สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันนี้โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (acute gastroenteritis) เป็นสาเหตุสำคัญของการป่วยและการตายในวัยทารกและเด็กเล็กทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา (1) ในบรรดาเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่เรียกชื่อรวมว่า gastroenteritis viruses ซึ่งได้แก่ rotavirus, enteric adenovirus, astro-virus, human caliciviruses, coronaviruses, toroviruses และ picobirnaviruses (2) พบว่าเชื้อไวรัสโรตา (rotavirus) เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ก่อให้เกิดโรค อุจจาระร่วงอย่างรุนแรง (acute diarrhea) ในทารกและเด็กเล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กที่มีอายุ น้อยกว่า 5 ปี (3, 4) ซึ่งจากผลการสำรวจอุบัติการณ์ของเชื้อไวรัสโรตาโดย WHO Surveillance Network ในแต่ละปีมีเด็กเสียชีวิตด้วยโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ประมาณ 527,000 คน และพบว่ามากกว่า 85% ของเด็กที่เสียชีวิตอยู่ในประเทศที่มีรายได้น้อยในแถบทวีปแอฟริกา และเอเชีย โดยในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 44% (1, 5) ซึ่งจะพบระบาดมากในช่วงฤดูหนาว เชื้อมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมสูง ทำให้มีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมและแพร่กระจายได้ดี การแพร่เชื้อส่วนใหญ่เกิดจากผู้ป่วยซึ่งมีปริมาณเชื้อในอุจจาระสูง แพร่กระจายสู่ผู้อื่นทางการกินอาหาร และน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (fecal-oral route) อย่างไรก็ตามมีหลักฐานว่าเชื้ออาจติดต่อทางการหายใจได้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะอาศัยและแบ่งตัวในเยื่อบุผิวที่ลำไส้เล็ก มีผลต่อการยับยั้งการดูดซึมของลำไส้ และกระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำและเกลือแร่ออกสู่ทางเดินอาหาร เด็กที่ติดเชื้อจึงถ่ายเหลวเป็นน้ำ ในรายที่รุนแรง อาจเกิดภาวะสูญเสียน้ำในร่างกายมากจนอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตได้ (6, 7, 8)

ไวรัสโรตาถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ 7 กลุ่ม คือ A, B, C, D, E, F และ G แต่กลุ่มที่มีความสำคัญทางระบาดวิทยาที่พบในเด็กมากที่สุด คือ ไวรัสกลุ่ม A นอกจากจะจำแนกไวรัสโรตาออกเป็นกลุ่มต่างๆ แล้ว ยังสามารถแยกย่อยลงไปอีกเป็นจีโนไทป์ (genotype) โดยจำแนกตามโปรตีนที่หุ้มด้านนอก (outer capsid) ของอนุภาคไวรัส ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน VP4 และ VP7 โดยถ้าจัดตาม VP4 เรียกว่าเป็นการจัดตาม P-type และถ้าจัดตาม VP7 จะเรียกว่าเป็นการจัดตาม G-type (6) ซึ่งในปัจจุบันสายพันธุ์เชื้อไวรัสโรตาที่พบทั้งในคนและในสัตว์ต่างๆ พบว่ามีทั้งหมด 27 G-genotypes และ 35 P-genotypes (9,10) จะเห็นได้ว่าไวรัสโรตามีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก และยังคงเกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้นได้เรื่อยๆ เนื่องจากเชื้อไวรัสมีการวิวัฒนาการ และปรับตัวอยู่

ตลอดเวลาตามสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไปเพื่อความอยู่รอด โดยอาจจะผ่านกระบวนการ point mutation, genetic reassortment หรือ genetic rearrangement แล้วส่งผลให้จีโนมของไวรัสเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมากจนเกิดเป็นไวรัสโรตา genotype ใหม่เกิดขึ้นได้ (11,12) การเกิด genetic variation เหล่านี้ อาจจะมีผลก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความจำเพาะของไวรัสต่อเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้ นั่นคือไวรัสอาจมีการติดเชื้อในเซลล์ชนิดใหม่ หรือ host ชนิดใหม่ได้ ผลที่เกิดขึ้นก็คือทำให้เกิด emergence ของไวรัสก่อโรค (pathogenic viruses) ใหม่ๆ ขึ้น และมีการติดเชื้อข้าม host species (interspecies transmission) โดยอาจจะติดเชื้อข้าม species ในระหว่างสัตว์ชนิดต่างๆ หรือติดเชื้อข้าม species จากสัตว์มาสู่คนก็ได้ (13,14,15) ซึ่ง genotypes หลักๆ ของไวรัสโรตาที่พบได้บ่อยในคนนั้นมี G-genotypes เป็น G1, G2, G3, G4 และ G9 และ P-genotypes เป็น P[8] และ P[4] (ในปัจจุบันมีการตรวจพบ G-genotype ชนิด G12 มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า genotype นี้อาจจะมาเป็น genotype หลักนอกเหนือจากที่กล่าวในข้างต้น) (16,17) ส่วนสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดทั่วโลกอยู่ในขณะนี้นั้น ได้แก่ G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], และ G9P[8] แต่ในปัจจุบันมีการตรวจพบ genotypes ใหม่ๆ ที่ติดเชื้อในคนเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก โดยพบว่าไวรัสโรตาที่ติดเชื้อในคนมีอย่างน้อย 11 G-genotypes และ 12 P-genotypes ซึ่งเมื่อตรวจดู G และ P ร่วมกัน (G-P combination) เพื่อบอกสายพันธุ์ พบว่ามีอย่างน้อย 45 สายพันธุ์ ที่ติดเชื้อในคน (18, 19, 20) โดยแนวทางการควบคุมโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสโรตาแนวทางหนึ่งที่พบว่ามีประสิทธิภาพ ได้แก่ การใช้วัคซีนควบคุมการติดเชื้อไวรัสโรตา ซึ่งในปัจจุบันนั้นวัคซีนไวรัสโรตาที่ได้รับการขึ้นทะเบียน และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายมี 2 ชนิดด้วยกัน คือ monovalent human rotavirus vaccine ชนิด G1P[8] และ multivalent human-bovine rotavirus reassortants vaccine เป็นวัคซีนที่มีไวรัสที่เข้าชุดใหม่ (reassortant virus) 5 ชนิด โดยใช้แกนกลาง (Core antigen: VP6) ที่เป็นเชื้อไวรัสของวัว และเอาเฉพาะแอนติเจนส่วนผิวนอก คือ VP7 และ VP4 ของเชื้อไวรัสโรตาของคนมาทำวัคซีน เลือกมา 5 serotypes ที่พบบ่อย ได้แก่ สายพันธุ์ G1, G2, G3, G4 และ P[8] (21, 22) แม้ว่าในระยะแรกๆ ของการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสโรตามีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ค่อนข้างสูง เนื่องจากมี species barrier ที่ขวางกั้นการติดเชื้อข้ามชนิดของสัตว์ ทำให้ไวรัสโรตาบาง genotype พบเฉพาะในคน และบาง genotype พบเฉพาะในสัตว์บางชนิดเท่านั้น เช่น genotype ที่พบบ่อยในคนได้แก่ G1-G4 และ P[4], P[8] ในขณะที่ genotype G6, G8 ,G10 และ P[1], P[5], P[11] พบได้บ่อยในวัว ส่วน genotype ที่พบบ่อยในหมูได้แก่ G3, G4, G5, G11 และ P[6], P[7] แต่ในปัจจุบันนั้น เมื่อมีการศึกษาการระบาดและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อในภูมิภาคต่างๆ ของโลกมากขึ้น ก็จะพบว่าความจำเพาะของ genotype ในสัตว์ชนิดต่างๆ และในคนมีน้อยลง genotype ที่เคยพบเฉพาะในสัตว์ก็สามารถ

แยกได้จากผู้ป่วยมากขึ้นเรื่อยๆ เช่น G5 ที่เคยพบบ่อยในหมู ก็พบในเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วง ส่วน G6, G8 และ G10 ที่พบบ่อยในวัวก็พบในผู้ป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงได้เช่นกัน เป็นต้น (28) เพราะฉะนั้น จึงควรมีการศึกษา และติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมในเชิงโมเลกุลของไวรัสโรตาอยู่ตลอดเวลา เพราะจะช่วยทำให้ทราบถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง และลักษณะทางวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสโรตาที่มีการแพร่ระบาดอยู่ได้ และเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางใหม่ๆ ในการควบคุมโรคหรือเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนที่จะนำมาใช้เพื่อป้องกัน และควบคุมการระบาดของเชื้อไวรัสโรตาได้ในอนาคต

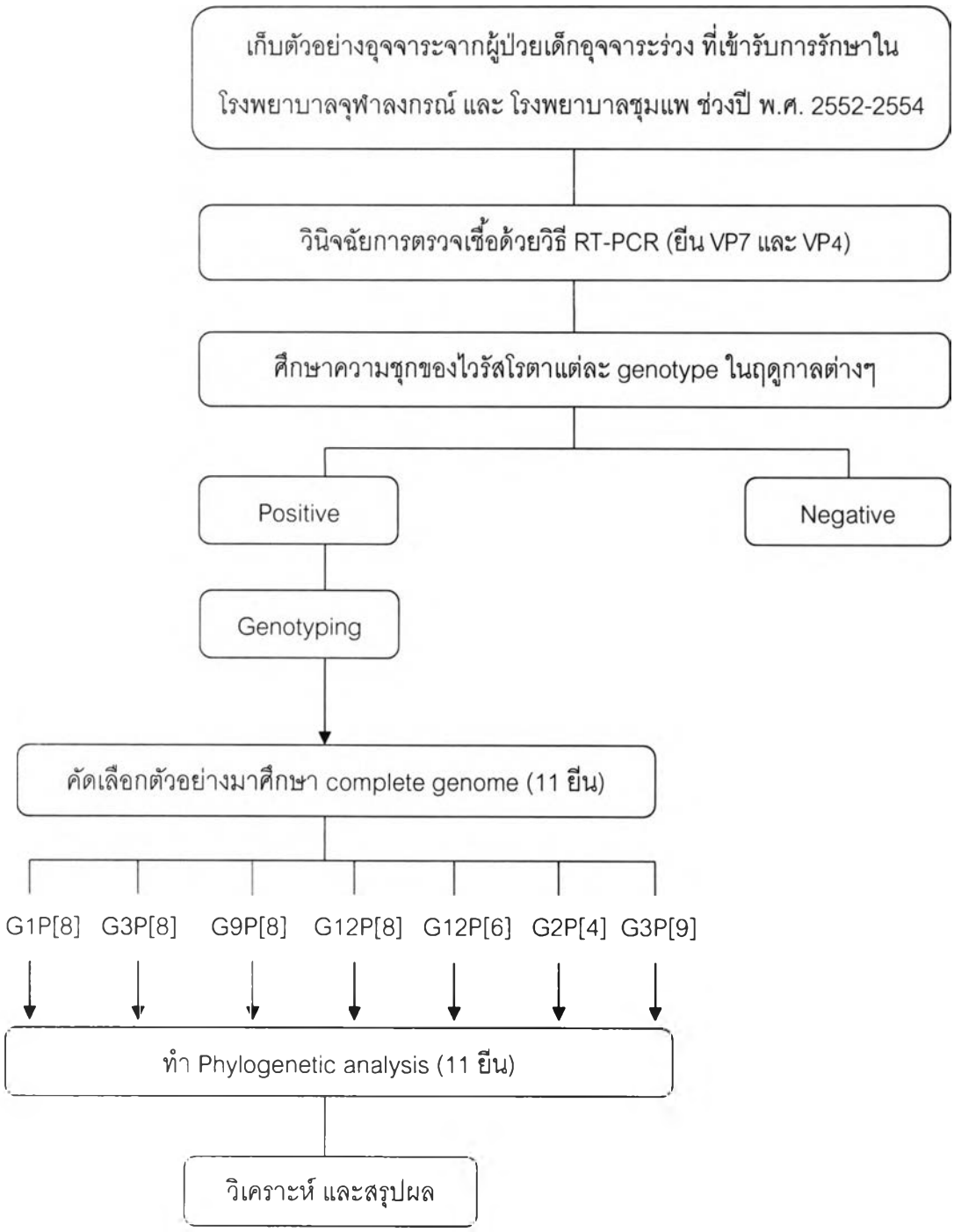
ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาถึงความชุก ลักษณะทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ของเชื้อไวรัสโรตากลุ่ม A ในประเทศไทย โดยได้ศึกษาในช่วงเดือนมิถุนายน 2552 – พฤษภาคม 2554 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการตรวจวินิจฉัยและเฝ้าระวังการระบาดของโรครวมถึงการพัฒนาวัคซีนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความชุก และจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโรตาในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วงในประเทศไทย ช่วง พ.ศ. 2552-2554

2. เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมทั้ง complete genome (11ยีน) ของไวรัสโรตากลุ่ม A ที่พบได้บ่อยในประเทศไทยช่วง พ.ศ. 2552-2554 เปรียบเทียบกับข้อมูลในธนาคารพันธุกรรม

ขอบเขตของการวิจัย



รูปที่ 1 ขอบเขตการวิจัย

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากตัวอย่างสารละลายอุจจาระที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานตรวจบริการเพื่อหาการติดเชื้อไวรัสโรตา ตัวอย่างที่สามารถทำการทดสอบได้จึงมีปริมาณน้อยและไม่เพียงพอ เมื่อต้องทำการทดสอบมากกว่า 2 ครั้ง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Genotype คือ การแบ่งกลุ่มของเชื้อไวรัสโรตา โดยวิธีการตรวจสอบรหัสพันธุกรรม

Phylogenetic analysis คือ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาวางแผนเพื่อเลือกใช้ และพัฒนาวัคซีนต้านเชื้อไวรัสโรตาต่อไปในอนาคต

2. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ เฝ้าระวัง และป้องกันโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อไวรัสโรตาได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บอุจจาระ ลง 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS) และเก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2. สกัด Viral RNA จาก sample โดยในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction ของบริษัท RBC Bioscience

3. ศึกษาความชุกของเชื้อไวรัสโรตาในประเทศไทย

- ระบุสายพันธุ์จีโนไทป์ โดยทำการเพิ่มจำนวนยีน VP7 และ VP4 ด้วยวิธี One step Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

- หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน VP7 และ VP4 ด้วยวิธี direct DNA sequencing

- วิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี BLAST search (Basic Local Alignment Search Tool) จากฐานข้อมูลใน NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อหา genotype

4. คัดเลือกตัวอย่างที่ Positive มาทำการศึกษา complete genome

5. ออกแบบ Primer ทั้ง 11 ยีน โดยใช้ nucleotide sequences จากฐานข้อมูลใน NCBI (National Center for Biotechnology Information) เป็นต้นแบบในการออกแบบ primer

6. ทดสอบหาสภาวะในการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ที่เหมาะสม

7. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 11 ยีน

8. จัดจำแนกสายพันธุ์โดยการทำ phylogenetic tree

9. วิเคราะห์ และสรุปผล

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. วิเคราะห์ความชุก (prevalence) และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโรตาในประเทศไทย ในช่วงปี 2552-2554 เป็นอย่างไร

2. วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมทั้งตัว (complete genome) ของไวรัสโรตาที่ตรวจพบในประทศไทยว่าเป็นอย่างไร