจแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์หลักในการระบาดได้

1.5 ขอบเขตของการวิจัย



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

1.7 ข้อจำกัดงานวิจัย

1. เนื่องจากบางตัวอย่างที่ใช้มีปริมาณตัวอย่างจำกัดจึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำ หรือทำการทดลองเพิ่มเติม
2. ไม่สามารถเข้าไปซักประวัติผู้ป่วยที่ติดเชื้อเป็นรายบุคคลเพื่อสอบถามปัจจัยการก่อโรค หรือติดตามอาการได้อย่างใกล้ชิดจึงไม่มีข้อมูลในส่วนแหล่งก่อโรคและความรุนแรงของการติดเชื้อ HuNoV
3. ตัวอย่างที่ได้รับเป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยตนเอง จึงไม่สามารถแสดงถึงการระบาดที่ชัดเจนทั่วทั้งประเทศไทยได้

1.8 นิยามเชิงปฏิบัติการ

Genogroup คือ การจัดกลุ่มโดยอาศัยข้อมูลของสารพันธุกรรม ใน norovirus อาศัยการแบ่งกลุ่มจาก VP1 และ RdRp gene เป็นหลัก ความใกล้เคียงกัน หรือค่า identity 55-85%

Genotype คือ การจัดกลุ่มโดยอาศัยข้อมูลของสารพันธุกรรมโดยใน norovirus อาศัยการแบ่งกลุ่มย่อยจาก genogroup ความใกล้เคียงกัน หรือค่า identity มากกว่า 85%

Polymerase chain reaction (PCR) คือ ปฏิกริยาที่จำลองการเพิ่มจำนวน DNA ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมให้มีจำนวนมากพอในการตรวจสอบซึ่งมีความจำเพาะ และแม่นยำสูง

Recombination คือ กระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของไวรัสชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันส่งผลให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น

GenBank คือ ฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โปรตีน และอื่นๆทางด้านชีวโมเลกุลซึ่งรวบรวมไว้บน website คือ www.ncbi.nlm.nih.gov นอกเหนือจากของ ncbi แล้วยังมีฐานข้อมูลอื่นเช่น DDBJ EMBL เป็นต้น

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงบทบาทของ HuNoV ซึ่งเป็นสาเหตุในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียในประเทศไทย และแนวโน้มการระบาดของของสายพันธุ์ HuNoV ที่ระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2558 - พ.ศ.2559 และพัฒนาชุดตรวจในการคัดกรองโรคได้อย่างแม่นยำ จากการวิเคราะห์ลักษณะของโปรตีนที่มีความไว และความจำเพาะมากขึ้น
2. ทราบความชุกหรือความถี่ของการติดเชื้อ HuNoV ในแต่ละช่วงเดือนทำให้สามารถทำนายถึงโอกาสในการเกิดโรค และช่วยในการวินิจฉัยโรค
3. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ถูกนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ GenBank, NCBI เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงแก่งานวิจัยอื่นในอนาคต

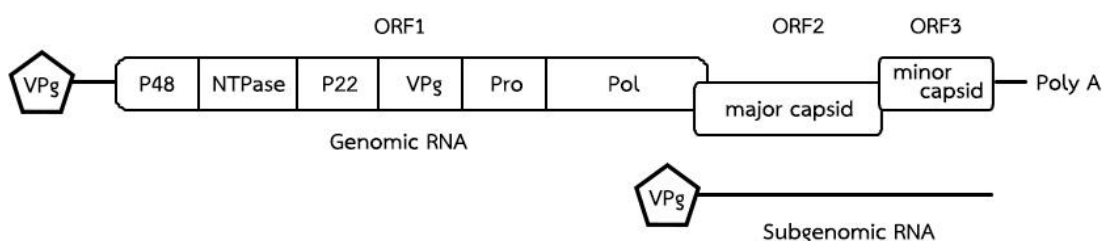
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมา

การรายงานการก่อโรคครั้งแรกของ HuNoV ถูกบันทึกไว้ในปีพ.ศ.2472 โดย Dr. John Zahorsky ได้เรียกโรคที่เกิดจากเชื่อนี้ว่า Hyperemesis hiemis หรือ winter vomiting disease ซึ่งในขณะนั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าเกิดจากสาเหตุอะไร โดยอาการที่พบมีท้องเสีย เจ็บช่องท้องเกิดขึ้น และหายอย่างรวดเร็ว (25) ต่อมาในปี พ.ศ.2512 เกิดการระบาดของเชื้อ norovirus ขึ้นลักษณะอาการคล้ายกับที่กล่าวมา ในโรงเรียนประถมแห่งหนึ่งที่เมือง Norwalk รัฐ Ohio ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลการตรวจตัวอย่างอุจจาระที่ผ่านการกรอง จนปราศจากแบคทีเรีย (bacteria-free stool filtrates) ด้วยเทคนิค immune electron microscopy (IEM) พบอนุภาคไวรัสที่มีขนาดเล็กประมาณ 27 nm^3 ไม่มีผนังหุ้มลักษณะเป็น icosahedral และไวรัสตัวนี้ต่อมาถูกเรียกว่า “Norwalk virus” ตามชื่อเมืองของโรงเรียนประถมที่พบการระบาด (26, 27) Norwalk virus เป็นเพียงสายพันธุ์เดียวในสกุล *Norwalk-like virus* ในปี พ.ศ. 2545 องค์กร International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้เปลี่ยนชื่อสกุลเป็น *Norovirus* จึงเรียกเชื้อไวรัสดังกล่าวว่า norovirus ตามชื่อสกุลกันอย่างแพร่หลายและ Norwalk virus เป็นชื่อที่ใช้เรียกสายพันธุ์ของ norovirus G1.1 หรือ prototype strain ตามข้อมูลของ ICTV ชื่อ “noro-” ถึงแม้มีความใกล้เคียงกับภาษาญี่ปุ่น แต่ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องแต่อย่างใด เกิดจากการนำชื่อเมืองมาย่อเท่านั้น (Norwalk; Nor- + -ovirus)

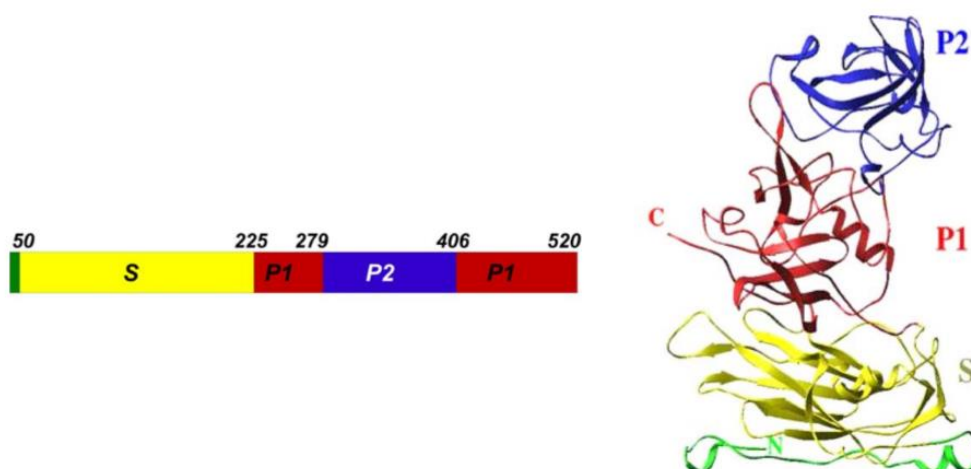
2.2 ไวรัสวิทยา

Norovirus จัดอยู่ในวงศ์ *Caliciviridae* ในสกุล *Norovirus* เมื่อแบ่งตามการจัดกลุ่มของ Baltimore ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 4 มีลักษณะสายพันธุ์กรรมเป็น RNA สายเดี่ยว สายบวก ไม่มีผนังหุ้ม ลักษณะรูปร่างเป็น icosahedral ขนาดประมาณ 27 nm^3 สายพันธุ์กรรมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวประมาณ 7400–7700 nt HuNoV ประกอบด้วย 3 ORF ดังรูปที่ 1 (28, 29) ได้แก่



รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสบน genome ของ HuNoV

- ORF 1 ความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 1700 ตัว น้ำหนักประมาณ 200 kDa สามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีน 6 ชนิดที่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัส (non-structural protein) โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสมีหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมของ HuNoV (30, 31) ได้แก่
 1. p48
 2. NTPase
 3. p22
 4. VPg
 5. Protease
 6. Polymerase
- ORF 2 หรือ VP1 ความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 530–555 ตัว น้ำหนักประมาณ 58–60 kDa สามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของไวรัส อยู่ภายนอกหุ้มตัวสารพันธุกรรมที่อยู่ภายในแบ่งย่อยออกด้วย 90 dimers มีส่วนประกอบ 2 domain (32) คือ
 1. shell domain เป็นส่วนของผิวเปลือกหุ้มไวรัส
 2. P (Protruding) domain ส่วนที่ยื่นออกมาจากผิวเพื่อจับกับ receptor แยกได้เป็น P1 และ P2 domain ส่วนของ P2 domain จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดบนสายพันธุกรรม



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ ORF2 ด้านซ้ายแสดงจีโนม และด้านขวาแสดง VP1 monomer โดยสีเขียวแสดง N-terminal ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนประมาณ 10–49 อยู่ด้านในของผิวไวรัส สีเหลืองแสดงส่วนของ Shell domain ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนประมาณ 50–225 สีแดงแสดง P1 domain ที่ตำแหน่ง 226–278 และ 406–520 สีฟ้าแสดง P2 domain ที่ตำแหน่ง 279-405 (32)

- ORF 3 หรือ VP2 มีความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 208-268 ตัว มีน้ำหนักประมาณ 22-29 kDa (32) สามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีนโครงสร้างรองของไวรัส โปรตีนจะอยู่ภายในของ capsid protein ปัจจุบันไม่ทราบหน้าที่ที่แท้จริง แต่มีการศึกษาในไวรัสอื่นที่อยู่ในวงศ์เดียวกันของ *Caliciviridae* คือ Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) และ Feline caliciviridae (FCV) เชื่อว่า ทำหน้าที่ช่วยในการจับกับ receptor ของโฮสต์ และอาจช่วย RNA genome packaging แต่ยังไม่ทราบถึงกระบวนการดังกล่าว (33, 34)

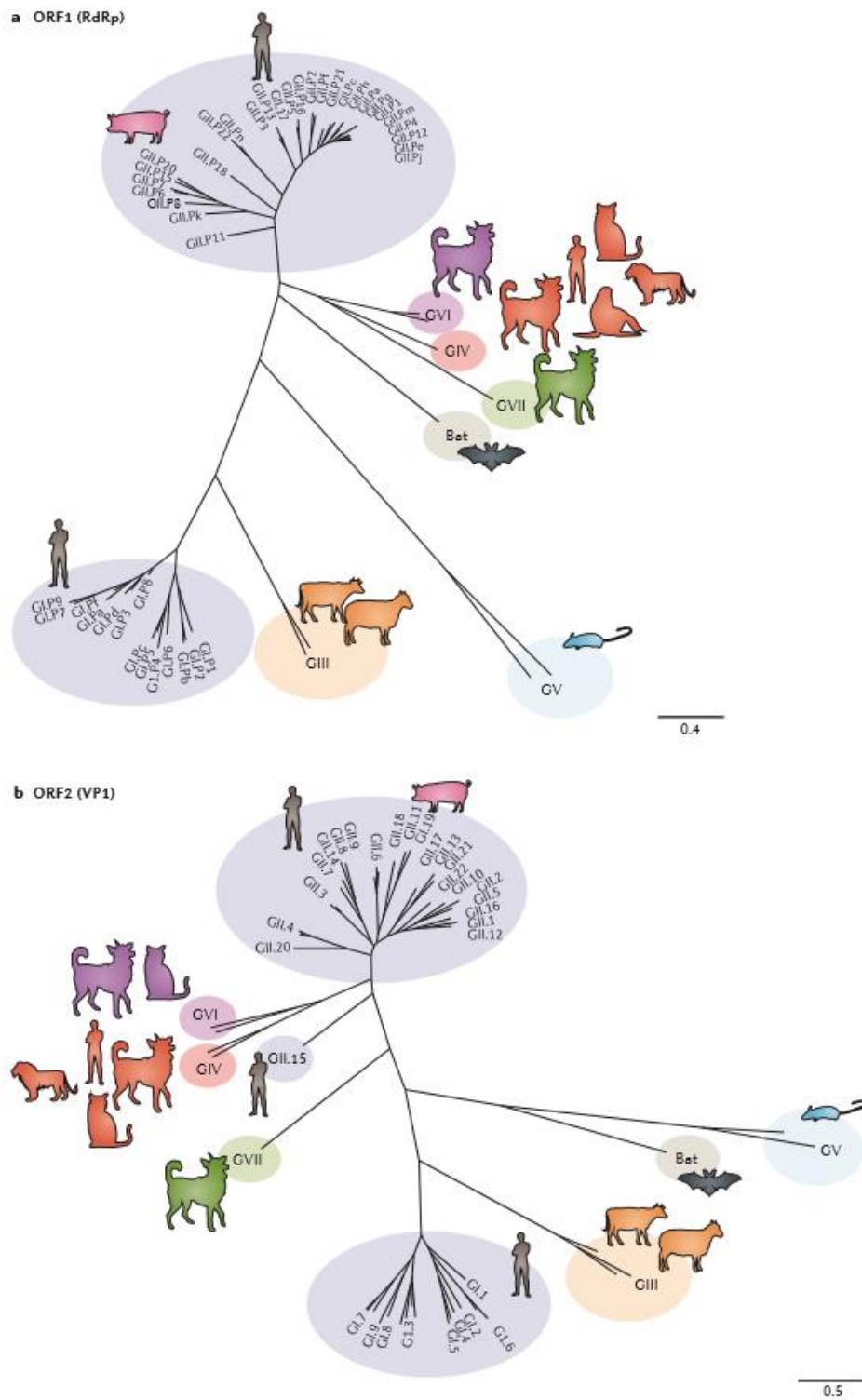
บริเวณ 5'UTR และ 3'UTR ของสายพันธุกรรม norovirus ประกอบด้วย VPg และ poly-A tail ตามลำดับ สายพันธุกรรมของ norovirus GV. หรือ MNoV มี ORF4 เพิ่มขึ้นมา เมื่อถอดรหัสออกมาเป็น antagonist ของ virulence factor 1 (VF1) เป็นส่วนหนึ่งของ innate immune (31)

2.3 การแบ่งกลุ่มของ norovirus

ในปัจจุบัน norovirus สามารถจัดกลุ่มเป็น genogroup ทั้งหมด 6 genogroups โดย genogroup 1 (GI.) และ 4 (GIV.) พบในคน genogroup 2 (GII.) พบในคน และสุกร genogroup 3 (GIII.) พบในโคและกระบือ genogroup 5 (GV.) พบในหนู และ genogroup 6 (GVI.) พบในสุนัข

และแนว กลุ่มที่ก่อโรคในคน เรียกว่า Human Norovirus (HuNoV) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งย่อย เป็น genotype ได้อีกมากมาย ปัจจุบันพบมากกว่า 30 genotypes (35, 36) ซึ่งการจัดกลุ่มของ norovirus ดังรูปที่ 3 จะอาศัยค่า identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง VP1 และ RdRp โดย ความแตกต่างระหว่างกลุ่มของ genogroup มีค่า amino acid identity อยู่ในช่วง 45.0–61.4% เมื่อค่า identity มากกว่านั้น จะถูกจัดอยู่ใน genogroup เดียวกันแต่มี genotype ที่แตกต่างกัน หากมีความแตกต่างกัน 0–14.1% อาจอยู่ใน genotype เดียวกันแต่มี strain ที่ต่างกันได้ (37) จาก การศึกษาพบว่าในบางครั้งอาจพบการเกิด recombination หรือการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ ตำแหน่งรอยต่อระหว่าง ORF1 และ ORF2 เป็นตำแหน่งที่มีการเกิด overlap กันของสารพันธุกรรม ของ norovirus การเกิด recombination พบได้ทั้งต่าง genotype กับและต่าง strain กันโดยสาย พันธุ์ที่พบการเกิด recombination ระหว่าง strain ได้บ่อยคือ GII.4 โดยตั้งแต่ปี 2000 เป็นต้นมาพบ การเกิดขึ้นเรื่อยมาและมีการเปลี่ยนแปลงการระบาดอยู่ตลอดเวลาเป็นลักษณะของเชื้อที่จะช่วย เพื่อให้หลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหรือคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดีขึ้น เราจะไม่สามารถ พิจารณาแยกความแตกต่างได้จากค่า cut-off ที่ได้กล่าวไว้ (38) ในปัจจุบันการระบุสายพันธุ์ที่ได้รับ ความน่าเชื่อถือโดยการอาศัยเว็บไซต์ <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>





รูปที่ 3 แสดง phylogenetic tree แบ่งกลุ่ม genogroup และ genotype ของ norovirus ที่ตำแหน่ง RdRp และ VP1 และโฮสต์ที่มีความสัมพันธ์กัน (36)

2.4 ลักษณะอาการและความสำคัญ

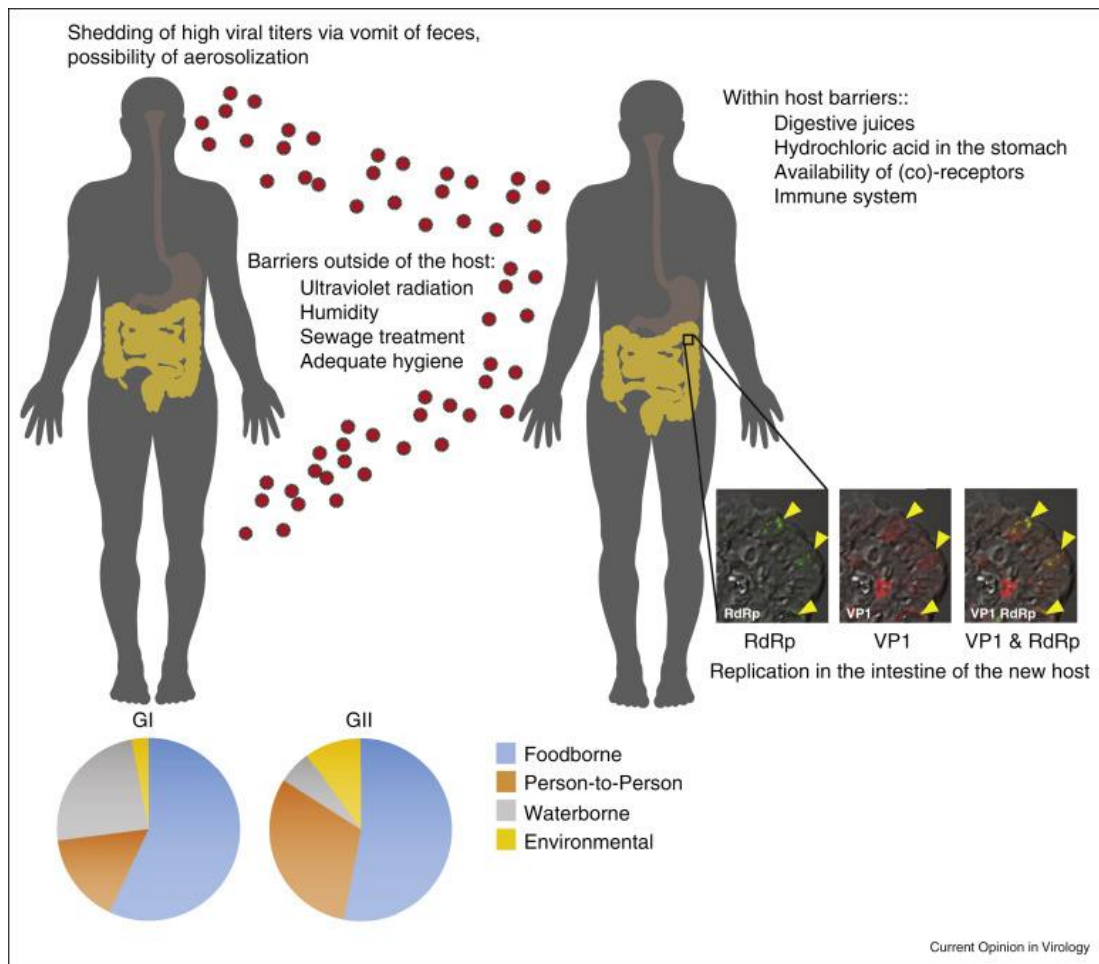
การติดเชื้อ norovirus มีระยะการฟักตัวหลังจากได้รับเชื้อประมาณ 1-2 วัน อาการที่แสดงออกมาได้แก่ ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน ในบางรายมีอาการเจ็บท้อง เป็นไข้ และร่างกายสามารถรักษาอาการได้เองใช้เวลา 2-3 วัน เว้นในกลุ่มของเด็กทารก คนชรา และผู้ที่มีความบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน อาจมีอาการรุนแรงและหายได้ช้ากว่า (39) โดยปกติการติดเชื้อ norovirus ไม่ทำให้ถึงตาย แต่อาจเกิดขึ้นได้เป็นบางรายโดยมักมีอาการแทรกซ้อนสัมพันธ์กับโรคปอดบวม และโรคที่พบได้อีก เช่น ลำไส้อักเสบ โรคหัวใจ ไตวาย खाตสารอาหาร ขาดน้ำ ติดเชื้อ (sepsis) ภาวะลำไส้เน่าในทารก เกิดก่อนกำหนด (necrotizing enterocolitis) ลำไส้กลืนกัน (acute gastrointestinal bleeding and colon perforation) (40) ความสำคัญของ norovirus คือเป็นสาเหตุสำคัญตัวหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันซึ่งในประเทศไทยที่พัฒนาแล้วมีความใส่ใจกับโรคนี้นี้มาก

Sandmann FG, 2017 รายงานในประเทศอังกฤษโดย National Health Service (NHS) ทำการสำรวจผู้ป่วยที่เข้าโรงพยาบาลด้วยลำไส้อักเสบเฉียบพลันตั้งแต่ปีพ.ศ.2553/54 – 2558/59 พบผู้ป่วยที่ต้องรักษาตัวในโรงพยาบาลถึง 88,000–113,000 ราย ค่าใช้จ่ายโดยรวมสูงถึง 5.7-7.5 ล้านปอนด์ โดยช่วงที่มีผู้ป่วยมากมักจะอยู่ในฤดูหนาว (41)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ทำการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา โรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันและการติดเชื้อ norovirus มีความสำคัญเนื่องจากนอกจากติดต่อทางอาหาร ยังสามารถติดต่อจากคนสู่คน ในปี พ.ศ.2552-2556 พบการระบาดของลำไส้อักเสบถึง 10,756 ครั้ง ผู้ป่วยกว่า 356,532 คน มีผู้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลถึง 5,394 คน และเสียชีวิต 459 คน ทราบสาเหตุของการระบาดจำนวน 7,430 ครั้ง และพบว่าสาเหตุจาก norovirus ก่อให้เกิดการระบาดถึง 6,223 (84%) ครั้ง และสาเหตุรองลงมาเกิดจากแบคทีเรียจำพวก Shigella และ Salmonella การระบาดพบมากในช่วงของหน้าหนาว (ธันวาคม – กุมภาพันธ์) จำนวน 5,716 (53%) ครั้ง (42)

2.5 การติดต่อ

HuNoV สามารถติดต่อได้จากคนสู่คน ผ่านทางการรับประทานอาหาร หรือน้ำที่ปนเปื้อน อุจจาระของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ norovirus มากับวัตถุประกอบอาหาร เช่น ผัก ผลไม้ หอย และมือของผู้ประกอบอาหาร เนื่องจากเชื้อมีขนาดเล็ก สามารถลอยอยู่ในอากาศได้จากการไอ เจ็บ การติดเชื้อ HuNoV สามารถแสดงอาการของโรคได้ แม้ได้รับอนุภาคไวรัสน้อยกว่า 20 อนุภาค (43) สถานที่ที่พบการระบาดของ norovirus บ่อยมักเป็นสถานที่ปิด และมีคนอาศัยอยู่มาก ได้แก่ บ้านพักคนชรา ร้านอาหาร โรงเรียน เรือสำราญ โรงพยาบาล และสถานรับเลี้ยงเด็กเป็นต้น (44) เนื่องจากลักษณะของเชื้อ norovirus ไม่มีเยื่อหุ้มทำให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อม ไม่ถูกทำลายด้วยแอลกอฮอล์ ต้องอาศัยสาร disinfectant ในการกำจัดเชื้อ (45) สามารถพบในอุจจาระของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ norovirus ได้นานหลายสัปดาห์ (46) ตามแหล่งน้ำ พบการปนเปื้อนได้โดยเชื้อ norovirus มักลอยอยู่บนผิวน้ำ เกิดจากการทิ้งสิ่งปฏิกูลลงแหล่งน้ำ หรืออาจเกิดจากภัยพิบัติ เช่น น้ำท่วมขัง ทำให้มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ HuNoV (47, 48) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงความสามารถของ norovirus ในการติดต่อจากสัตว์สู่คน หรือจากคนสู่สัตว์ แต่มีรายงานกล่าวถึงการพบ antibody ต่อ HuNoV ในสัตว์ที่ใกล้ชิดกับคน เช่น โค สุกรหรือสุนัข และพบ antibody ต่อ norovirus สายพันธุ์ในสัตว์ พบในคนที่มีความใกล้ชิดกับสัตว์เหล่านั้น (49, 50) มีรายงานหลายแห่งกล่าวถึงการตรวจหาเชื้อ norovirus ในสัตว์กลุ่มหอยฝาเดียว และหอยสองฝา ซึ่งสายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับที่พบในมนุษย์ ได้แก่ GI (GI.2, GI.3, GI.4, GI.5 และ GI.9), GII (GII.1, GII.2, GII.3 และ GII.4) (51) โดยปกติการตรวจสอบทางสุขลักษณะของอาหารในหอย สิ่งที่บ่งบอกการปนเปื้อนอุจจาระ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *intestinal enterococcus* (ข้อมูลจาก European Commission. (2008) Commission regulation (EC) No 1021/2008 of 17 October 2008) แต่ยังคงมีความเสี่ยงจากไวรัสที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น norovirus (52) นอกจากนี้เชื่อว่า เชื้อ norovirus ในหอยเหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้สายพันธุ์ที่ระบาดกระจายไปทั่วโลก จากปัจจัย คือ wastewater treatment works (WWTWs), storm overflows (SOs), combined sewage overflows (CSOs), septic tanks or boats (53) แต่ยังไม่มียานวิจัยที่ออกมาบอกถึงการกินหอยที่ปนเปื้อนแล้วติดเชื้อ HuNoV ออกมา (46, 52)

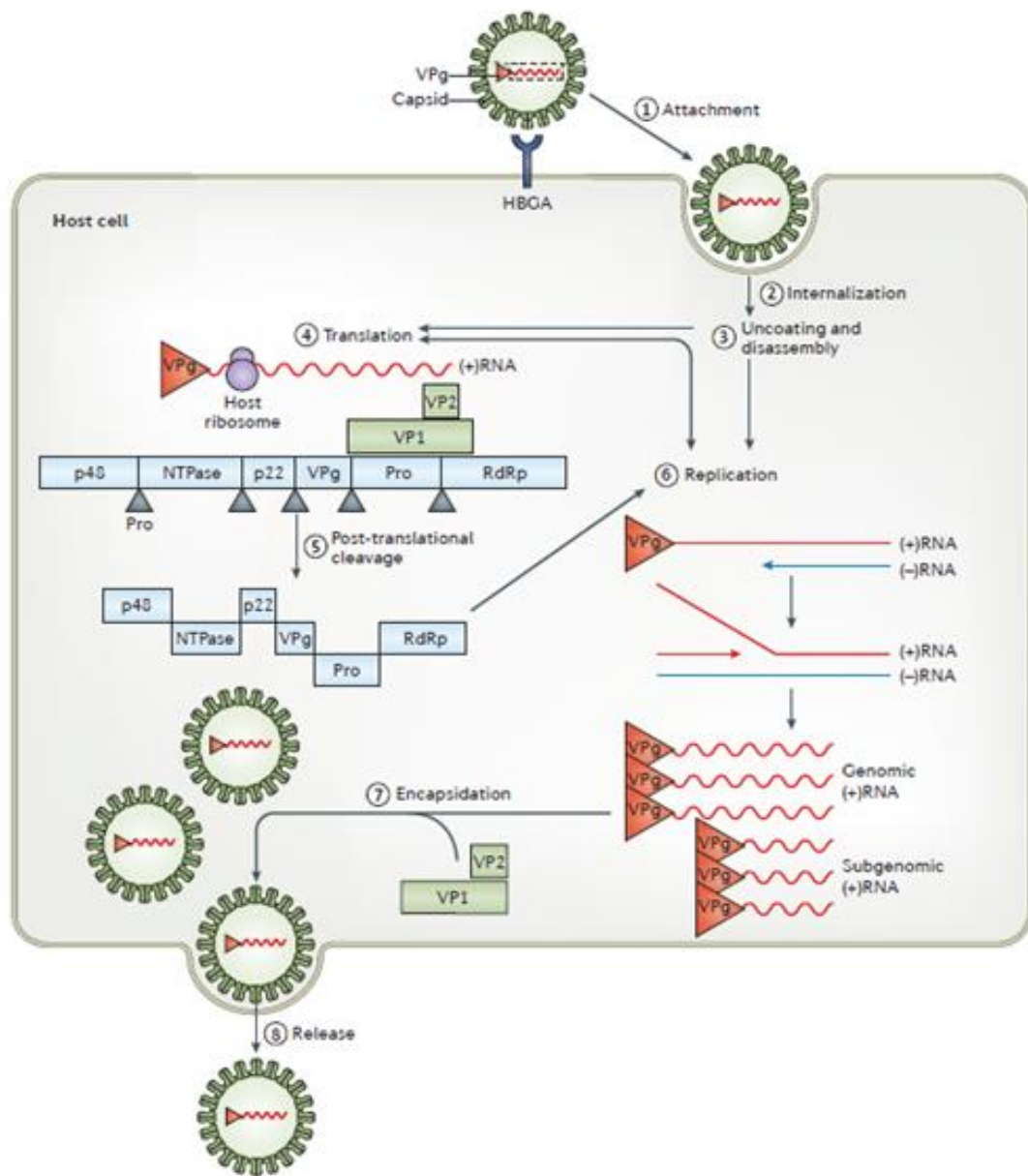


รูปที่ 4 แสดงสาเหตุการก่อให้เกิดโรคซึ่งมีความสัมพันธ์กับ genogroup ของ norovirus (54)

2.6 การเข้าสู่เซลล์โฮสต์

การเข้าไปในเซลล์ของไวรัสส่วนมากต้องการ receptor ที่จำเพาะบนผิวเซลล์เป้าหมาย เพื่อพาเข้าไปในเซลล์ที่อยู่บนผิวของเซลล์ และ receptor บนผิวเซลล์สำหรับ HuNoV ส่วนมากคือ Human Blood Group Antigen (HBGA) เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่มีไขมัน หรือโปรตีนเชื่อมกับไกลแคน (complex carbohydrates of lipid- or protein-linked glycan chains) พบได้ในเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์เยื่อบุลำไส้ และสารคัดหลั่งในร่างกาย (น้ำลาย) HuNoV จะอาศัย P dimer บนเปลือกจับที่แกนคาร์โบไฮเดรต ของ HBGA บริเวณ $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase (FUT2) enzyme (55) ซึ่งพบในกลุ่มที่เรียกว่า secretors จึงบอกได้ว่าในกลุ่มนี้จะเกิดการติดเชื้อ norovirus ได้ไวกว่ากลุ่ม non-secretor (56) แต่ใน MNV จะเข้าไปจับในตำแหน่งที่แตกต่าง โดย receptor อยู่บน

murine macrophage ที่บริเวณส่วนปลาย sialic acid of GD1a (57) ในการเข้าภายในเซลล์นั้น ยังคงอยู่ในระหว่างการศึกษาภายหลังจากประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน HuNoV ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเองได้ (58) มีการศึกษาใน MNoV พบว่าเกิด endocytosis โดยขึ้นกับ dynamin II, ceramide และ cholesterol (59) หลังจากเข้าไปในเซลล์โฮสต์กระบวนการทั้งหมดเกิดที่ cytoplasm เกิดการเอา casid protein ออกเพื่อให้สายพันธุกรรม หรือ RNA สายบวกสังเคราะห์โปรตีนตามสายพันธุกรรม เพื่อใช้ในการสร้างเอนไซม์ที่บริเวณใกล้กับ endoplasmic reticulum และเอนไซม์ Polymerase ของ norovirus จะแปลง RNA สายบวกเป็น RNA สายลบเพื่อเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรม สุกท้ายทั้ง 2 เกิดการรวมกันใหม่หรือเรียกกันว่า packaging และออกจากเซลล์โฮสต์ดังในรูปที่ 3 (36) สาเหตุที่เชื้อ HuNoV กระตุ้นให้เกิดอาการท้องเสียนั้นมีการศึกษาโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงของชั้นเนื้อบริเวณของลำไส้เล็ก พบว่าเชื้อจะเข้าบริเวณ villi ทำให้เซลล์บริเวณ villi นั้นถูกทำลาย และทุลงส่งผลให้เกิดการดูดซึมผิดปกติและเกิดท้องเสียตามมา และพบเชื้อ HuNoV อยู่ใน enterocyte ของลำไส้ จากการเลี้ยงเซลล์ด้วย Human Intestinal Enteroid (HIE) cultures (60) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยสภาพแวดล้อมภายในลำไส้ที่ยังมีการศึกษาว่าเป็นปัจจัยร่วมในการติดเชื้อหรือไม่ เช่น bile, intestinal microbiome, Ceramide เป็นต้น (61) intestinal microbiome หรือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างๆในร่างกาย จากการทดลองเชื่อว่าสกุลของแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อ HuNoV คือ Lactobacillus พบว่าเมื่อติดเชื้อ HuNoV จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ (62)



รูปที่ 5 แสดงวงจรชีวิตการเข้าไปในเซลล์ของเจ้าบ้านและเพิ่มจำนวนของ HuNoV (36)

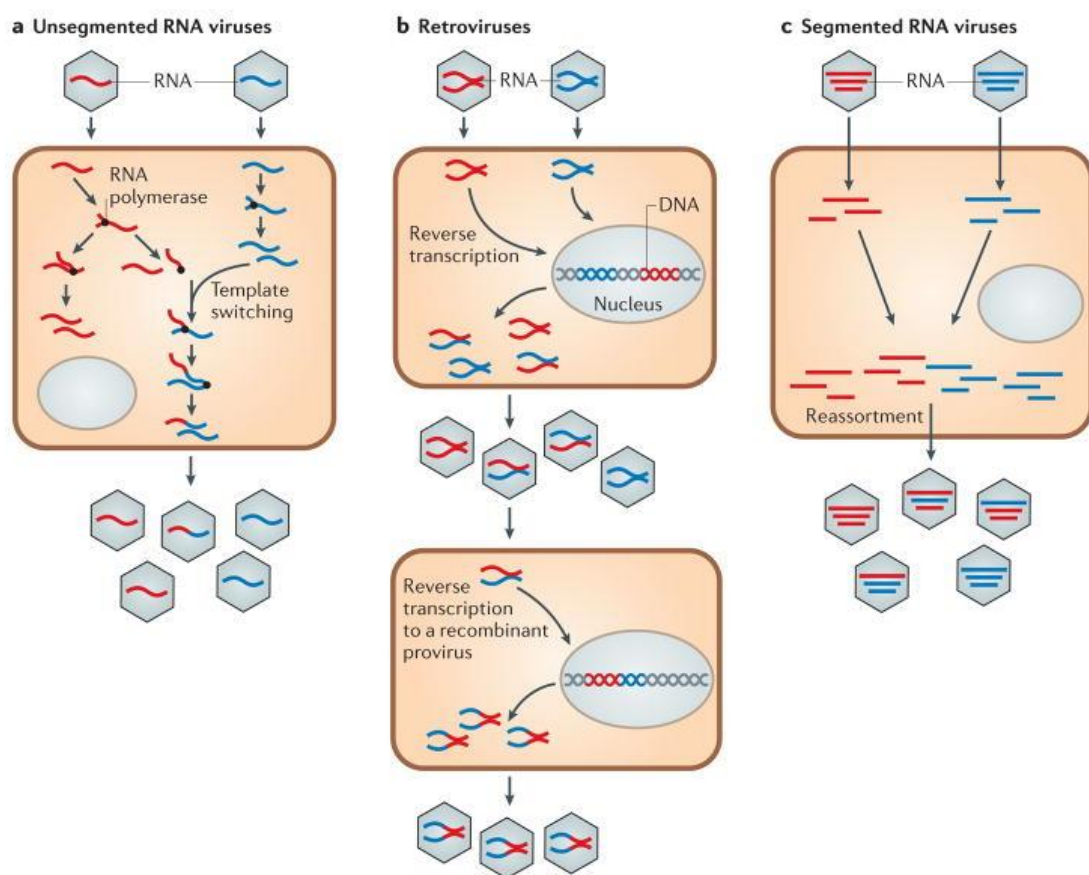
2.7 การวิวัฒนาการ

norovirus GII.4 Sydney 2012 พบการระบาดมากที่สุดตั้งแต่ปลายปี พ.ศ.2554 จนถึงปัจจุบัน ซึ่งนักวิจัยที่ทำการศึกษาใน norovirus เชื่อว่า norovirus สามารถเปลี่ยนแปลงตัวเองได้อย่างรวดเร็ว โดยทุกๆ 2-4 ปี (63) จะมีการเปลี่ยนสายพันธุ์ของ norovirus ที่เกิดการระบาดขึ้นมา โดยที่ผ่านมามีพบการระบาดหนักของ HuNoV ที่สำคัญอยู่ 6 ครั้งในปีพ.ศ. 2539-2540, 2545, 2547, 2549, 2552 และ 2555 (52) สายพันธุ์ที่พบการระบาดใหญ่ในแต่ละครั้งได้แก่ GII.4-US 1995/96, GII.4-Farmington Hills 2002, GII.4-Hunter 2004, GII.4-Yerseke 2006a, GII.4-Den Haag 2006b, GII.4-Osaka 2007, GII.4-Apeldoorn 2008, GII.4-New Orleans 2009 และ GII.4-Sydney 2012 ที่ยังพบได้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอาจเกิดได้จากหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันของโฮสต์ การต้านทานต่อยารักษา หรือเพื่อเพิ่มความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ เป็นต้น (11, 64) มีการรายงานว่า การวิวัฒนาการของเชื้อมักเกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ norovirus แบบเรื้อรังทำให้เป็นแหล่งรวมของเชื้อรวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ หรือเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมขึ้นได้ (47, 51)

2.8 Recombination

Viral recombination คือกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของไวรัสชนิดเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์กันส่งผลให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้นการเปลี่ยนแปลงถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติจนได้สายพันธุ์ที่มีความทนทานเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมและเซลล์ของเจ้าบ้าน โดยการจะเกิดขึ้นได้นั้นเซลล์เจ้าบ้านต้องมีการได้รับเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์เข้าไป (co-infection) การเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมพบได้มากใน RNA ไวรัสส่งผลให้เกิดการวิวัฒนาการ และการอุบัติใหม่ การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมนั้นไม่ขึ้นกับลักษณะของ genome เช่น segment หรือ non-segment โดย norovirus เป็น ssRNA non-segment genome มีการพบการเกิด Recombination ได้บ่อยบริเวณระหว่าง ORF1 และ ORF2 หรือ RdRp และ VP1 เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่มีความใกล้เคียงกันของสายพันธุกรรมใน genogroup เดียวกัน และมีการเกิด overlap หรือการซ้อนทับกันระหว่าง ORF1 และ ORF2 จำนวน 20 nt ใน genogroup 2 และ 17 nt ใน genogroup 1 (65)

สายพันธุ์ของ norovirus ที่มีการพบในประเทศไทยและมีการรายงานมาก่อนได้แก่ GII.P12/GII.1 GII.P12/GII.3 และ GII.P21/GII.3 เป็นต้น (66) การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมบางครั้งอาจก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมามากขึ้น เพิ่มการติดต่อ เช่น จากสัตว์สู่คน หรือสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมส่งผลให้แพร่ได้อย่างรวดเร็ว (53)



รูปที่ 6 รูปแบบการเกิด recombination ของ RNA ไวรัสในลักษณะ genome ที่แตกต่างกันซึ่งเกิดจาก co-infection ในเซลล์เดียวกัน

2.9 การศึกษาวิจัย

การผลิตวัคซีนในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการป้องกันเชื้อ norovirus เนื่องจากในปัจจุบันยังขาดการพัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อในเซลล์ (*in vitro*) รวมถึงการเลี้ยงในสัตว์ทดลอง

(*in vivo*) (12) ในอดีตมีความพยายามพัฒนาสภาพแวดล้อมในเซลล์ต่างๆมากมายเพื่อให้เชื้อ norovirus สามารถเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนขึ้นในเซลล์ (58) เช่น

Wobus CE, 2004 ประสบความสำเร็จในการเลี้ยง MNoV ใน STAT1 cell ซึ่งเป็น murine macrophages และ dendritic cells (67)

Lay MK, 2010 และ Jones MK, 2015 ได้พยายามเลี้ยงเชื้อ HuNoV ใน blood-derived macrophages และ dendritic cells แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมาได้ทำการเปลี่ยนเซลล์ที่ใช้เป็น human B cell lines หรือ BJAB system ซึ่งสามารถเลี้ยงได้ในบางสายพันธุ์เท่านั้นคือ GII.4 Sydney 2012 แต่จัดเป็นครั้งแรกที่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเชื้อ HuNoV (68, 69)

Ettayebi K, 2016 ประสบความสำเร็จในการเลี้ยง HuNoV ใน stem-cell-derived intestinal enteroids ซึ่งนำเซลล์มาจาก intestinal crypts ซึ่งเซลล์ที่ได้มีลักษณะเป็นเซลล์หลายชนิดรวมกัน หรือ multicellular สามารถทำให้มีการเพิ่มจำนวน และแสดง cytopathic effects (CPE) ออกมาได้ และไม่จำเพาะสายพันธุ์ที่สามารถโตได้ จัดว่าเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ของเชื้อ norovirus (61)

ถึงแม้จะสามารถเลี้ยง norovirus ในเซลล์ได้แล้ว แต่ก็ยังมีการศึกษาเพื่อให้สามารถเลี้ยงในเซลล์ที่ดูแลได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากกว่าเดิมเพื่อศึกษา norovirus ให้ละเอียดยิ่งขึ้น

2.10 วัคซีน

อุปสรรคในการผลิตวัคซีนนอกเหนือจากการขาดวิธีการเลี้ยงเชื้อ HuNoV ในเซลล์ (*in vitro*) รวมถึงการเลี้ยงในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ในการทำ virus neutralization เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมแล้วยังมีข้อจำกัดถึงระยะเวลากระตุ้นภูมิคุ้มกันให้อยู่ได้เป็นเวลานานหลังจากให้วัคซีนหรือได้รับเชื้อ norovirus เนื่องจากปกติหลังการติดเชื้อร่างกายกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่นานจึงทำให้มีโอกาสเกิดซ้ำได้ (70) และการวิวัฒนาการของตัวเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงในส่วน of antigenic ระหว่างภายใน genogroup และ genotype (71) โดยทุกๆ 2-4 ปีมักพบการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ที่กำลังระบาด

อยู่เรื่อยๆ ดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อการวิวัฒนาการ ตำแหน่ง antigenic ที่มีความสำคัญต่อการผลิตวัคซีนป้องกัน norovirus นั้นอยู่ที่บริเวณ P2 domain (hypervariable domain) เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนผิวของเชื้อ (72, 73) มีรายงานในอดีตหลายฉบับได้ทำการพยายามพัฒนาวัคซีนขึ้นมาเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันจากเชื้อ HuNoV ได้แก่

Harrington PR., 2002 จากสาเหตุที่ไม่สามารถทำ virus neutralization ได้จากการที่ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อขึ้นมาได้แต่ทว่ายังสามารถสร้าง virus-like particle (VLP) จากโปรตีนผิวของเชื้อ norovirus (ORF2) จึงได้พัฒนาวิธีการ the virus-like particle (VLP)-HBGA blockade assay ซึ่งจะจับตัว receptor ของไวรัสแทนการจับกับตัว antigen ของเชื้อไวรัสใช้ในการทดสอบ monoclonal antibodies และ sera เพื่อหาค่า titre ที่เหมาะสม (72)

มีการสร้างวัคซีนในการป้องกันสายพันธุ์ GI.1 หรือ Norwalk virus เพียงสายพันธุ์เดียว เป็น monovalent vaccine โดยให้ทาง nasal route ซึ่งมีการรายงานถึงประสิทธิภาพว่าป้องกันการติดเชื้อได้ถึง 47% (95% CI, 15%–67%) และลดความรุนแรงจากการติดเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยดูจาก modified Vesikari score ตั้งแต่ 5.5 ถึง 3.6 ($P = .009$) ต่อมามีการศึกษาวัคซีนที่ป้องกันได้ 2 สายพันธุ์ (bivalent vaccine) คือสามารถป้องกันได้ทั้งสายพันธุ์ GI.1 และ GII.4 ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยให้ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) ตัววัคซีนมาจากกรดอะมิโน 19 ตัวใน P2 domain หรือ hypervariable domain บน ORF2 และวัคซีนดังกล่าวครอบคลุม GII.4 สายพันธุ์ต่างๆ รวมถึง GII.4 Sydney 2012 strain (5, 74)

มีรายงานออกมาบอกถึงความสำเร็จในการสร้างวัคซีน แต่อย่างทีกล่าวไปข้างต้นส่วนมากอยู่ระหว่างการศึกษา ข้อมูลยังไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้จริง อีกทั้งเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ในการระบาดวัคซีนที่ผลิตมาอาจลดประสิทธิภาพลงไปอีก ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับการระบาดก็เป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการผลิตวัคซีนเช่นกัน (5)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ case-control study ซึ่งได้รับการพิจารณาและการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) หมายเลข IRB 638/59

3.2 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้คือ อูจจาละของผู้ป่วยที่หลีกเลี่ยงการเข้ารับการรักษาด้วยอาการลำไส้อักเสบเฉียบพลัน มีอาการท้องเสีย และนำมารวบรวมหรือส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการดังกล่าว ตัวอย่างเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลในเครือข่ายบางปะกอก กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 โดยข้อมูลของผู้ป่วยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้จะถูกปกปิดในรูปนิรนาม เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายต่อผู้ป่วย

3.3 จำนวนประชากร

จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกคำนวณจากสมการ Cochran's samples size formular

จากสูตร
$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

โดยที่ n คือ จำนวนตัวอย่างขั้นต่ำที่ใช้ในการศึกษา

Z คือ ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่าเท่ากับ 1.96

p คือ อัตราการติดเชื้อ HuNoV จากการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้ามีค่าเท่ากับร้อยละ 15.9 (75)

q คือ 1-p

d คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมีค่าเท่ากับ 2%

แทนค่า

$$n = \frac{(1.960)^2(0.159)(1-0.159)}{\left(\frac{2}{100}\right)^2} = 1284.237$$

ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้ในการศึกษานี้ น้อยที่สุดและเหมาะสม โดยมีความผิดพลาดไม่เกิน ร้อยละ 2 จำนวนเท่ากับ 1285 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนขั้นต่ำที่สุดของตัวอย่างอูจจาระที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อของ HuNoV ในผู้ป่วยที่มีอาการลำไส้อักเสบเฉียบพลันในประเทศไทย

3.4 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Autoclave (Harvey, USA)
2. Automatic adjustable micropipette 2.5, 10, 20, 200, 1000 μ l (Eppendorf, Germany)
3. Biological Safety Cabinets Class II (Esco Labculture, Singapore)
4. Block heater (Lab Line instrument, USA)
5. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
6. Electrophoresis chamber (BioRAD, USA)
7. Freezer 4°C (Misubishi, Japan)
8. Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
9. Gel Documentation System (BioRAD, USA)

10. Laboratory bottle 1000 ml (Duran, Germany)
11. Magnetic stirrer (Thermolyne, USA)
12. Microcentrifuge tube 0.5, 1.5, 2.0 μ l (Axygen, USA)
13. NanoDrop UV-Vis spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
14. PCR Mastercycler personal; Veritii™ (Applied Biosystems, USA)
15. PCR Tubes (Axygen, USA))
16. Polypropylene conical tube 15 ml (SPL lifesciences, Korea)
17. Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
18. Vortex mixer (Scientific industry, USA)

3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA (RNA extraction)

1. Ethanol (Emsure, Germany)
2. Phosphate buffered saline: PBS Tablets (EMD, Germany)
3. Ribospin vRD™ II kit (Geneall, Korea)

3.4.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA

1. AmpMaster™ HS-Taq MasterMix (GeneAL, Korea)
2. DEPC (Diethylpyrocarbonate)
3. ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA)
4. 2X MasterMix (AmpMaster™ HS-Taq, GeneAll®)
5. Nuclease-free water
6. Random Primers (Promega, USA)
7. Specific primer (BioDesign, Thailand; 1st BASE CUSTOM OLIGOS, Singapore)

3.4.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis และ สกัด cDNA ออกจาก gel

1. Agarose (EMD, Germany)
2. Boric acid (Emsure, Germany)
3. Ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA (USB, Hong Kong)
4. FluoroDye DNA Fluorescent Loading Dye (SMOBIO, Taiwan)
5. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (EMD, Germany)
6. GeneAll Expin Combo GP - Gel and PCR kit (GeneAL, Korea)

3.5 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 การวิเคราะห์ข้อมูล sequencing

1. BioEdit version 7.2.5 (Hall T.A., 1999)
2. MEGA version 7.0.14 (Kumar, Stecher, and Tamura 2015)
3. Seqman version 6.00 (DNASTAR Inc.)
4. Simplot version 3.5.1 (Stuart C.R.)
5. PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (แถนuel H, Forster P, Röhl A (1999).)

3.5.2 การจัดเก็บข้อมูล และข้อมูลทางสถิติ

1. Microsoft Office of Computer Services
2. SPSS

3.6 วิธีดำเนินการวิจัย

3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

การรับตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการลำไส้อักเสบเฉียบพลัน หรือมีอาการท้องเสีย ถูกขนส่งโดยรักษาอุณหภูมิตั้งไว้ที่ 4°C จากโรงพยาบาล 3 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (กรุงเทพมหานคร) โรงพยาบาลชุมแพ (ขอนแก่น) และโรงพยาบาลในเครือบางปะกอก (กรุงเทพมหานคร) ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บในรูปนิรนาม และนำมากำหนดเป็นรหัส ข้อมูลของผู้ป่วยที่ถูกบันทึกได้แก่ เพศ อายุ และวันที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย ตัวอย่างอุจจาระจะถูกนำมาเจือจางด้วย 0.1% PBS (Phosphate Buffer Saline) ในอัตราส่วน 9 ต่อตัวอย่างอุจจาระ 1 ส่วน ในหลอดทดลอง นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm (round per minute) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเก็บส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml และนำ supernatant ของตัวอย่างไปเก็บรักษาภายในตู้แช่แข็งอุณหภูมิตั้งไว้ที่ -70°C

3.6.2 การสกัดสารพันธุกรรม

การสกัดสารพันธุกรรมโดยสารพันธุกรรมของ norovirus เป็น RNA (Ribonucleic acid) การศึกษานี้เลือกใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Ribospin™ vRDII kit (GeneAll, Seoul, Korea) ปฏิบัติตามคู่มือการใช้ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เติมน้ำ buffer NVL 300 µl ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ผสมกับ 1 µM carrier RNA 7 µl (carrier RNA 370 µg ละลายด้วย nuclease-free water 370 µl เก็บรักษาที่ -20°C)
2. เติมน้ำ supernatant ที่ได้จากตัวอย่าง 100 µl นำไปเขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
3. เติมน้ำ buffer RB1 350 µl และนำไปเขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer
4. ย้ายสารทั้งหมด 750 µl ลงใน spin column

5. ปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 วินาที ที่สารละลายที่อยู่ใน collection tube
6. เติม buffer RBW 500 μl ลงใน spin column
7. ปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 วินาที ที่สารละลายที่อยู่ใน collection tube
8. เติม buffer RNW 500 μl ลงใน spin column
9. ปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 วินาที ที่สารละลายที่อยู่ใน collection tube
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ที่ collection tube
11. ย้าย spin column มาใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
12. เติม nuclease-free water 40 μl และตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
13. ปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที ที่ spin column
14. เก็บ RNA ที่ได้จากตัวอย่างในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C

3.6.3 การแปลงสารพันธุกรรมจาก RNA เป็น cDNA

การเปลี่ยนสายพันธุกรรมจาก RNA ให้เกิดเป็น cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) โดยการศึกษานี้อาศัยเอนไซม์ Reverse transcriptase จาก Improm II™ (Promega, Madison, WI, USA) ซึ่งเป็น RNA dependent DNA polymerase enzyme จาก virus ในกลุ่มของ retrovirus ประกอบด้วย avian myeloblastosis virus (AMV) และ murine leukemia virus (MLV) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เติม 10 nM Random hexamer 1 μl ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เจือจางด้วย DEPC (Diethylpyrocarbonate) ปริมาตร 5 μl
2. เติม RNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยก่อนหน้าปริมาตร 5 μl
3. บ่มโดยวางลงบน heat box อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที
4. นำไปบ่มต่อที่ความเย็นโดยวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นตก
5. เติม Improm II™ ปริมาณ 15 μl ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
6. นำไปบ่มโดยวางลงบน heat box อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. ย้ายไปบ่มบน heat box ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นตก

8. เก็บรักษา cDNA ที่ -20°C รอนำไปการทดลองต่อไป

3.6.4 การตรวจหาตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HuNoV ที่ตำแหน่ง RdRp gene

นำ cDNA ตัวอย่างมาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งบางส่วนของ RdRp gene มีความยาวประมาณ 500 nt (nucleotide) ด้วยวิธี semi-nested PCR เป็นการทำให้ PCR 2 รอบ ซึ่งอัตราส่วนในการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1 บรรจุภายใน PCR tube ใช้ Forward primer ตัวเดียวกันทั้ง 2 รอบ แต่ Reverse primer ในแต่ละรอบมีความแตกต่างกัน primer ที่จำเพาะทั้ง 3 ตัว ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 2 ในรอบแรกของการทำ PCR ใช้ Reverse primer ที่มีชื่อว่า “HNoV-R5591” และรอบที่ 2 ใช้ Reverse primer ที่มีชื่อว่า “HNoV-R5393” หลังจากเตรียมสารเคมีลงใน PCR tube ปั่นตอกและนำไปใส่ในเครื่อง PCR Mastercycler personal; Veritii™ สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของ PCR แสดงไว้ในตารางที่ 3 ในทุกครั้งจะมีการยืนยันโดยการทำให้ positive control และ negative control ควบคู่ไปด้วย

ตารางที่ 1 สารเคมี ปริมาตร และความเข้มข้นที่ใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง

สารเคมี	ปริมาตร (μl / tube)	Final concentration
2X MasterMix	6	1X
10 μM Forward primer(s)	0.3	0.24 μM
10 μM Reverse primer(s)	0.3	0.24 μM
DEPC treated water	4	
cDNA	2	
Total volume	12.6	

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะต่อ HuNoV ในตำแหน่งบางส่วนของ RdRp gene

Type	Name	Sequence 5' - 3'	round
Forward primer	HNoV-F4895	YDS TTY TCH TTY TAY GGK GAY GAT GA	1 st , 2 nd
Reverse primer	HNoV-R5591	AWT CGG GCA RGA GAT YGC GAT C	1 st
Reverse primer	HNoV-R5393	GCC TGY ACA AAR TTA TTS ATT ATC CA	2 nd

หมายเหตุ: N = A/G/T/C, D = A/G/T, H = A/C/T, S = C/G, Y = C/T, K = G/T, W = A/T

ตารางที่ 3 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนในตำแหน่งบางส่วนของ RdRp gene

กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	94	3 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 40 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	

หลังจากกระบวนการ PCR เสร็จสิ้น ผลผลิตจาก PCR แยกตามความยาวของนิวคลีโอไทด์ ด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ (Voltage) ในช่วง 100 V และคงค่าความต้านทานไฟฟ้า (Current) ไว้ที่ 300 mA เคลื่อนที่ผ่าน TBE (Tris-borate-EDTA) buffer ใน Electrophoresis chamber โดยก่อนนำผลของ PCR ใส่ลงในหลุม 2% Agarose gel ใส่สีย้อม FluoroDye DNA Fluorescent Loading Dye ประมาณ 3-4 μ l และเติม 100 bp ladder DNA (DNA marker) ลงไปอย่างน้อย 1 หลุม หลังจากปล่อยให้กระแสไฟฟ้าผ่านแล้วเป็น

ระยะเวลาหนึ่งจนนิวคลีโอไทด์แยกตัวได้ชัดเจน แต่ไม่หลุดออกจากแผ่นเจล นำแผ่นเจลออกมาจาก Electrophoresis chamber และส่องภายใต้แสง UV โดยอาศัยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation system) ซึ่งผลที่ได้จะเทียบกับ DNA marker ผลของ PCR ในการเพิ่มจำนวนที่บางส่วนของตำแหน่ง RdRp gene จะอยู่ที่ประมาณ 500 bp

3.6.5 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HuNoV โดยอาศัยบางส่วนของตำแหน่ง VP1 gene

นำตัวอย่าง cDNA ซึ่งให้ผลว่าติดเชื้อ HuNoV (+ve HuNoV) มาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบางส่วนของตำแหน่ง VP1 gene ด้วยวิธี nested PCR อัตราส่วนในการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยที่ใช้ Forward primer และ Reverse primer แตกต่างกันในแต่ละรอบโดยแต่ละรอบมี primer ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 4 และ 6 หลังจากเตรียมสารเคมีลงใน PCR tube นำไปปั่นตกและนำไปใส่ในเครื่อง PCR Mastercycler personal; Veritii™ สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ทั้ง 2 รอบนั้นมีความแตกต่างกันที่อุณหภูมิในกระบวนการ Annealing ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 7 ในทุกครั้งจะมีการควบคุมโดยการทำให้ positive control และ negative control ควบคู่ไปด้วย

ตารางที่ 4 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene ของ HuNoV ในรอบที่ 1

Type	Name	Sequence 5' - 3'
Forward primer	HNoV-NV2oF2	GGA GGG CGA TCG CAA TC
Reverse primer	HNoV-NV2oR	GTR AAC GCR TTY CCM GC

ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene รอบที่ 1

กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	94	3 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 40 cycles
Annealing	50	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	

ตารางที่ 6 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene ของ HuNoV รอบที่ 2

Type	Name	Sequence 5' - 3'
Forward primer	HNoV-G2F3	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG A
Reverse primer	HNoV-G2SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT

ตารางที่ 7 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนในตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene รอบที่ 2

กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	94	3 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 40 cycles
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	

หลังจาก PCR เสร็จสิ้น นำผลจาก PCR มาแยกความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านวิธี Agarose gel electrophoresis เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปในส่วนของการเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมบางส่วนของ RdRp gene โดยผลของ PCR ในการเพิ่มจำนวนที่ตำแหน่งบางส่วนของ VP1 gene จะอยู่ที่ประมาณ 320 bp

3.6.6 การสกัดผลของ PCR ให้บริสุทธิ์

หลังจากการทำ Gel electrophoresis และตรวจด้วย gel documentation ภายใต้แสง UV จากนั้นตัดเจลในแถบที่มีขนาดตรงกับ positive control หรือแถบที่เท่ากับขนาดที่ต้องการเมื่อเทียบกับ DNA marker ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml และนำไปสกัดให้ได้นิวคลีโอไทด์บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GeneAll Expin Combo GP - Gel and PCR kit โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เติมสารละลาย GB buffer 500 μ l เพื่อละลายเจล
2. บ่มใน heat box ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือเจลละลายหมด
3. ดูดสารละลายทั้งหมดย้ายลงใน SV column (column filter)
4. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่สารละลายที่อยู่ใน collection tube
5. เติม NW buffer 700 μ l ลงใน SV column

6. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ที่สารละลายที่อยู่ใน collection tube
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg ซ้ำเป็นเวลา 1 นาที
8. ย้าย SV column ลงใน microcentrifuge tube
9. เติม elution buffer ประมาณ 40-50 μ l ที่ไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg ซ้ำเป็นเวลา 2 นาที เก็บนิวคลีโอไทด์ที่ได้ที่ 4°C

3.6.7 การถอดรหัสนิวคลีโอไทด์

นำนิวคลีโอไทด์ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้ NanoDrop UV-Vis spectrophotometers วัดค่าการดูดกลืนแสง DNA/RNA ในช่วงของ UV ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 nm และค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะถูกแปลงเป็นความเข้มข้นของ DNA โดยอาศัยสมการ $\text{DNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = (\text{A}_{260} \text{ reading} - \text{A}_{320} \text{ reading}) \times \text{dilution factor} \times 50 \mu\text{g/ml}$ เพื่อดูว่าความเข้มข้นเหมาะสมเพียงพอต่อการส่งไปถอดรหัสนิวคลีโอไทด์โดยควรมีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำการจัดส่งไปที่บริษัท First Base laboratory ประเทศมาเลเซีย ด้วยเทคนิค Sanger sequencing โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อตัวอย่างที่ส่งหรือ gene ที่ต้องการตรวจ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์จะถูกอ่านด้วยซอฟต์แวร์ BioEdit เพื่อตรวจสอบในลำดับถัดไป

3.6.8 ระบุ genotype จากตัวอย่างที่ติดเชื้อ HuNoV

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก First Base laboratory ไปเทียบในฐานข้อมูล GenBank โดยเปรียบเทียบกับ nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=blastSearch) เพื่อระบุ genogroup genotype และสายพันธุ์ ของ HuNoV โดยระบุได้จากค่า Identity ที่สูงที่สุดโดยตรวจทั้ง RdRp gene และ VP1 gene หากตัวอย่างเดียวกันแต่ระบุ genotype ต่างกันใน 2 ยีนจัดว่าเป็น recombination จากนั้นทำการยืนยันโดยการทำ phylogenetic tree จากซอฟต์แวร์ MEGA version 7 และหาสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยเลือก genogroup genotype ที่แตกต่างกันรวมถึง Recombination ที่เคยพบมาก่อนจากทั่วโลกและได้ทำการเผยแพร่ในรูปแบบของ complete genome คำที่เลือกใช้ในการค้นคือ “norovirus and

complete genome” เก็บข้อมูล accession number รหัสตัวอย่าง สายพันธุ์ ปีที่พบและประเทศ สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยจากตัวอย่างผู้ป่วยจะเลือกในทุกๆ genogroup และ genotype และทำการสุ่มตัวอย่างที่จะใส่ลงไปใน phylogenetic tree

3.6.9 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HuNoV GII.17 ตำแหน่ง complete VP1 gene

เลือกตัวอย่างที่ถูกระบุแล้วว่าเป็น HuNoV GII.17 มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี semi-nested PCR โดย primer ที่ใช้ออกแบบจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GII.17 ที่เผยแพร่ไว้ในฐานข้อมูล GenBank มาอ้างอิง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่นี้แสดงในตารางที่ 8 การทำ semi-nested PCR รอบแรกอาศัย primer F_RdRp_5021-5043 คู่กับ R_VP2_6893-6918 และในรอบที่ 2 จะทำการแยกเป็น 2 ชุด (a และ b) ชุด a อาศัย primer F_RdRp_5021-5043 คู่กับ R_VP1_6033-6052 ชุด b อาศัย primer F_VP1_5901-5922 คู่กับ R_VP2_6893-6918 สภาวะในเครื่อง PCR Mastercycler personal; Veritii™ ทุกปฏิกิริยาทั้ง 2 รอบใช้สภาวะเดียวกันซึ่งแสดงในตารางที่ 9 จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ และอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยขนาดของ VP1 gene ชุด a และ b จะมีค่าประมาณ 1032 และ 1018 bp

ตารางที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่จำเพาะต่อ HuNoV ในตำแหน่ง complete VP1 gene

Type	Name	Sequence 5' - 3'	Round
Forward primer	F_RdRp_5021-5043	ATGTTTCAGATGGATGAGRTTCTC	1, a
Reverse primer	R_VP1_6033-6052	CCAAGTATGATGTGCCAGC	a
Forward primer	F_VP1_5901-5922	GGTGAGTTACAAGGCACAACCC	b
Reverse primer	R_VP2_6893-6918	CCTTTCAGCATGATAAAGAGATG	1, b

ตารางที่ 9 แสดงสถานะของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนในตำแหน่ง complete VP1 gene

กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	94	3 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 40 cycles
Annealing	58	30 วินาที	
Extension	72	1.5 นาที	
Final extension	72	10 นาที	

3.6.10 เรียบเรียงข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ HuNoV ที่พบในตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยจากตำแหน่งบางส่วนของ RdRp, VP1 gene และ complete VP1 gene ที่ได้จากการทดลองนี้จะถูกเผยแพร่บนฐานข้อมูลของ Genbank, NCBI

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.6.11 การตรวจประสิทธิภาพของชุดทดสอบแบบรวดเร็วเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR

รวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจด้วยชุดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจสอบ HuNoV ด้วย QuickNavi™-Norovirus2 (Denka Seiken Co., Ltd.) จากโรงพยาบาลในเครือข่ายปะกอกแล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาทำการตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี RT-PCR ตามที่ได้กล่าวไปก่อนหน้าในการตรวจ RdRp และ VP1 gene

3.6.12 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

- ข้อมูลประวัติของผู้ป่วยที่ได้ให้ตัวอย่างมาจากแหล่งต่างๆถูกระบุไว้พร้อมกับตัวอย่างที่ส่งมาสู่ห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาทางคลินิก ผู้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลและบันทึกข้อมูลคือ เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ
- ผู้ตรวจหาตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HuNoV คือ ผู้ดำเนินการวิจัย
- ผู้รวบรวมข้อมูลทางชีวโมเลกุลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย

3.6.13 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

หลังจากทราบ genotype ของ HuNoV จาก RdRp และ VP1 gene ผ่าน nucleotide Blast แล้วและยืนยันผ่านการทำ phylogenetic tree กับสายพันธุ์อ้างอิงที่พบจากที่ต่างๆที่เคยเผยแพร่มาก่อนในฐานข้อมูลของ GenBank ข้อมูลของผู้ป่วยและผลที่ได้ทั้งหมดถูกรวบรวมโดยอาศัยซอฟต์แวร์ microsoft excel และ SPSS นำไปวิเคราะห์เพื่อหาความชุกของ genotype ภายในแต่ละเดือนในระยะเวลาตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 รวมถึงความสัมพันธ์ต่างๆระหว่างสายพันธุ์กับกลุ่มอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HuNoV

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ complete VP1 gene ของ HuNoV GII.17 ที่จะถูกนำไปหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนโดยการเทียบความแตกต่างกับฐานข้อมูลของ complete VP1 gene ของ GII.17 ทั้งในอดีตและปัจจุบันที่มีการตีพิมพ์จากที่ต่างๆ เพื่อนำมาอ้างอิงซอฟต์แวร์ที่เลือกใช้ได้แก่ BioEdit, Seqman และ MEGA 7.0

BioEdit ช่วยในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก First Base Laboratory สามารถดัดแปลงแก้ไขและจัดเรียงเทียบความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงที่หามา ค่าที่ได้คือ Identity และดูความแตกต่างของกรดอะมิโนในกลุ่มของตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยทั้งหมดที่พบในประเทศไทยระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559

Seqman ช่วยในการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ (contig sequence) ที่เกิดจากการแยกเป็น 2 ชุด ในการเพิ่มจำนวน complete VP1 gene ของ HuNoV GII.17 รอบที่ (a, b) ที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ให้ เชื่อมเป็นเส้นเดียวเกิด VP1 gene ของ HuNoV GII.17 ที่สมบูรณ์

MEGA 7.0 ช่วยในการสร้าง phylogenetic tree ที่แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ HuNoV GII.17 ตำแหน่ง VP1 gene กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HuNoV GII.17 อ้างอิงจาก ฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน

ArtPop เป็นการทำให้ phylogenetic tree ลักษณะหนึ่งเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของลำดับ nucleotide เพื่อหาต้นกำเนิดและทำนายแนวโน้มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะเปลี่ยนแปลงในอนาคต

ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของชุดทดสอบแบบรวดเร็วทำการวิเคราะห์โดยข้อมูลที่ต้องการ ได้แก่

- True positive (TP): ตรวจพบเชื้อ HuNoV ทั้งในชุดทดสอบแบบรวดเร็วและวิธี RT-PCR
- False positive (FP): ตรวจพบเชื้อ HuNoV ในชุดทดสอบแบบรวดเร็ว แต่ไม่พบในวิธี RT-PCR
- True negative (TN): ตรวจไม่พบเชื้อ HuNoV ทั้งในชุดทดสอบแบบรวดเร็วและวิธี RT-PCR
- False negative (FN): ตรวจไม่พบเชื้อ HuNoV ในชุดทดสอบแบบรวดเร็ว แต่พบในวิธี RT-PCR

ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์เพื่อหาค่าที่ต้องการ ได้แก่

- ความแม่นยำ (accuracy) = $TP+TN/(TP+FP+TN+FN)$
- ความไว (sensitivity) = $TP/(TP+FN)$
- ความจำเพาะ (specificity) = $TN/(TN+FP)$
- ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value (PPV)) = $TP/(TP+FP)$
- ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value (PPN)) = $TN/(TN+FN)$

บทที่ 4

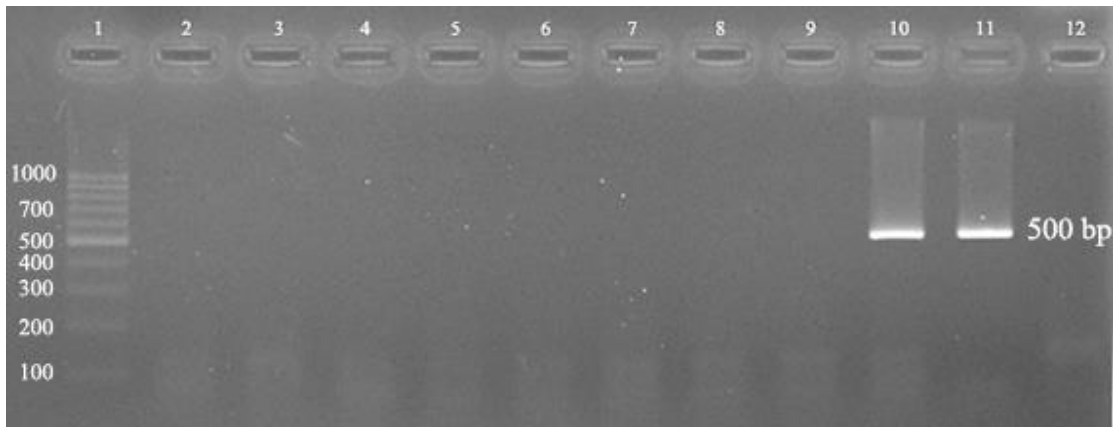
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การจัดการตัวอย่างอุจจาระ

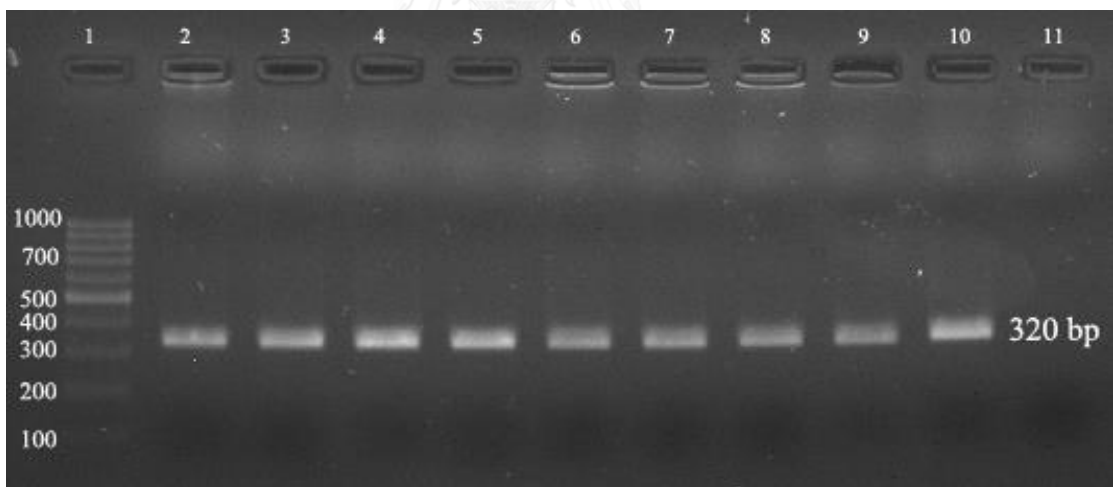
ตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย มีอาการท้องเสีย และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่สามารถ จัดหาได้ทั้งหมดจำนวน 1391 ตัวอย่าง ได้รับจากโรงพยาบาล 3 แห่งคือ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลในเครือบางประกอกอินเตอร์เนชั่นแนล กรุงเทพมหานคร และโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ตัวอย่างได้ส่งมายังที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก โดยส่งมาเป็น รหัสสนิรนาม ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้อำนวยการโรงพยาบาล และ ได้รับการอนุมัติอยู่ภายใต้การควบคุมของคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB 634/59)

4.2 การตรวจหาความชุกของ norovirus ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 โดยเทคนิค nested RT-PCR

จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันจำนวน 1391 ตัวอย่าง (พ.ศ. 2558 ตัวอย่างจำนวน 448 ตัวอย่าง และในปี พ.ศ. 2559 ตัวอย่างจำนวน 943 ตัวอย่าง) ที่ผ่านการ สกัดเอาสารพันธุกรรมนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของ norovirus ด้วยเทคนิค nested RT-PCR ที่ ตำแหน่งบน RdRp และ VP1 gene เมื่อนำมาแยกด้วย agarose gel electrophoresis จะได้ขนาด ผลิตภัณฑ์ที่ 500 และ 320 bp ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 7 และ 8 พบตัวอย่างปนเปื้อน HuNoV จำนวน 184 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 13.2 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยในปี พ.ศ. 2558 พบ ตัวอย่างที่ปนเปื้อน norovirus จำนวน 50 ตัวอย่างหรือร้อยละ 11.16 ส่วนในปี พ.ศ.2559 พบ ตัวอย่างที่ปนเปื้อน norovirus จำนวน 134 ตัวอย่างหรือร้อยละ 14.21 ซึ่งทั้ง 2 ปีพบการระบาดมาก ในช่วงของต้นฤดูหนาวหรือเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม



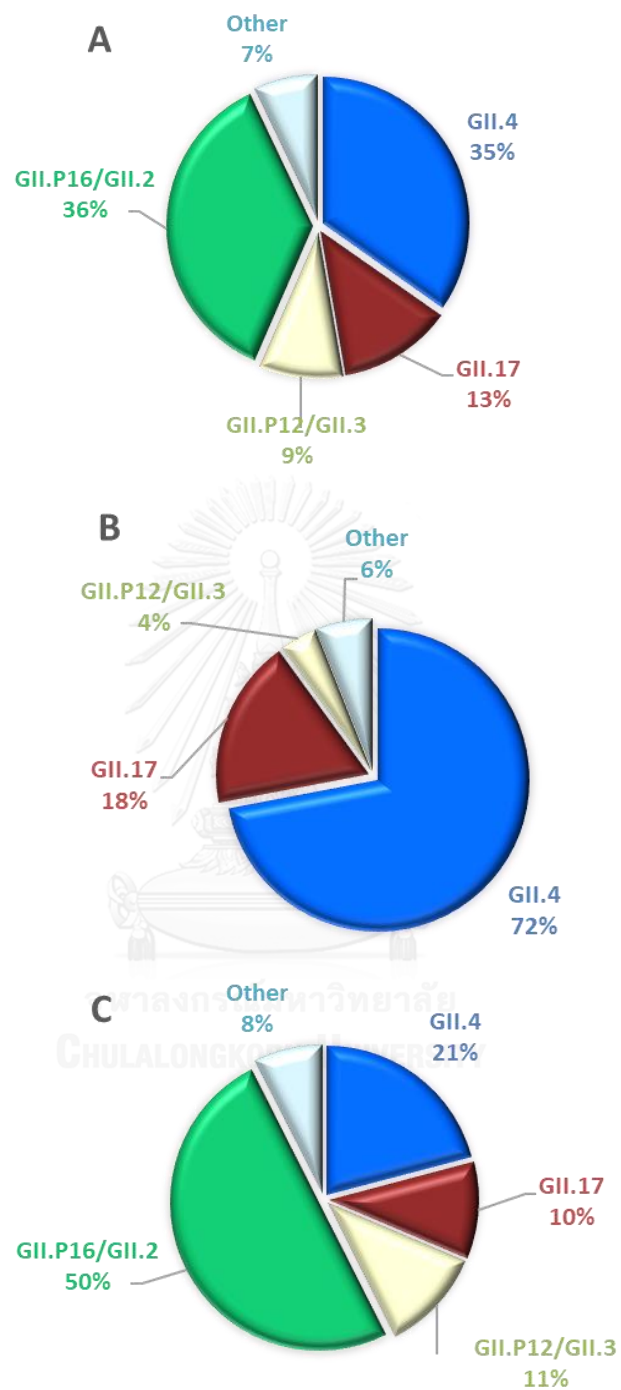
รูปที่ 7 ตัวอย่างผลของผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR บน 2% gel agarose ในตำแหน่งของยีนบน ORF1 หรือ RdRp โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder แถวที่ 2-10 คือ ผลการตรวจหา norovirus ในกลุ่มตัวอย่างซึ่งพบว่าการติดเชื้อ norovirus ในตัวอย่างที่ 10 และแถวที่ 11 และ 12 คือ Positive control และ Negative control ตามลำดับ



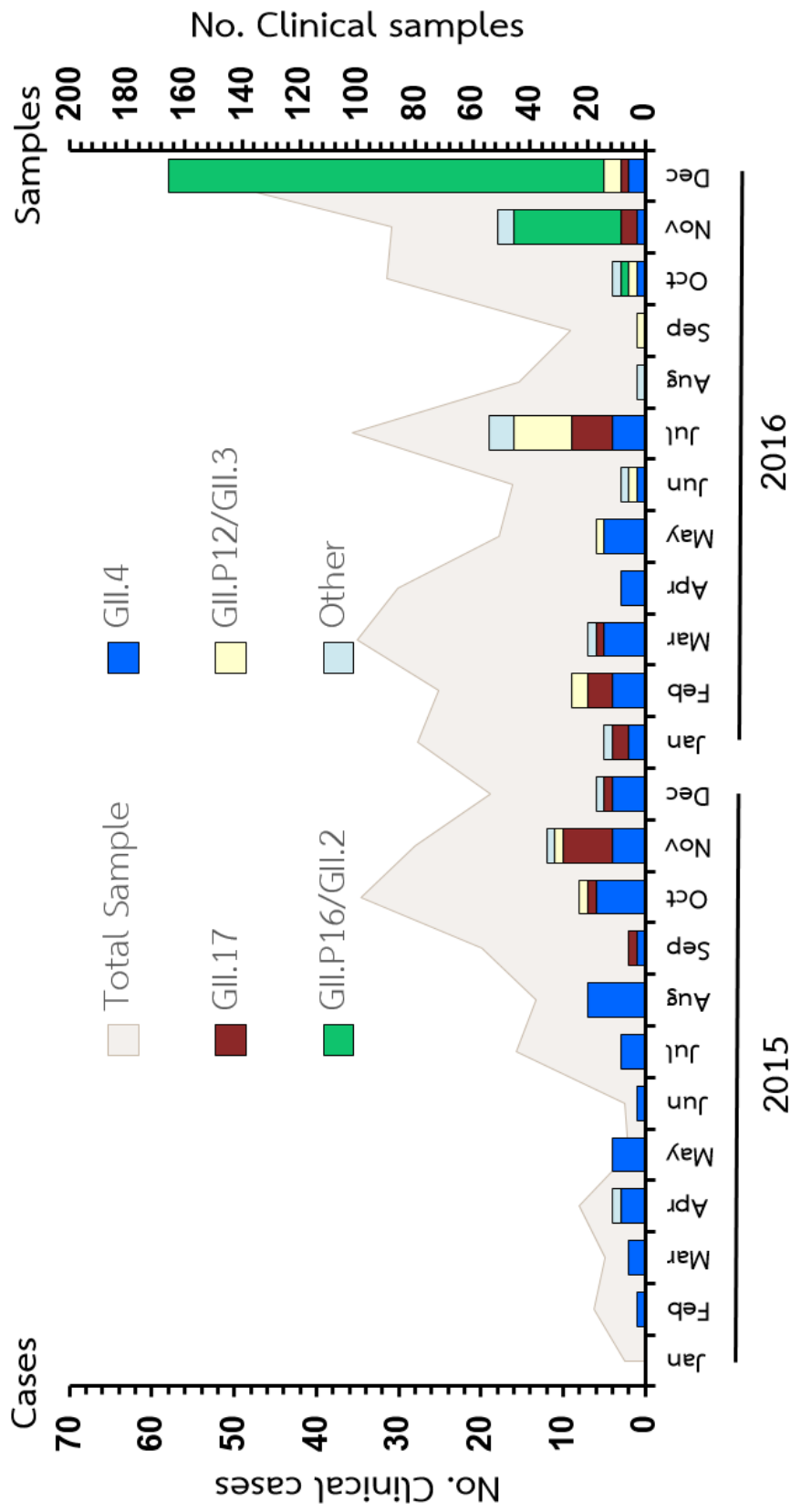
รูปที่ 8 ตัวอย่างผลของผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR บน 2% gel agarose ในตำแหน่งของยีนบน ORF2 หรือ VP1 โดยแถวที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder แถวที่ 2-10 คือ ผลการตรวจหา VP1 ของ norovirus ในกลุ่มตัวอย่างที่พบว่าการติดเชื้อ norovirus จากการตรวจหา ยีน RdRp และแถวที่ 11 คือ Negative control ตามลำดับ

4.3 การตรวจสอบสายพันธุ์ของ norovirus ที่พบในประเทศไทย

จากการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยเทคนิค Sanger sequencing ของตัวอย่างที่ปนเปื้อน norovirus จำนวน 184 ตัวอย่าง ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล (nucleotide blast) กับฐานข้อมูลภายใน GenBank พบสายพันธุ์ของ norovirus ที่ระบาดในผู้ป่วยด้วยลำไส้อักเสบเฉียบพลันในประเทศไทยอยู่ใน genogroup 2 เท่านั้นแบ่งเป็น 10 genotypes ประกอบไปด้วย GII.4 จำนวน 64 ตัวอย่าง (34.78%) GII.17 จำนวน 23 ตัวอย่าง (12.50%) GII.P12/GII.3 จำนวน 17 ตัวอย่าง (9.24%) GII.P16/GII.2 จำนวน 67 ตัวอย่าง (36.41%) GII.7 จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.54%) GII.15 จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.09%) GII.16 จำนวน 3 ตัวอย่าง (1.63) GII.P7/GII.6 จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.09%) GII.P7/GII.14 จำนวน 4 ตัวอย่าง (2.17%) และ GII.P16/GII.4 จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.54%) แสดงเป็นสัดส่วนได้ในรูปที่ 9 การระบาดของสายพันธุ์ GII.17 พบครั้งแรกในเดือนกันยายน พ.ศ. 2558 พบสูงสุดในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2558 และพบเรื่อยมา การระบาดของ HuNoV พบสูงสุดในเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 ร้อยละ 36.5 ของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้รับในเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ GII.P16/GII.2 ร้อยละ 91.38 ของผลบวก HuNoV ทั้งหมดในเดือนธันวาคม พ.ศ.2559



รูปที่ 9 Pie chart แสดงอัตราส่วนของตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของ norovirus โดยแยกเป็น genotype ต่างๆที่พบ A.) แสดงสายพันธุ์ของ norovirus ที่พบในช่วงปี พ.ศ. 2558 - พ.ศ. 2559 B.) แสดงสายพันธุ์ที่พบในปี พ.ศ. 2558 และ C.) แสดงสายพันธุ์ที่พบในปี พ.ศ. 2559



รูปที่ 10 กราฟแสดงการระบาดของ norovirus ภายในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 โดย area graph แสดงจำนวนตัวอย่างที่ได้รับในแต่ละช่วงเดือนเมื่อเทียบกับแกน y ด้านซ้าย และกราฟ stacked graph แสดงจำนวนของตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของ norovirus โดยแบ่งเป็น genotype ที่พบในแต่ละช่วงเดือนเทียบกับแกน v ด้านขวา

4.4 เปรียบเทียบกลุ่มอายุในแต่ละสายพันธุ์ของ norovirus

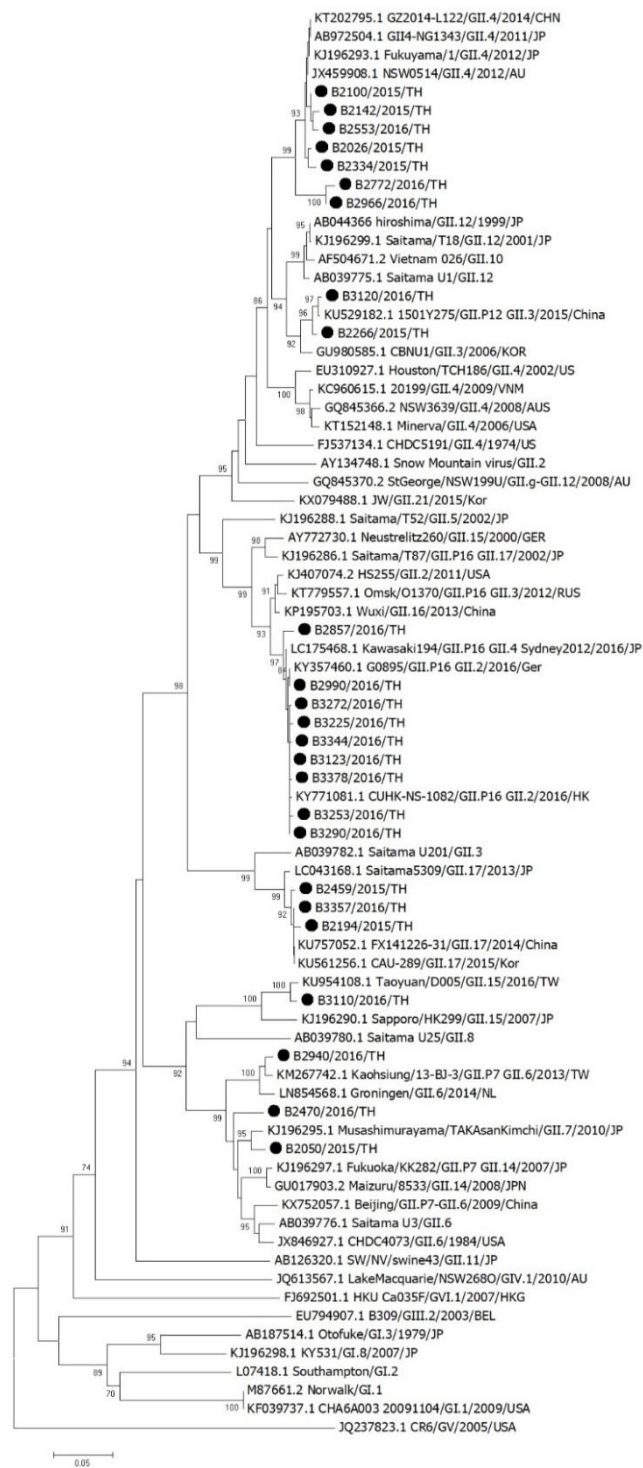
จากข้อมูลตัวอย่างทั้งหมด เพศของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HuNoV แบ่งออกเป็นผู้ชาย 87 คน และผู้หญิง 96 คน อายุของผู้ป่วยติดเชื้อ HuNoV อยู่ในช่วงตั้งแต่ต่ำกว่า 1 ปี ถึง 87 ปี และพบว่าอายุเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 19 ปี เมื่อแบ่งอายุของผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ 1.) น้อยกว่า 2 ปี 2.) 2 ปีถึง 5 ปี 3.) 6 ปีถึง 12 ปี 4.) 12 ปีถึง 18 ปี 5.) มากกว่า 18 ปี แต่ละสายพันธุ์จะมีกลุ่มอายุที่แตกต่างกัน โดยจะกล่าวถึง 4 สายพันธุ์ที่พบการระบาดมาก ได้แก่ สายพันธุ์ GII.4, GII.17, GII.P12/GII.3 และ GII.P16/GII.2 แสดงในตารางที่ 10 โดยในสายพันธุ์ GII.4 พบกระจายไปในกลุ่มอายุต่าง ๆ โดยเฉพาะกลุ่ม 2-5 ปี สายพันธุ์ GII.17 พบมากในกลุ่ม >18 ปี สายพันธุ์ GII.P16/GII.2 พบกระจายทั้งในกลุ่ม 2-5 ปี และ 6-12 ปี เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติโดย one-way ANOVA วิธี Post Hoc tests – Bonferroni พบว่ากลุ่มอายุของสายพันธุ์ GII.17 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value > 0.01)

ตารางที่ 10 แสดงกลุ่มอายุของผู้ป่วยด้วยลำไส้อักเสบเฉียบพลันจาก norovirus ในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

Genotype (n=171)	N				
	<2 ปี	2-5 ปี	6-12 ปี	12-18 ปี	>18 ปี
GI.4 (n=64)	16	24	6	-	16
GI.17 (n=23)	1	2	2	-	17
GI.P12/GI.3 (n=17)	4	4	1	1	5
GI.P16/GI.2 (n=67)	9	20	20	-	16

4.5 การจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยกระบวนการทาง Bioinformatic

phylogenetic tree สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง นำมาจากฐานข้อมูลของ GenBank โดยเลือกจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสายพันธุ์ที่พบการเกิด recombination มาก่อนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์ (complete genome) หรือในกรณี บางสายพันธุ์ไม่มีการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์มาก่อน จึงทำการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งทั้ง 2 ยีน ครอบคลุมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของงานวิจัยนี้ที่ได้จาก specific primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้อ้างอิงทั้งหมดจำนวน 52 ตัว แบ่งออกเป็น 6 genogroups และ 31 genotypes เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างในงานวิจัยนี้ จากการสุ่มทุกสายพันธุ์ที่พบแบบ randomization สร้าง phylogenetic trees 2 รูป จากยีน RdRp บน ORF1 และ VP1 บน ORF2 โดย model ที่ใช้ในการทดลองจากซอฟต์แวร์ MEGA version 7 คือ neighbor joining method – 1000 bootstrap แสดงในรูปที่ 11 และ 12 ผลที่ได้เป็นไปตามการทดลองก่อนหน้าที่เปรียบเทียบโดย nucleotide blast กับฐานข้อมูลใน GenBank พบการเกิด recombination ในบางตัวอย่างเช่น B28857 พบว่าใน phylogenetic tree ของ RdRp ถูกจัดรวมอยู่กับ GII.16 (LC175468.1 GII.P.16/4 แต่อยู่ในกิ่งเดียวกับ GII.16 KY357460.1) แต่ใน phylogenetic tree ของ VP1 กลับถูกจัดอยู่ใน GII.4 (LC175468.1 GII.P.16/4 แต่อยู่ในกิ่งเดียวกับ GII.4 KT202795.1)



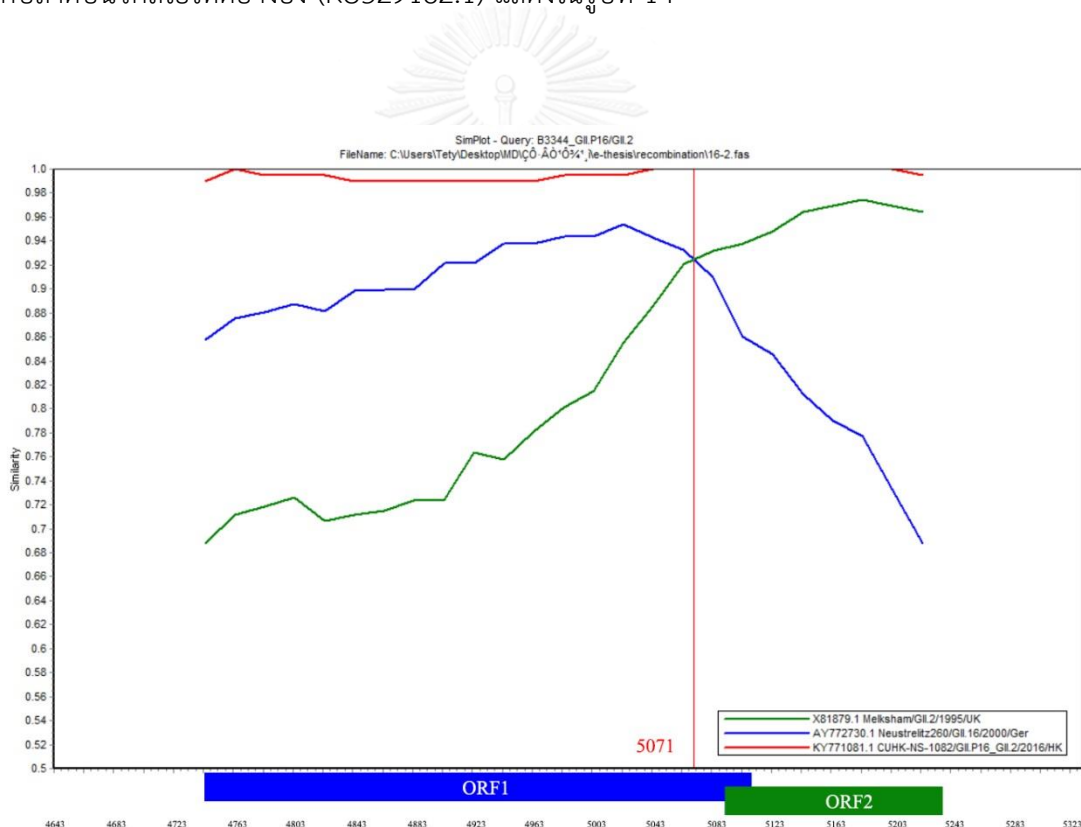
รูปที่ 11 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและตัวอย่างบน
 ยีนของ RdRp ความยาว 435 nt โดยตัวเลขแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 70% ในตัวอ้างอิงจะถูก
 เขียนด้วย accession number/strain (code)/สายพันธุ์/ปีที่พบ/ประเทศที่พบ ส่วนในตัวอย่างจะ
 ถูกแสดงโดยนำหน้าด้วย “●”



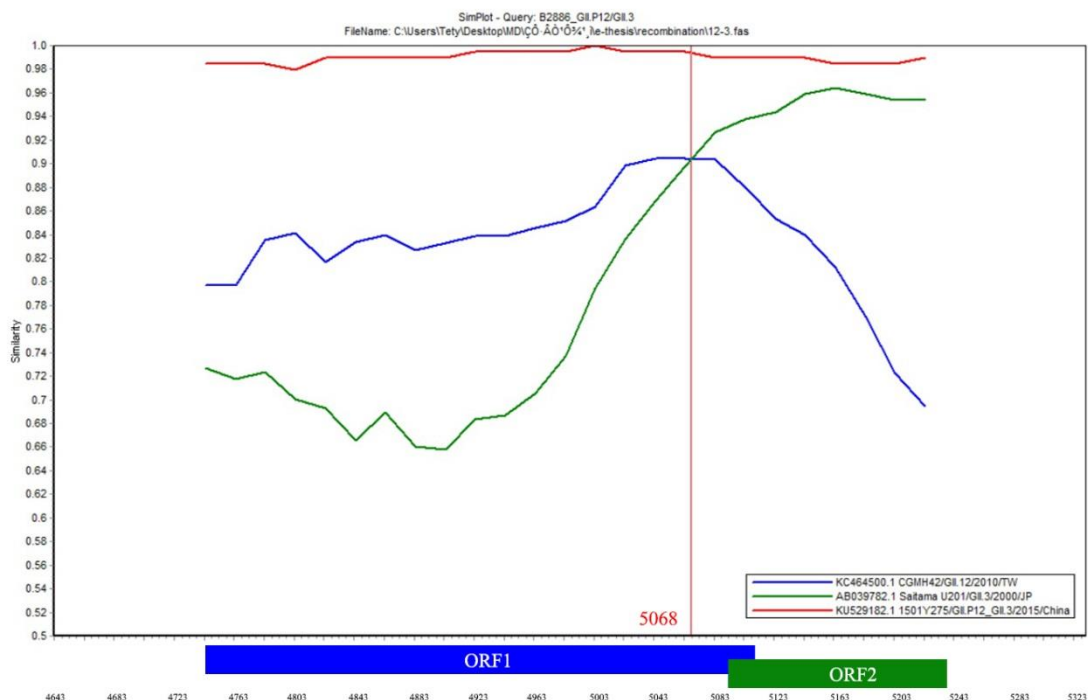
รูปที่ 12 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและตัวอย่างบน ยีนของ VP1 ความยาว 206 nt ตัวเลขแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 70% โดยตัวเลขแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 70% ในตัวอ้างอิงจะถูกเขียนด้วย accession number/strain (code)/สาย พันธุ์/ปีที่พบ/ประเทศที่พบ ส่วนในตัวอย่างจะถูกแสดงโดยนำหน้าด้วย “•”

4.6 ยืนยันการเกิด recombination

ตรวจสอบตำแหน่งในการเกิด recombination โดยอาศัยซอฟต์แวร์ SimPlot ลำดับสายพันธุกรรมของตัวอย่าง ถูกนำไปเชื่อมกันระหว่าง RdRp และ VP1 gene มีความยาว 688 nt ซึ่งตำแหน่งในการเกิด recombination ของสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 ถูกแสดงโดยตัวอย่างรหัส B3344 พบว่า จุดที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง 5071 nt เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (KY771081.1) แสดงในรูปที่ 13 และสายพันธุ์ GII.P12/GII.3 จะถูกแสดงโดยตัวอย่างรหัส B2886 พบว่ามีจุดที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง 5068 nt เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (KU529182.1) แสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 13 ผลที่ได้จากซอฟต์แวร์ SimPlot โดยที่แกน Y แสดงค่าความเหมือน (similarity) และแกน X แสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่าง B3344 ถูกตั้งค่าเป็น Query โดยเส้นกำหนดเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสีแดงแทนสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 (KY771081.1) สีฟ้าแทน GII.16 (AY772730.1) และสีเขียวแทน GII.2 (X81879.1) พบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ 5071

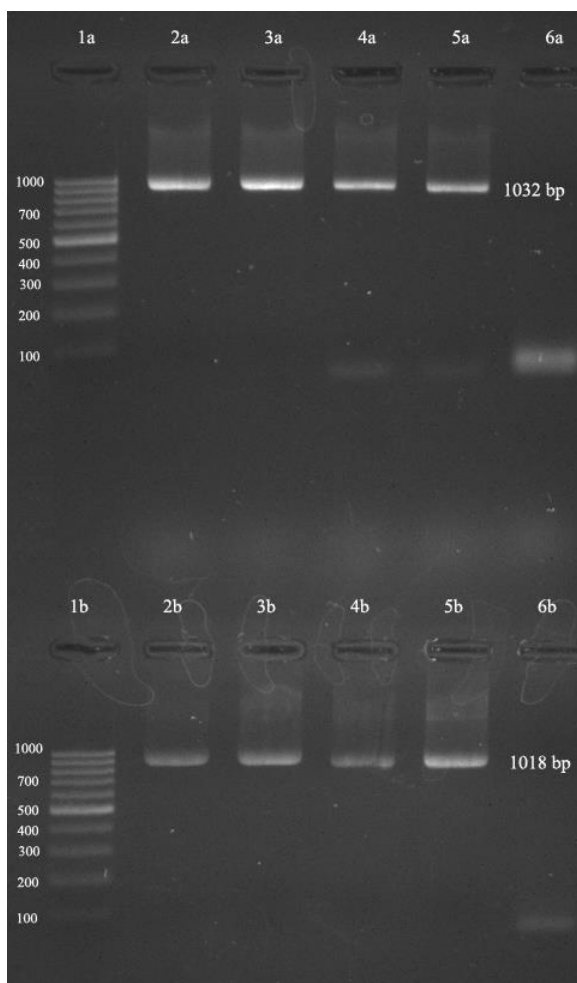


รูปที่ 14 ผลที่ได้จากซอฟต์แวร์ SimPlot โดยที่แกน Y แสดงค่าความเหมือน (similarity) และแกน X แสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่าง B2886 ถูกตั้งค่าเป็น Query โดยเส้นกำหนดเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสีแดงแทนสายพันธุ์ GII.P12/GII.3 (KU529182.1) สีฟ้าแทน GII.12 (KJ196299.1) และสีเขียวแทน GII.3 (AB039782.1) พบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ 5068

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.7 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GII.17 ที่พบในประเทศไทย

จากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณตำแหน่งของยีน ORF2 หรือ VP1 ทั้งหมดของ HuNoV GII.17 ในการทำ RT-PCR พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนและนำไปถอดรหัสพันธุกรรม โดยผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่พบมีขนาดที่ 1032 bp และ 1018 bp นำมาเชื่อมต่อกันโดย Seqman (DNASTAR-Lasergene v6) จะได้ขนาดทั้งหมด 1898 bp และนำไปตัดแต่งเพื่อเลือกเอาเฉพาะส่วนที่เป็น complete VP1 gene มีความยาว 1623 bp

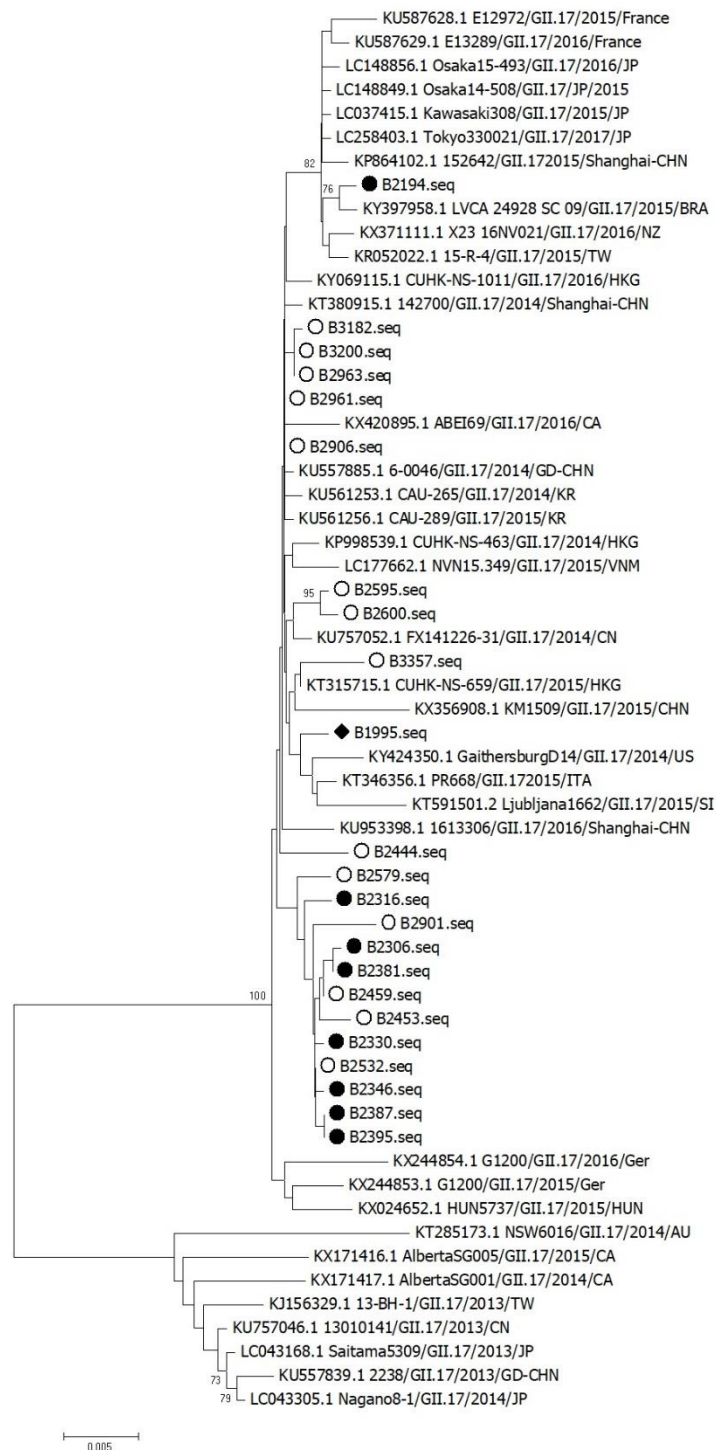


รูปที่ 15 ตัวอย่างผลของผลิตภัณฑ์จาก Nested RT-PCR บน 2% gel agarose ในตำแหน่งของยีน VP1 โดยแถวที่ 1a และ 1b คือ 100 bp DNA ladder แถวที่ 2a-5a และ 2b-5b คือ ผลการเพิ่มจำนวนของยีน VP1 ครั้งแรกและครั้งหลัง และ แถวที่ 6a และ 6b คือ Negative control

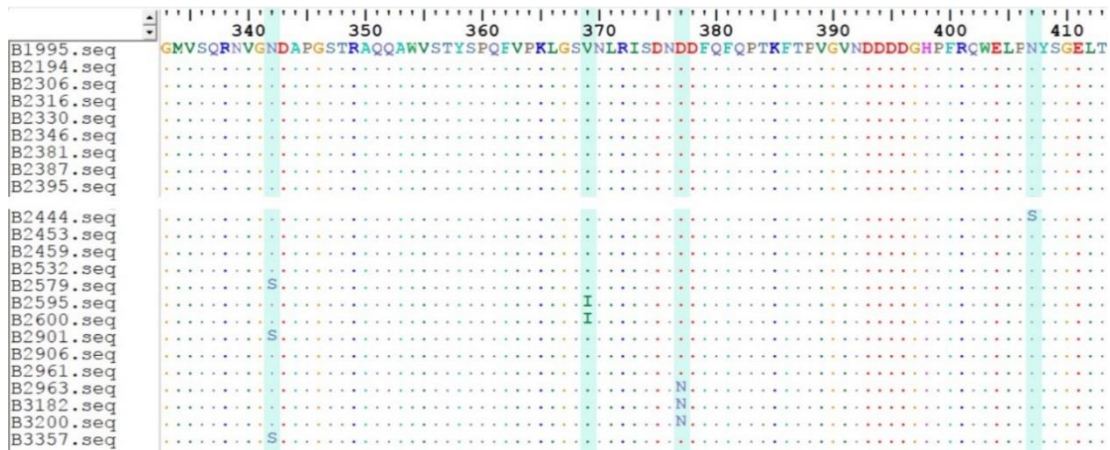
จากตัวอย่าง HuNoV GII.17 ที่พบในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ.2558 - เดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 รวมกับตัวอย่างที่เคยมีการรายงานมาก่อนในประเทศไทยช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 (Phumpholsup T, 2015) ทั้งหมด 24 ตัวอย่าง สามารถหายีน VP1 อย่างสมบูรณ์ได้ 23 ตัวอย่าง นำไปสร้าง phylogenetic tree เพื่อดูความแตกต่างของสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยและที่ต่างๆทั่วโลกในช่วงเวลาที่ต่างกัน โดยสายพันธุ์ GII.17 ที่ใช้ในการอ้างอิงจำนวน 37 สายพันธุ์ แสดงในรูปที่ 16 และ 18 พบว่าตัวอย่างทั้งหมดที่พบตั้งแต่ในปี พ.ศ.2558 มีการเปลี่ยนแปลงไปจากในอดีตตั้งแต่ปี พ.ศ.2557 GII.17 ที่พบในปี พ.ศ.2559 พบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 3 และ 4 เป็นส่วนมาก และค่า

identity ระหว่างตัวอย่างที่พบในงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงต่ำสุดที่ 0.97% และการเปลี่ยนแปลงมีการกระจายตัวกันมากในกลุ่มของปีพ.ศ.2558 ที่พบได้ทั้ง 4 กลุ่ม ส่วน เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกรดอะมิโนของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้ complete VP1 gene ในประเทศไทยด้วยซอฟต์แวร์ BioEdit พบว่า ช่วงพ.ศ. 2557 - 2558 กรดอะมิโนที่ยีน VP1 ของ GII.17 มีจำนวน 541 ตัวมีความใกล้เคียงกันมากกว่าที่พบในปี พ.ศ.2559 ที่กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่ง ได้แก่ N342S (Asparagine - Serine), V369I (Valine - Isoleusine), D377N (Aspartic acid - Asparagine) และ N407S (Arginine - Serine) แสดงในรูปที่ 17 นอกจากนี้ตัวอย่างถูกนำไปเผยแพร่ผ่านทาง GenBank โดยรหัสที่ได้คือ KX346699 - KX346705, MF073239 - MF073254

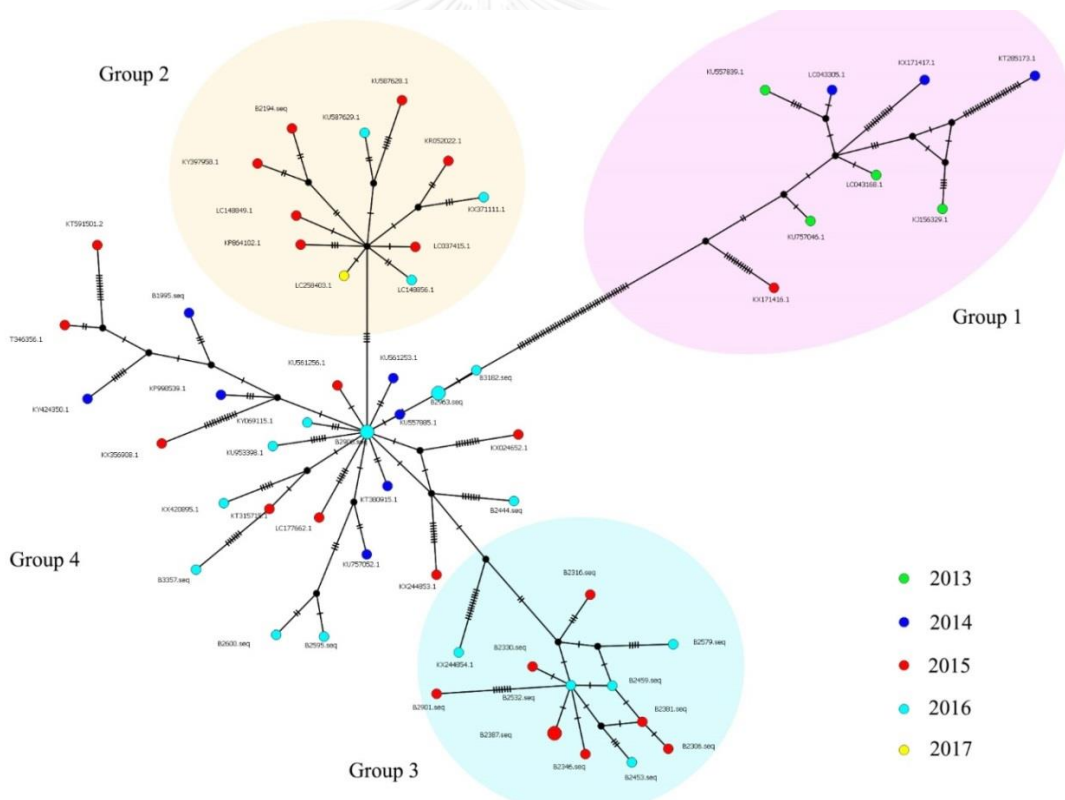




รูปที่ 16 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและตัวอย่าง norovirus GII.17 ที่ตำแหน่งยีน VP1 ความยาว 1623 nt ที่พบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 – 2559 ตัวอย่างของงานวิจัยนี้จะถูกแสดงโดยนำหน้าด้วย “●”



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่พบระหว่างตัวอย่างที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2557 – 2558 ถูกแสดงโดยซอฟต์แวร์ BioEdit



รูปที่ 18 แสดง phylogenetic tree จาก PopArt โดยการจำแนกตามปีแสดงสัญลักษณ์เป็นจุดสีเขียวแทนปีพ.ศ.2556 จุดสีน้ำเงินแทนปีพ.ศ.2557 จุดสีแดงแทนปีพ.ศ.2558 และจุดสีฟ้าแทนปีพ.ศ. 2559 จากรูปแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ และขีดขวางตามกิ่งแสดงถึงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจุดสีดำคือ node หรือจุดแยก

4.8 วิเคราะห์คุณภาพชุดตรวจแบบรวดเร็วเทียบกับวิธีทางโมเลกุล

หลังจากทราบถึงการระบาดของ norovirus ในช่วงปลายปีพ.ศ. 2559 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนทางพันธุกรรมเป็นจำนวนมาก ได้ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของชุดตรวจแบบรวดเร็ว QuickNavi™-Norovirus2 (Denka Seiken Co., Ltd.) โดยผลการตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปจำนวน 62 ตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจทางโมเลกุลด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งผลที่ได้พบว่า ชุดตรวจสอบมีความแม่นยำ (accuracy) อยู่ร้อยละ 62.90 ความไว (sensitivity) ร้อยละ 32.26 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 93.55 ค่าทำนายผลบวกหรือค่าพยากรณ์ผลบวก (PPV) ของชุดตรวจสำเร็จรูปมีค่าร้อยละ 83.33 ส่วนค่าทำนายผลลบหรือค่าพยากรณ์ผลลบ (NPV) มีค่าร้อยละ 58.00 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดตรวจแบบรวดเร็วกับวิธี RT-PCR

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างวิธีการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปและวิธี RT-PCR

		RT-PCR		
		Positive	Negative	Total
Rapid test	Positive	10	2	12
	Negative	21	29	50
	Total	31	31	62

สายพันธุ์ของ HuNoV ที่ตรวจพบจากการทำ nested RT-PCR จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้แก่ GII.4, GII.17 และ GII.P12/GII.3 อย่างละ 1 ตัวอย่าง และ GII.P16/GII.2 28 ตัวอย่าง สายพันธุ์ที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบคือ GII.17 และ GII.P16/GII.2 (9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32 ของจำนวนตัวอย่างที่พบ GII.P16/GII.2)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

HuNoV ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันซึ่งในผู้ที่ร่างกายปกติสามารถหายเองได้ภายใน 1-2 วัน แต่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการดำเนินชีวิตและทรัพย์สินเนื่องจากมีอาการท้องเสียและอาเจียนทำให้การทำงานมีอุปสรรคและค่าใช้จ่ายในการรักษา และอาจเป็นอันตรายในผู้ที่ร่างกายอ่อนแอ เช่น ในเด็กทารก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งการท้องเสียและอาเจียนอย่างรุนแรงทำให้ร่างกายขาดน้ำและถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นการรักษาให้มีประสิทธิภาพควรเริ่มจากการวินิจฉัยสาเหตุของโรคได้ถูก การสำรวจความชุกจะช่วยในการเป็นตัวเลือกในการวินิจฉัยโรคได้ดีขึ้น รวมถึงช่วยป้องกันให้ห่างไกลจากแหล่งที่จะก่อให้เกิดโรคที่อาจจะมีโอกาสในการเกิดได้มากขึ้น โดยจากงานวิจัยนี้ที่ศึกษาความชุกของ HuNoV ในผู้ป่วยทุกเพศทุกวัยที่เข้าโรงพยาบาลมาด้วยอาการของโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันโดยมีอาการท้องเสีย ซึ่งไม่ได้มีการยกเว้นสาเหตุของการเกิดด้วยปัจจัยต่างๆ พบความชุกของการติดเชื้อ HuNoV คิดเป็นร้อยละ 13.2 (11.16-14.21) ของตัวอย่างทั้งหมด และจัดอยู่ใน genogroup 2 ทั้งหมด ซึ่งข้อมูลที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องเมื่อกับการศึกษาการระบาดในประเทศไทยที่เคยมีการรายงานมาก่อนของ

Pongsuwanna Y, 2017 กล่าวว่าจากตัวอย่าง 4 จังหวัดในประเทศไทยได้แก่ สงขลา กาญจนบุรี ตาก และหนองคาย ตัวอย่างผ่านการตรวจแล้วไม่พบ rotavirus มาทำการตรวจหา norovirus ในปีพ.ศ. 2546 – พ.ศ.2548 จำนวน 1,141 ตัวอย่าง พบ HuNoV ทั้งหมด 303 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.6% แบ่งเป็น genogroup 1 จำนวน 34 ตัวอย่าง และ genogroup 2 จำนวน 269 ตัวอย่าง (76)

Supadej K, 2017 กล่าวว่าจากตัวอย่างในประเทศไทยที่จังหวัดเชียงใหม่ตั้งแต่ปีพ.ศ.2548 ถึงพ.ศ.2558 จำนวน 1938 ตัวอย่าง พบ HuNoV จำนวน 301 ตัวอย่าง ความชุกอยู่ในช่วงร้อยละ 8.6 - 23.8 สายพันธุ์ที่พบเป็น genogroup 1 จำนวน 3 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.15 และ genogroup 2 จำนวน 298 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 15.38 ของตัวอย่างทั้งหมด (77)

จากรายงานในอดีตพบว่า genogroup 1 (GI.) มีโอกาสพบในมนุษย์ได้น้อยเมื่อเทียบกับ genogroup 2 (GII.) ถึงแม้ในสิ่งแวดล้อมเช่นแหล่งน้ำ หรือหอยสองฝา มีโอกาสพบ GI. สูง (78, 79) และเป็นสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคในคนได้แต่การติดเชื้อในคนกลับพบการระบาดของ GI. มากกว่าในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุดังกล่าวยังคงรอการวิจัยต่อไปในอนาคต ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการที่มี receptor ที่แตกต่างกันหรือความสามารถในการก่อโรคของ GI. น้อยกว่าใน GI. ความชุกของการติดเชื้อ norovirus ในประเทศไทยเมื่อเปรียบเทียบกับในประเทศเพื่อนบ้านจากรายงานที่ได้เผยแพร่

My PV, 2013 ทำการศึกษาในเมืองโฮจิมิน ประเทศเวียดนาม จากการเก็บตัวอย่างในเด็กที่เกิดอาการท้องเสียฉับพลันทั้งหมดจำนวน 1,419 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ปนเปื้อน HuNoV จำนวน 293 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 20.6 พบ rotavirus จำนวน 661 ตัวอย่าง (46.6%) และจากแบคทีเรียหรือปรสิต 14.5% (80)

Lim KL, 2013 ทำการศึกษาในประเทศสิงคโปร์ จากตัวอย่างทั้งหมด 1,060 ตัวอย่าง พบ HuNoV จำนวน 312 ตัวอย่าง (29.4%) (81)

พบว่าการระบาดของ HuNoV ในประเทศไทยมีน้อยกว่าในประเทศเพื่อนบ้านถึงแม้ประเทศสิงคโปร์จะเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วต่างกับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา อาจเกิดจากกลุ่มของประเทศที่พัฒนาแล้ว มีการดูแลและเอาใจใส่เรื่องสุขอนามัยมากกว่าประเทศที่กำลังพัฒนา หรือประเทศที่ด้อยการพัฒนาจึงทำให้สาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน เช่น แบคทีเรีย สารเคมี และโปรโตซัว ลดลงในขณะที่การควบคุมหรือป้องกันไวรัสที่อันตรายกว่าสาเหตุที่ได้กล่าวมา รวมถึงการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วของไวรัส เป็นสาเหตุให้การก่อโรคจากไวรัสที่เด่นชัดกว่าสาเหตุอื่นรวมถึง norovirus ในแต่ละช่วงเดือนพบว่า ในช่วงฤดูหนาวของทั้งปีพ.ศ. 2558 และพ.ศ. 2559 พบการระบาดของ HuNoV สูงกว่าในช่วงเดือนอื่นๆ สอดคล้องกับการรายงานของทั้งในและนอกประเทศโดยประเทศไทยพบในช่วงของเดือนพฤศจิกายนและธันวาคมมากที่สุด (76)

สายพันธุ์ของ HuNoV ที่ระบาดในประเทศไทยจากการรายงานในอดีตของ Hoa, 2013 มีการบ่งบอกว่าตั้งแต่ในช่วงปีพ.ศ. 2543 เป็นต้นมาสายพันธุ์ที่พบมากคือ GII.4 ประมาณร้อยละ 60-70 และรองลงมาคือ GII.3 ประมาณร้อยละ 16 (82) ในส่วนของสายพันธุ์ที่พบของ norovirus ที่พบในช่วงของปีพ.ศ. 2559 ได้แก่ GII.4, GII.7, GII.15, GII.17, GII.P7/GII.6 และ GII.P12/GII.3 ซึ่งสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในรอบปีนี้คือ GII.4 และรองลงมาคือ GII.17 ซึ่ง HuNoV GII.17 เริ่มมีความสำคัญตั้งแต่ในพ.ศ.2557 โดยมีการรายงานครั้งแรกในไทยเป็นการรายงานของ Phumpholsup T., 2015 พบการระบาดของ HuNoV GII.17 ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 ที่สถานเลี้ยงเด็กของโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร (24) ในช่วงเวลาใกล้เคียงกันนอกจากที่พบ GII.17 ในประเทศไทยแล้วยังมีการรายงานการระบาดในประเทศต่างๆทั่วโลกโดยรายงานที่มีการระบุไว้ เช่น

Shi C, 2016 และ Jing Lu, 2015 พบการระบาดของ HuNoV GII.17 ในประเทศจีนทั้งในจังหวัด Jiangsu และ Guangdong ที่เริ่มพบตั้งแต่ในช่วงของเดือนกันยายน พ.ศ. 2557 และการระบาดของ GII.17 นั้นเพิ่มขึ้นสูงจนมากกว่า GII.4 และพบต่อเนื่องจนถึงเดือนมีนาคม (16, 83)

Matsushima Y, 2015 สำนวจการระบาดของ norovirus ในประเทศญี่ปุ่นพบการระบาดของ GII.17 เริ่มต้นในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆจนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2558 และทำการบันทึกชื่อสายพันธุ์ GII.17 ที่พบว่า “Kawasaki323” (AB983218) ในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2558 ลงในNoroNet ซึ่งเป็นเว็บไซต์สำหรับนักวิจัยที่ศึกษาเรื่องของ norovirus (84)

แต่ในประเทศไทยแตกต่างจากประเทศอื่นๆ โดยจากการวิจัยในปีพ.ศ.2558 เริ่มพบ GII.17 ครั้งแรกของปีในเดือนกันยายน และมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายนโดยมีการพบควบคู่ไปกับสายพันธุ์ GII.4 ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันเมื่อเทียบกับในต่างประเทศจะพบ GII.17 สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ แต่สิ่งที่สอดคล้องกับในต่างประเทศคือ GII.17 สายพันธุ์ที่พบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับทั่วโลกที่พบตั้งแต่ในปีพ.ศ.2557 หรือที่เรียกว่า norovirus GII.17 Kawasaki strain ซึ่งสายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากปีก่อนหน้า (ตั้งแต่ปี พ.ศ.2558) ดังที่แสดงใน phylogenetic tree ค่า identity ต่ำสุดที่ 0.97% ช่วยในการยืนยันว่าตัวอย่างงานวิจัยนี้และสายพันธุ์ที่พบระหว่างช่วงปีพ.ศ.2557-2556 ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงจนเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ไปจาก GII.17 มีเพียงกรดอะมิโนบางส่วนเปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับการรายงานของ

Parra GI, 2015 ที่ตรวจสอบ norovirus GII.17 9 สายพันธุ์ที่อยู่ในประเทศต่างๆรวมถึงสายพันธุ์ที่พบในเมือง Gaithersburg ประเทศสหรัฐอเมริกา เทียบกับ GII.17 ในอดีตก่อนปีพ.ศ.2552 พบว่ามีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปอย่างน้อย 36 ตัว ในตำแหน่งของ capsid protein หรือ VP1 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคาดว่าอยู่ที่บริเวณ 2 deletions (295–296) ของสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนบน epitope A อาจเป็นผลต่อลักษณะ antigenic หรือ biological ซึ่งมีผลต่อการติดเชื้อกระจายตัวอย่างรวดเร็ว (19)

ต่อมาในปีพ.ศ. 2560 สายพันธุ์ของ HuNoV ที่พบได้แก่ GII.4, GII.15, GII.16, GII.17, GII.P7/GII.6, GII.P7/GII.14, GII.P12/GII.3, GII.P16/GII.2 และ GII.P16/GII.4 โดยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในช่วงปีนี้คือ GII.P16/GII.2 ซึ่งมีการระบาดอย่างรวดเร็วหลังจากพบครั้งแรกในช่วงเดือนตุลาคม และสูงที่สุดในช่วงเดือนธันวาคม โดยที่สายพันธุ์ GII.17 เราพบเป็นอันดับ 3 รองลงมาจากสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 และ GII.4 ตามลำดับ สายพันธุ์ GII.17 นั้นพบกระจายไปโดยมากสุดอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคม ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า GII.17 ยังอาจไม่ใช่สายพันธุ์ที่จะระบาดแทนที่ GII.4 แต่พบการระบาดควบคู่ไปกับสายพันธุ์อื่นๆ ผลดังกล่าวไม่ใช่แค่เพียงในประเทศไทยแต่ก็มีรายงานจากที่อื่นกล่าวในทำนองเดียวกัน

Choi YS, 2017 รายงานการเกิดการระบาดของ norovirus GII.17 ประเทศเกาหลีใต้ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ.2558 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2559 ในช่วงต้นเดือนมีนาคมถึงกันยายน พ.ศ.2558 พบ GII.17 มากกว่า GII.4 แต่หลังจากนั้นในเดือนธันวาคมพบ GII.4 สูงขึ้นตลอดหน้าหนาวของปี (85)

รวมถึงการพบการระบาดของสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 ขึ้นมาแทนที่ GII.17 โดยสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 ที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมนี้มีการรายงานการระบาดในที่ต่างๆทั่วโลกซึ่งเริ่มพบตั้งแต่เดือนตุลาคมและสูงขึ้นในช่วงพฤศจิกายน พ.ศ.2559 การเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์นี้ นอกจากจะส่งผลให้พบตัวอย่างที่ติดเชื้อ norovirus สูงขึ้นแล้วยังพบผู้ป่วยด้วยอาการท้องเสียสูงขึ้นเมื่อเทียบกับปีพ.ศ.2558 และเช่นเดียวกับการระบาดของ norovirus สายพันธุ์ต่างๆที่พบในอดีตที่เมื่อเกิดการระบาดแล้วจะแพร่กระจายไปทั่วโลกอย่างรวดเร็วในสายพันธุ์เดียวกันนี้ในเวลาใกล้เคียงกัน เช่น สายพันธุ์ GII.17 ที่ระบาดในปีพ.ศ.2557-2558 มีรายงานจากประเทศต่างๆที่พบสายพันธุ์ GII.16/GII.2 ได้แก่

Niendorf S, 2017 รายงานในประเทศเยอรมันในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2559 national public health authority มีตัวอย่างผู้ป่วยด้วยอาการท้องเสียถึง 14,872 ตัวอย่างสูงกว่าค่าเฉลี่ยซึ่งอยู่ที่ 7,810 ในเดือนเดียวกัน และช่วงเดือนกันยายน - ธันวาคม พ.ศ.2559 พบผู้ติดเชื้อ norovirus 240 รายสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ GII.16/GII.2 (86)

Liu LT, 2017 รายงานในประเทศไต้หวัน ช่วงเดือนมกราคม พ.ศ.2558 - ธันวาคม พ.ศ. 2559 พบ GII.2 ที่ตำแหน่ง ORF2 ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2559 สูงถึงร้อยละ 60 และสูงถึงร้อยละ 86 ในเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 เมื่อดูจากอดีตโอกาสพบเพียงร้อยละ 1.2 เมื่อดูจากสถิติในปี พ.ศ. 2547 - พ.ศ.2555(82) เมื่อตรวจสอบ ORF1 พบว่ามีสายพันธุ์ GII.16 จึงทำให้ระบุสายพันธุ์เป็น recombination GII.P16/GII.2 (87)

Lu J, 2017 พบการระบาดของ norovirus สายพันธุ์ recombination GII.P16/GII.2 ในช่วงเดือนพฤศจิกายน - เดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 พบ norovirus 17 จาก 21 outbreaks (81%) ใน 10 แห่ง ผู้ป่วย 760 ราย (88)

จากการรายงานหลายๆแห่งรวมถึงจากผลการศึกษาในประเทศไทยทำให้ทราบว่า การระบาดของ norovirus สายพันธุ์ recombination GII.P16/GII.2 เป็นการระบาดที่รุนแรงและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วแตกต่างจากสายพันธุ์ GII.17 ที่ระบาดก่อนหน้านี้ถึงแม้จะระบาดอย่างรุนแรงในประเทศจีนเป็นส่วนมากแต่ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆพบการระบาดไม่มากเท่ากับสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 นี้

จากการตรวจสอบตำแหน่งที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนทางพันธุกรรมซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ที่บริเวณรอยต่อของ ORF1/ORF2 ในสายพันธุ์ GII.P12/GII.3 และ GII.P16/GII.2 ที่พบในการศึกษานี้ พบว่าตำแหน่งอยู่ที่ 5068 และ 5071 nt ตามลำดับ ซึ่งบริเวณดังกล่าวอยู่บนส่วนปลาย ORF1 ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีความ conserve กันมาก ตำแหน่ง มีความสอดคล้องกับสายพันธุ์ที่เกิด recombination ในอดีตที่เคยพบเห็นมาก่อนมีตำแหน่งอยู่ในช่วง 5018-5123 nt (66, 77) นอกจากนี้ สายพันธุ์นี้สายพันธุ์ที่พบอีกได้แก่ GII.P7/GII.6, GII.7/GII.14 ได้มีการรายงานมาก่อนโดยพบที่ตำแหน่ง 5029 และ 5112 nt (77, 89) ทั้งนี้ตำแหน่งอาจมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้อ้างอิงแตกต่างกันได้ ในส่วนการเกิด recombination ในตำแหน่งรอยต่อของ ORF2/ORF3 ยังไม่มีการรายงานมาก่อน

กลุ่มอายุทั้ง 5 กลุ่มแสดงถึง เด็กทารก (<2 ปี) เด็กอนุบาล (2-5 ปี) เด็กประถมศึกษา (6-12 ปี) เด็กมัธยมศึกษา (13-18 ปี) และผู้ใหญ่ (>18 ปี) ในกลุ่มของผู้ติดเชื้อ GII.17 พบว่าผู้ป่วยอยู่ในกลุ่มของผู้ใหญ่ มากกว่าในสายพันธุ์อื่นอีก 4 สายพันธุ์สอดคล้องกับการรายงานของ Wang X., 2016 ที่พบสายพันธุ์ GII.17 ในกลุ่มผู้ใหญ่เช่นกัน (90) ขณะที่สายพันธุ์ GII.4 ซึ่งพบได้มากที่สุดตั้งแต่ในช่วงปี 1996 จนถึงปัจจุบัน พบกระจายกันทั้งทารก เด็กประถมศึกษา และผู้ใหญ่ เช่นเดียวกับสายพันธุ์ GII.P12/GII.3 ส่วนในสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 พบการระบาดมาในกลุ่มของเด็กอนุบาลและเด็กประถมศึกษา มากกว่าในกลุ่มอื่นๆ ซึ่งสายพันธุ์นี้ยังไม่มีรายงานถึงเรื่องกลุ่มอายุในผู้ติดเชื้อมาก่อน การที่พบผู้ติดเชื้อ HuNoV ในกลุ่มเด็กมัศึกษาน้อยนั้นอาจเนื่องจากกลุ่มนี้พบผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาด่วนที่สุดเมื่อเทียบกับอีกทั้ง 4 กลุ่ม รวมถึง HuNoV สามารถหายได้ด้วยตนเอง และวัยนี้มีสุขภาพที่แข็งแรงและทนกว่าในกลุ่มอื่น จึงอาจเป็นปัจจัยให้ไม่พบผู้ติดเชื้อ HuNoV ในกลุ่มนี้มากนัก

ในการทดสอบชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วของ QuickNavi™-Norovirus2 (Denka Seiken Co., Ltd.) เป็นการตรวจสอบโดยอาศัยหลักการ immunochromatography มีการระบุค่าทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ที่ได้ทำการทดลองมาก่อนจากจำนวนตัวอย่าง 172 ตัวอย่าง พบว่าความแม่นยำ (accuracy) อยู่ที่ร้อยละ 94.2 ความจำเพาะ (specificity) อยู่ที่ร้อยละ 98.3 และความไว (sensitivity) ที่ร้อยละ 92.0 (91) แต่จากการทดลองในการศึกษานี้หลังจากการตรวจสอบพบว่าความแม่นยำอยู่ร้อยละ 62.90 ความไวร้อยละ 32.26 และความจำเพาะร้อยละ 93.55 จะพบว่าค่าที่ได้แตกต่างไปจากเดิมซึ่งส่วนมากของตัวอย่างที่ได้จากการศึกษานี้เป็นสายพันธุ์ GII.P16/GII.2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เริ่มระบาดในปีพ.ศ.2559 อีกทั้งสายพันธุ์ GII.2 ในอดีตพบได้น้อยมาก (92) จึงเป็นไปได้ว่าค่าที่ได้จึงออกมาต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ผลิตรายอื่น R-Biopharm RIDA®QUICK Norovirus IC assay ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR พบว่าสายพันธุ์ที่ตรวจสอบและได้ทำการทดลองมี GII.3, GII.4, GII.6, GII.7, GII.14, GII.15, GII.21 และ GII.17 โดยไม่มีการทดสอบในสายพันธุ์ GII.16 หรือ GII.2 มาก่อนจึงอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อพบการระบาดประสิทธิภาพในการตรวจสอบของสายพันธุ์ recombination นี้จะไม่เพียงพอ นอกจากนี้สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบยังมี GII.4, GII.P12/GII.3 และ GII.17 พบว่า QuickNavi™-Norovirus2 สามารถตรวจพบสายพันธุ์ GII.17 ได้แต่ไม่สามารถตรวจสอบ GII.4 และ GII.P12/GII.3 แต่เนื่องจากตัวอย่างที่ได้รับมีน้อยเกินไปในการตรวจสอบถึง

ความสามารถในการตรวจจับแต่ละสายพันธุ์ จึงยังไม่สามารถยืนยันว่าการที่ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว
ด้อยประสิทธิภาพเกิดจากสายพันธุ์ของ norovirus

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการติดเชื้อ norovirus ที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้
อักเสบเฉียบพลันในประเทศไทยเพื่อให้ตระหนักในการป้องกันการติดเชื้อ หลีกเลี่ยงให้อยู่ห่างไกลจาก
สาเหตุของการติดเชื้อ ช่วยวินิจฉัยสาเหตุของโรคโดยอาศัยความชุกในแต่ละช่วงเดือนประกอบการ
วินิจฉัยร่วมกับอาการของโรคที่เกิดขึ้นเพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพและนำไปพัฒนาชุดทดสอบแบบ
รวดเร็วให้มีประสิทธิภาพเพียงพอในการคัดกรองโรคของผู้ป่วย อีกทั้งการสำรวจความชุกช่วยนำไป
พิจารณาถึงการทำวัคซีนให้ครอบคลุมสายพันธุ์ที่กำลังระบาดได้



1. Murphy A. Aetiology of viral gastroenteritis: a review. *The Medical journal of Australia*. 1981;2:177-82.
2. Griffin MR, Surowiec JJ, McCloskey DI, Capuano B, Pierzynski B, Quinn M, et al. Foodborne Norwalk virus. *American journal of epidemiology*. 1982; 115:178-84.
3. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological reviews*. 2008;225:190-211.
4. Lindsay L, Wolter J, De Coster I, Van Damme P, Verstraeten T. A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: a systematic review. *BMC infectious diseases*. 2015;15:425.
5. Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, Treanor JJ, Chen WH, Jiang X, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211:870-8.
6. Angarone MP, Sheahan A, Kamboj M. Norovirus in Transplantation. *Current infectious disease reports*. 2016;18:17.
7. Lopman BA, Hall AJ, Curns AT, Parashar UD. Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996-2007. *Clinical infectious diseases*. 2011;52:466-74.
8. Gosselin V, Genereux M, Gagneur A, Petit G. Effectiveness of rotavirus vaccine in preventing severe gastroenteritis in young children according to socioeconomic status. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016;12: 2572-79.
9. Kolawole AO, Rocha-Pereira J, Elftman MD, Neyts J, Wobus CE. Inhibition of human norovirus by a viral polymerase inhibitor in the B cell culture system and in the mouse model. *Antiviral research*. 2016;132:46-9.
10. Prasad BV, Shanker S, Muhaxhiri Z, Deng L, Choi JM, Estes MK, et al. Antiviral targets of human noroviruses. *virology*. 2016;18:117-25.

11. Park JS, Lee SG, Jin JY. Complete nucleotide sequence analysis of the norovirus GII.4 Sydney variant in South Korea. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:374637.
12. Baehner F, Bogaerts H, Goodwin R. Vaccines against norovirus: state of the art trials in children and adults. *Clinical microbiology and infection*. 2016;22:136-9.
13. Kocher J, Yuan L. Norovirus vaccines and potential antinorovirus drugs: recent advances and future perspectives. *Future virology*. 2015;10:899-913.
14. de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era? *Euro surveillance*. 2015;20:21178.
15. Chan MC, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Tin EK, et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nature communications*. 2015;6:10061.
16. Shi C, Feng WH, Shi P, Ai J, Guan HX, Sha D, et al. An acute gastroenteritis outbreak caused by GII.17 norovirus in Jiangsu Province, China. *International journal of infectious diseases*. 2016;49:30-2.
17. Chan MC, Hung TN, Kwok K, Chan PK. Complete Genome Sequence of a Novel Recombinant GII.Pe_GII.17 Norovirus Strain from Hong Kong in 2015. *Genome announcements*. 2015;3:1338-15.
18. Lee CC, Feng Y, Chen SY, Tsai CN, Lai MW, Chiu CH. Emerging norovirus GII.17 in Taiwan. *Clinical infectious diseases*. 2015;61:1762-4.
19. Parra GI, Green KY. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerging infectious diseases*. 2015;21:1477-9.
20. Medici MC, Tummolo F, Calderaro A, Chironna M, Giammanco GM, De Grazia S, et al. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro surveillance*. 2015;20:30010.

21. Dinu S, Nagy M, Negru DG, Popovici ED, Zota L, Oprisan G. Molecular identification of emergent GII.P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. *Euro surveillance*. 2016;21:30141.
22. LeBlanc JJ, Pettipas J, Gaston D, Taylor R, Hatchette TF, Booth TF, et al. Outbreak of Norovirus GII.P17-GII.17 in the Canadian Province of Nova Scotia. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology*. 2016;2016:1280247.
23. Sisay Z, Djikeng A, Berhe N, Belay G, Gebreyes W, Abegaz WE, et al. Prevalence and molecular characterization of human noroviruses and sapoviruses in Ethiopia. *Archives of virology*. 2016;161:2739-47.
24. Phumpholsup T, Theamboonlers A, Wanlapakorn N, Felber JA, Suvaporn A, Puthanakit T, et al. NOROVIRUS OUTBREAK AT A DAYCARE CENTER IN BANGKOK, 2014. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2015;46:616-23.
25. Cubitt WD, McSwiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *Journal of clinical pathology*. 1979;32:786-93.
26. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181:295-302.
27. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*. 1972;10:1075-81.
28. Hardy ME, Estes MK. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus genes*. 1996;12:287-90.
29. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science (New York, NY)*. 1990;250:1580-3.
30. Alhatlani B, Vashist S, Goodfellow I. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus research*. 2015;206:134-43.
31. Deval J, Jin Z, Chuang YC, Kao CC. Structure(s), function(s), and inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase of noroviruses. *Virus research*. 2016;234:21-33.

32. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS microbiology letters*. 2005;253:1-8.
33. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *Journal of virology*. 2005;79:4012-24.
34. Wirblich C, Thiel HJ, Meyers G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *Journal of virology*. 1996;70:7974-83.
35. Morillo SG, Timenetsky Mdo C. Norovirus: an overview. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992). 2011;57:453-8.
36. de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature reviews Microbiology*. 2016;14:421-33.
37. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinje J, White PA, Hansman G, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of virology*. 2013;158:2059-68.
38. White PA. Evolution of norovirus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20:741-5.
39. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging infectious diseases*. 2008;14:1553-7.
40. Trivedi TK, Desai R, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: a systematic literature review. *American journal of infection control*. 2013;41:654-7.
41. Sandmann FG, Jit M, Robotham JV, Deeny SR. Burden, duration, and costs of hospital bed closures due to acute gastroenteritis in England per winter, 2010/11-2015/16. *The Journal of hospital infection*. 2017;25:30285-2.

42. Wikswo ME, Kambhampati A, Shioda K, Walsh KA, Bowen A, Hall AJ. Outbreaks of Acute Gastroenteritis Transmitted by Person-to-Person Contact, Environmental Contamination, and Unknown Modes of Transmission--United States, 2009-2013. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries*. 2015;64:1-16.
43. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*. 1994;343:1240-2.
44. Wikswo ME, Hall AJ. Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact--United States, 2009-2010. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries*. 2012;61:1-12.
45. Vimont A, Fliss I, Jean J. Study of the virucidal potential of organic peroxyacids against norovirus on food-contact surfaces. *Food and environmental virology*. 2015;7:49-57.
46. Mathijs E, Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Denayer S, Mauroy A, et al. A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food and environmental virology*. 2012;4:131-52.
47. Inoue K, Motomura K, Boonchan M, Takeda N, Ruchusatsawa K, Guntapong R, et al. Molecular detection and characterization of noroviruses in river water in Thailand. *Journal of microbiology*. 2016;62:243-9.
48. Ngaosuwanikul N, Thippornchai N, Yamashita A, Vargas RE, Tunyong W, Mahakunkijchareon Y, et al. Detection and characterization of enteric viruses in flood water from the 2011 Thai flood. *Japanese journal of infectious diseases*. 2013;66:398-403.
49. Caddy SL, de Rougemont A. Evidence for human norovirus infection of dogs in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2015;53:1873-83.
50. Sisay Z, Djikeng A, Berhe N, Belay G, Abegaz WE, Wang QH, et al. First detection and molecular characterization of sapoviruses and noroviruses with zoonotic potential in swine in Ethiopia. *Archives of virology*. 2016;161:2739-47.

51. Kittigul L, Thamjaroen A, Chiawchan S, Chavalitsheewinkoon- Petmitr P, Pombubpa K, Diraphat P. Prevalence and Molecular Genotyping of Noroviruses in Market Oysters, Mussels, and Cockles in Bangkok, Thailand. *Food and environmental virology*. 2016;8:133-40.
52. Hassard F, Sharp JH, Taft H, LeVay L, Harris JP, McDonald JE, et al. Critical Review on the Public Health Impact of Norovirus Contamination in Shellfish and the Environment: A UK Perspective. *Food and environmental virology*. 2017;9:123-41.
53. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71:2403-11.
54. de Graaf M, Villabruna N, Koopmans MP. Capturing norovirus transmission. *Current opinion in virology*. 2017;22:64-70.
55. Mallagaray A, Lockhauserbaumer J, Hansman G, Uetrecht C, Peters T. Attachment of norovirus to histo blood group antigens: a cooperative multistep process. *Angewandte Chemie*. 2015;54:12014-9.
56. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature medicine*. 2003;9:548-53.
57. Taube S, Perry JW, Yetming K, Patel SP, Auble H, Shu L, et al. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *Journal of virology*. 2009;83:4092-101.
58. Bartnicki E, Cunha JB, Kolawole AO, Wobus CE. Recent advances in understanding noroviruses. *F1000Research*. 2017;6:79.
59. Perry JW, Wobus CE. Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *Journal of virology*. 2010;84:6163-76.

60. Lu J, Fang L, Zheng H, Lao J, Yang F, Sun L, et al. The Evolution and Transmission of Epidemic GII.17 Noroviruses. *The Journal of infectious diseases*. 2016; 214:556-64.
61. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*. 2016;353:1387-93.
62. Lee H, Ko G. Antiviral effect of vitamin A on norovirus infection via modulation of the gut microbiome. *Scientific reports*. 2016;6:25835.
63. Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, Debbink K, Donaldson EF, Vinje J, et al. Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in evolving blockade epitopes. *Journal of virology*. 2013;87:2803-13.
64. Wang HB, Wang Q, Zhao JH, Tu CN, Mo QH, Lin JC, et al. Complete nucleotide sequence analysis of the norovirus GII.17: A newly emerging and dominant variant in China, 2015. *Infection, genetics and evolution*. 2016;38:47-53.
65. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1 / ORF2 overlap. *Emerging infectious diseases*. 2005;11:1079-85.
66. Phumpholsup T, Chieochansin T, Vongpunsawad S, Vuthitanachot V, Payungporn S, Poovorawan Y. Human norovirus genogroup II recombinants in Thailand, 2009-2014. *Archives of virology*. 2015;160:2603-9.
67. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS biology*. 2004;2:432.
68. Lay MK, Atmar RL, Guix S, Bharadwaj U, He H, Neill FH, et al. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology*. 2010;406:1-11.

69. Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, de Graaf M, Freiden P, et al. Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols*. 2015;10:1939-47.
70. Ayukekbong JA, Fobisong C, Tah F, Lindh M, Nkuo-Akenji T, Bergstrom T. Pattern of circulation of norovirus GII strains during natural infection. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52:4253-9.
71. Debbink K, Lindesmith LC, Baric RS. The state of norovirus vaccines. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;58:1746-52.
72. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *Journal of virology*. 2002;76:12335-43.
73. Allen DJ, Noad R, Samuel D, Gray JJ, Roy P, Iturriza-Gomara M. Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virology journal*. 2009;6:150.
74. Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *The New England journal of medicine*. 2011;365:2178-87.
75. Chaimongkol N, Khamrin P, Malasao R, Thongprachum A, Kongsricharoern T, Ukarapol N, et al. Molecular characterization of norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. *Journal of medical virology*. 2014;86:1210-8.
76. Pongsuwanna Y, Tacharoenmuang R, Prapanpoj M, Sakon N, Komoto S, Guntapong R, et al. Monthly Distribution of Norovirus and Sapovirus Causing Viral Gastroenteritis in Thailand. *Japanese journal of infectious diseases*. 2017;70:84-6.
77. Supadej K, Khamrin P, Kumthip K, Kochjan P, Yodmeeklin A, Ushijima H, et al. Wide variety of recombinant strains of norovirus GII in pediatric patients hospitalized

with acute gastroenteritis in Thailand during 2005 to 2015. *Infection, genetics and evolution*. 2017;52:44-51.

78. Lowmoung T, Pombubpa K, Duangdee T, Tipayamongkholgul M, Kittigul L. Distribution of Naturally Occurring Norovirus Genogroups I, II, and IV in Oyster Tissues. *Food and environmental virology*. 2017.

79. Yu Y, Cai H, Hu L, Lei R, Pan Y, Yan S, et al. Molecular epidemiology of oyster-related human noroviruses and their global genetic diversity and temporal-geographical distribution from 1983 to 2014. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81:7615-24.

80. My PV, Thompson C, Phuc HL, Tuyet PT, Vinh H, Hoang NV, et al. Endemic norovirus infections in children, Ho Chi Minh City, Vietnam, 2009-2010. *Emerging infectious diseases*. 2013;19:977-80.

81. Lim KL, Eden JS, Oon LL, White PA. Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004-2011. *Journal of medical virology*. 2013;85:1842-51.

82. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *Journal of clinical virology*. 2013;56:185-93.

83. Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, Lao J, et al. Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014-2015. *Emerging infectious diseases*. 2015;21:1240-2.

84. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, et al. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro surveillance*. 2015;20:21173.

85. Choi YS, Koo ES, Kim MS, Choi JD, Shin Y, Jeong YS. Re-emergence of a GII.4 Norovirus Sydney 2012 Variant Equipped with GII.P16 RdRp and Its Predominance over

- Novel Variants of GII.17 in South Korea in 2016. *Food and environmental virology*. 2017;9:168-78.
86. Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-Hubinger AM, Hofmann J, Zimmermann O, et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro surveillance*. 2017;22:30447.
87. Liu LT, Kuo TY, Wu CY, Liao WT, Hall AJ, Wu FT. Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus, Taiwan, 2016. *Emerging infectious diseases*. 2017;23:1180-83.
88. Lu J, Fang L, Sun L, Zeng H, Li Y, Zheng H, et al. Association of GII.P16-GII.2 Recombinant Norovirus Strain with Increased Norovirus Outbreaks, Guangdong, China, 2016. *Emerging infectious diseases*. 2017;23:1188-90.
89. Cai H, Yu Y, Jin M, Pan Y, Yan S, Wang Y. Cloning, sequencing and characterization of the genome of a recombinant norovirus of the rare genotype GII.P7/GII.6 in China. *Archives of virology*. 2017;162:2053-9.
90. Wang X, Du X, Yong W, Qiao M, He M, Shi L, et al. Genetic characterization of emergent GII.17 norovirus variants from 2013 to 2015 in Nanjing, China. *Journal of medical microbiology*. 2016;65:1274-80.
91. Saito Y, Kato D, Inano K. [Development of norovirus rapid detection kit "QuickNavi-Norovirus2"]. *Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai shi*. 2014;24:45-50.
92. Siqueira JAM, Bandeira RDS, Oliveira DS, Dos Santos LFP, Gabbay YB. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. *PLoS one*. 2017;12:178909.

รายการอ้างอิง





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1.) 5X Tris Borate Buffer (TBE)

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Tris base	54 g
Boric acid	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml

เติม Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1 L

2.) 1X Tris Borate Buffer (TBE)

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
5X TBE	200 ml
Distilled water	800 ml

3.) 2% (w/v) agarose gel

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agarose	2 g
1X TBE	100 ml

4.) 10 μ M primer

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
100 μ M primer	1 μ l
Nuclease free water	9 μ l



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายฐานันดร ธนุสุวรรณศักดิ์ (ภาษาอังกฤษ) Mr. Thanundorn Thanusuwannasak

เกิดวันที่ 10 สิงหาคม 2535 ที่อยู่ปัจจุบัน 12 ซอยสมเด็จพระเจ้าพระยา 6 แขวงสมเด็จเจ้าพระยา เขตคลองสาน กรุงเทพฯ 10600

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงาน

1.) วิจัยร่วมในผลงานวิจัย เรื่อง : Global Spread of Norovirus Genogroup II Genotype 17 Kawasaki 308, 2014—2016 ในวารสาร Emerging Infectious Diseases journal, 2017

2.) ตีพิมพ์ผลงานวิจัย เรื่อง การตรวจวินิจฉัยด้วยชุดตรวจแบบรวดเร็วเปรียบเทียบกับ การตรวจทางซีโมเลกุล, วารสารกุมารเวชศาสตร์, 2017

