

EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN POLYOMAVIRUS
IN PATIENTS WITH RESPIRATORY DISEASES IN THAILAND

Miss Prangwalai Chanchaem

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

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.

ระบดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโพลีโอมาไวรัสในผู้ป่วยระบบ
ทางเดินหายใจในประเทศไทย



นางสาวปรางวลัย จันทรแจ่ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของ
เชื้อฮิวแมนโพลีโอมาไวรัสในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจใน
ประเทศไทย

โดย

นางสาวปรางวลัย จันทร์แจ่ม

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงกร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไชยเดช นนทร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงกร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภัตต์ สำราญสำรวจกิจ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ญัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ)

ปรากฏวลัย จันทรแจ่ม : ระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้ออิวแมนโพลิโอมาไวรัสในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย. (EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN POLYOMAVIRUS IN PATIENTS WITH RESPIRATORY DISEASES IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงกร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ, 59 หน้า.

เชื้ออิวแมนโพลิโอมาไวรัส (Human Polyomaviruses, HPyV) เป็นดีเอ็นเอไวรัสที่มีขนาดเล็ก จัดอยู่ใน family Polyomaviridae ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ขนาดประมาณ 5 kb งานวิจัยนี้ศึกษาความชุก และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้ออิวแมนโพลิโอมาไวรัส ได้แก่ WU, KI, MC และ HPyV9 ที่อาจติดเชื้อในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจที่พบในประเทศไทยช่วงปี 2009-2013 โดยตรวจสอบเชื้ออิวแมนโพลิโอมาไวรัส ด้วยวิธี semi-nested PCR และหาลำดับสารพันธุกรรมทั้งจีโนม จากนั้นทำการวิเคราะห์ multiple sequences alignment และ Phylogenetic tree จากการศึกษาระบาดของอิวแมนโพลิโอมาไวรัส พบว่ามีการระบาดของ WU polyomavirus (WUPyV) คิดเป็น 0.16% (1/614) เท่านั้น แต่ไม่พบการระบาดของ KIPyV, HPyV9 และ MCPyV จากการศึกษาสารพันธุกรรมทั้งจีโนมของ WUPyV (isolate CU_Chonburi 3) นั้นมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding regions หลายตำแหน่งและมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 (ตำแหน่ง S347T และ G79T), VP2 (ตำแหน่ง L40V, G120R, Y121I, P123R, L137F, Q287R และ A327V), LTA_g (ตำแหน่ง Q357P, V369E, E377K, D378V, A381T, R382E, R383G และ D389G) และ STA_g (ตำแหน่ง R139S, K141E, R148K และ W153C) นอกจากนี้จาก Phylogenetic tree พบว่า WUPyV (isolate CU_Chonburi 3) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ WUPyV ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (ความเหมือน 99%) ได้แก่ WUPyV reference sequence (NC 009539), isolate MN 2726 ในประเทศออสเตรเลีย ปี 2010 และ isolate CU-295 ในประเทศไทย ปี 2008 โดยสรุปข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้ออิวแมนโพลิโอมาไวรัสซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อไปในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5574144830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: POLYOMAVIRUS / RESPIRATORY DISEASE / CHARACTERIZATION /
EPIDEMIOLOGY

PRANGWALAI CHANCHAEM: EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN POLYOMAVIRUS IN PATIENTS WITH RESPIRATORY DISEASES IN THAILAND. ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 59 pp.

Human polyomavirus (HPyV) is a small DNA virus belonging to the Polyomaviridae family containing a circular double stranded DNA genome approximately 5 kb in length. This study focuses on the prevalence and genetic characterization of HPyV (such as WU, KI, MC and HPyV9) obtained from patients with respiratory diseases in Thailand during 2009-2013. HPyV was detected by using semi-nested PCR and then characterized by whole genome sequencing. The nucleotides and deduced amino acid sequences were analyzed by multiple sequences alignment and phylogenetic tree. The result revealed that 0.16% (1/614) was positive for WU polyomavirus (WUPyV) whereas KIPyV, HPyV9 and MCPyV were not detected in this study. Whole genome sequence alignment of WUPyV (isolate CU_Chonburi 3) shown several nucleotide variations within non-coding regions and amino acid changes in VP1 (position S347T and G79T), VP2 (position L40V, G120R, Y121I, P123R, L137F, Q287R and A327V), LTAg (position Q357P, V369E, E377K, D378V, A381T, R382E, R383G and D389G) and STAg (position R139S, K141E, R148K and W153C). Moreover, phylogenetic tree demonstrated that WUPyV (isolate CU_Chonburi 3) was closely related (99% similarity) to previously described WUPyV such as WUPyV reference sequence (NC 009539), isolate MN 2726 from Australia in 2010 and isolate CU-295 from Thailand in 2008. In conclusion, data obtained from this study might be useful in terms of epidemiology and genetic characterization of HPyV in the future.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2013

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงกร ที่ให้โอกาส สนับสนุน ชี้แนะเทคนิคต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย อีกทั้งยังให้คำปรึกษา คำแนะนำในขณะปฏิบัติกร พร้อมทั้งกรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในโครงร่างวิทยานิพนธ์ วิทยานิพนธ์และร่างผลงานวิจัยที่จะตีพิมพ์ในวารสาร รวมถึงความช่วยเหลืออื่นๆตลอดการวิจัย อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ตลอดช่วงเวลาศึกษาทำการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ และหน่วยไวรัสวิทยาคลินิก รวมถึง คุณรพีพรรณ สุนทรรงค์ คุณปรียาพร วิชัยวัฒนา และคุณศโรยา ประสิทธิ์สมสกุล ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่างผู้ป่วยและอำนวยความสะดวกในขณะปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณทุน Thailand Research Fund (TRF): RSA5680031 และทุนสนับสนุนนิตินิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อไปเสนอผลงานวิชาการในประเทศ (กรุงเทพฯ และปริมณฑล) หลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ 724 ที่คอยให้กำลังใจและให้คำปรึกษาตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่แม่ครอบครัวและคุณณัฐธิดา ดุจติปิยะ ที่คอยสนับสนุนและให้โอกาสทางการศึกษา อีกทั้งยังเป็นกำลังใจที่สำคัญในการผลักดันจนทำให้มีวันนี้ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำอธิบายและสัญลักษณ์คำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)	1
คำถามงานวิจัย (Research question).....	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives).....	2
สมมติฐาน (Hypothesis).....	2
ข้อตกลงเบื้องต้น : ไม่มี	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและการประยุกต์ใช้ (Expected benefit and application)	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ทบทวนวรรณกรรม (Review of the Related Literatures).....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
รูปแบบการวิจัย (Descriptive Study).....	14
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	14
วิธีดำเนินงานวิจัย	16
ตัวอย่างของผู้ป่วย	16
การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit.....	17
การตรวจสอบผลการสกัด DNA.....	17
การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะต่อ human polyomavirus ด้วยวิธี Semi-nested PCR.....	19
ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	22

การเตรียม Positive control ด้วยวิธี Cloning	23
การวัดปริมาณพลาสมิด.....	24
การคำนวณค่า sensitivity ของไพรเมอร์ด้วยการทำ 10-fold serial dilution	25
หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ Direct Nucleotide Sequencing.....	25
Whole genome	25
การทำ Multiple Sequence Alignment และ Phylogenetic analysis.....	26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	27
ผลการทำ Positive control	27
การคำนวณค่า sensitivity ของไพรเมอร์ด้วยการทำ 10 fold serial dilution	27
ผลการศึกษาระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อ Human Polyomaviruses ในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย	29
ผลการตรวจสอบผลการสกัด DNA ด้วยการทำให้ PCR.....	29
การตรวจวินิจฉัยเชื้อ Human Polyomaviruses โดยใช้เทคนิค semi-nested PCR.....	30
ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ Direct Nucleotide Sequencing.....	30
การตรวจสอบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์	31
Whole genome assembly	31
การทำ Multiple Sequence Alignment.....	31
การวิเคราะห์ผลทาง Phylogenetic tree.....	43
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	50
รายการอ้างอิง	54
ภาคผนวก.....	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	59

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของ Human Polyomaviruses แต่ละชนิด 7

ตารางที่ 2 แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ Human Polyomaviruses ทั้ง 12 สายพันธุ์ 9

ตารางที่ 3 แสดงความชุกของการพบเชื้อ Human polyomavirus บริเวณระบบทางเดินหายใจ ... 10

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการตรวจหา ยีน GAPDH 18

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน GAPDH 18

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน GAPDH 18

ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR 20

ตารางที่ 8 แสดงการเข้าคู่ของ primer ในการตรวจสอบ human polyomavirus 20

ตารางที่ 9 แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ Human Polyomaviruses
..... 21

ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของเชื้อ Human Polyomaviruses 21

ตารางที่ 11 แสดงไพรเมอร์ของ WUPyV ในการทำ PCR 26

ตารางที่ 12 แสดงค่า identity matrix ของ WUPyV 35

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non coding regions 37

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ ยีน VP1 39

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ ยีน VP2 40

ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ ยีน Large T antigen (LTA_g) 41

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณ ยีน Small T antigen (STA_g) 42

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะ viral particle ของเชื้อ human polyomavirus.....	6
รูปที่ 2 ลักษณะสารพันธุกรรมของเชื้อ human polyomavirus	6
รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนของ PCR.....	12
รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนของ Nested PCR.....	13
รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ sensitivity (PCR1).....	28
รูปที่ 6 ผลการวิเคราะห์ sensitivity (PCR2).....	28
รูปที่ 7 ตัวอย่างตรวจสอบยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).....	29
รูปที่ 8 ตัวอย่างผลการตรวจหาเชื้อ Human Polyomaviruses ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	30
รูปที่ 9 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	30
รูปที่ 10 ผลการ BLAST ของตัวอย่างที่ตรวจพบ Human Polyomaviruses.....	31
รูปที่ 11 แสดงไฟร์เมอร์ whole genome ของ WUPyV.....	32
รูปที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 กับ 17 isolate ของ WUPyV.....	34
รูปที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 กับ 17 isolate ของ WUPyV.....	34
รูปที่ 14 แสดงภาพการเปรียบเทียบจากโปรแกรม Simplot.....	36
รูปที่ 15 แสดงผลการ Blast ของตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3	44
รูปที่ 16 แผนภาพแสดง Phylogenetic tree ของ HPyV.....	45
รูปที่ 17 แสดง Phylogenetic tree ของยีน VP2/VP3	46
รูปที่ 18 แสดง Phylogenetic tree ของยีน VP1.....	47
รูปที่ 19 แสดง Phylogenetic tree ของยีน LTAg.....	48
รูปที่ 20 แสดง Phylogenetic tree ของยีน STAg.....	49

คำอธิบายและสัญลักษณ์คำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
μl	Microliter
BKPyV	BK polyomavirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPyV	Human Polyomaviruses
IgA	Immunoglobulin A
JCPyV	JC polyomavirus
KIPyV	Karolinska Institute polyomavirus
LTAg	Large T antigen
MCPyV	Merkel cell polyomavirus
ml	Mililiter
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
RST	respiratory tract secretion
STAg	Small T antigen
STLPyV	Saint Louis polyomavirus
Tm	Melting Temperature
TSPyV	Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus
VP1	viral capsid protein 1
VP2	viral capsid protein 2

VP3

viral capsid protein 3

WUPyV

Washington University polyomavirus



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินหายใจนั้นพบได้เป็นจำนวนมากซึ่งก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจ และเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพที่พบได้ทั่วไปในทุกเพศทุกวัย โดยมักพบได้บ่อยในช่วงของฤดูฝนหรือในช่วงที่อากาศเปลี่ยนแปลงได้บ่อย ซึ่งในบางปีนั้นอาจพบการระบาดของไข้หวัดใหญ่เป็นอันดับต้นๆของการเกิดโรคอีกด้วย โดยอาการส่วนใหญ่ที่พบได้ในผู้ป่วย ได้แก่ อาการไข้สูง ตัวร้อน หนาว ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ขมในคอ คัดจมูก และมีน้ำมูกเป็นต้น สาเหตุหลักส่วนใหญ่ที่พบเกิดจากการติดเชื้อไวรัสที่มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น Respiratory syncytial viruses, Influenza viruses, Rhinoviruses, Coronaviruses และ Adenoviruses (1) เป็นต้น โดยการติดเชื้อเกิดขึ้นบริเวณระบบทางเดินหายใจนั้นพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุมักจะอยู่ในน้ำลายและเสมหะของผู้ป่วย ทำให้สามารถแพร่กระจายออกมาเวลาไอ จามได้อีกด้วย

นอกจากเชื้อไวรัสที่กล่าวไปในข้างต้นแล้ว ปัจจุบันยังพบเชื้อ Human Polyomaviruses ซึ่งเป็นไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่น่าจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจได้อีกด้วยโดยสามารถจำแนกเชื้อ Human Polyomaviruses ได้เป็น 12 สายพันธุ์ คือ BK polyomavirus (BKPyV), JC polyomavirus (JCPyV), KI (Karolinska Institute) polyomavirus (KIPyV), WU (Washington University) polyomavirus (WUPyV), Merkel cell polyomavirus (MCPyV), Human polyomavirus 6 (HPyV-6), Human polyomavirus 7 (HPyV-7), Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV), Human polyomavirus 9 (HPyV-9), Human polyomavirus 10 (HPyV-10), Saint Louis polyomavirus (STLPyV) และ Human polyomavirus 12 (HPyV-12) จากการศึกษาที่ผ่านมาตรวจพบเชื้อ Human Polyomavirus จำนวน 4 สายพันธุ์ ในสิ่งส่งตรวจทางระบบทางเดินหายใจได้แก่ KIPyV , WUPyV, MCPyV และ HPyV-9 โดยส่วนใหญ่จะพบมากในวัยเด็ก และช่วงที่พบการก่อโรคจะอยู่ในฤดูฝนและฤดูหนาวเป็นต้น

ในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ Human Polyomaviruses ในระบบทางเดินหายใจค่อนข้างน้อยมาก จากฐานข้อมูล PubMed พบว่าในปี ค.ศ. 2008 มีรายงานการติดเชื้อและการจำแนกสายพันธุ์ของ KIPyV (1.99%) และ WUPyV (6.29%) ในผู้ป่วยเด็กที่มีการอาการป่วยด้านระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย (2) ซึ่งหลังจากนั้นก็ไม่มีรายงานเพิ่มเติมอีกเลย นอกจากนี้ระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ MCPyV และ HPyV-9 ในประเทศไทย ก็ยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการติดเชื้อ Human Polyomaviruses สายพันธุ์ KIPyV, WUPyV, MCPyV และ HPyV-9 ของผู้ป่วยติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย ในช่วงปี 2009-2013 พร้อมทั้งจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุล เพื่อประโยชน์ในการป้องกัน และการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสต่อไป

คำถามงานวิจัย (Research question)

1. ความชุกของเชื้อ Human Polyomaviruses ที่พบในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยช่วงปี 2009-2013 เป็นอย่างไร
2. เชื้อ Human Polyomaviruses ที่พบในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยมีสายพันธุ์ใดบ้าง และมีลักษณะทางพันธุกรรมอย่างไร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ Human Polyomaviruses ที่ติดเชื้อในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจที่พบในประเทศไทยช่วงปี 2009-2013
2. เพื่อศึกษาจำแนกสายพันธุ์และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ Human Polyomaviruses ที่พบในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย

สมมติฐาน (Hypothesis)

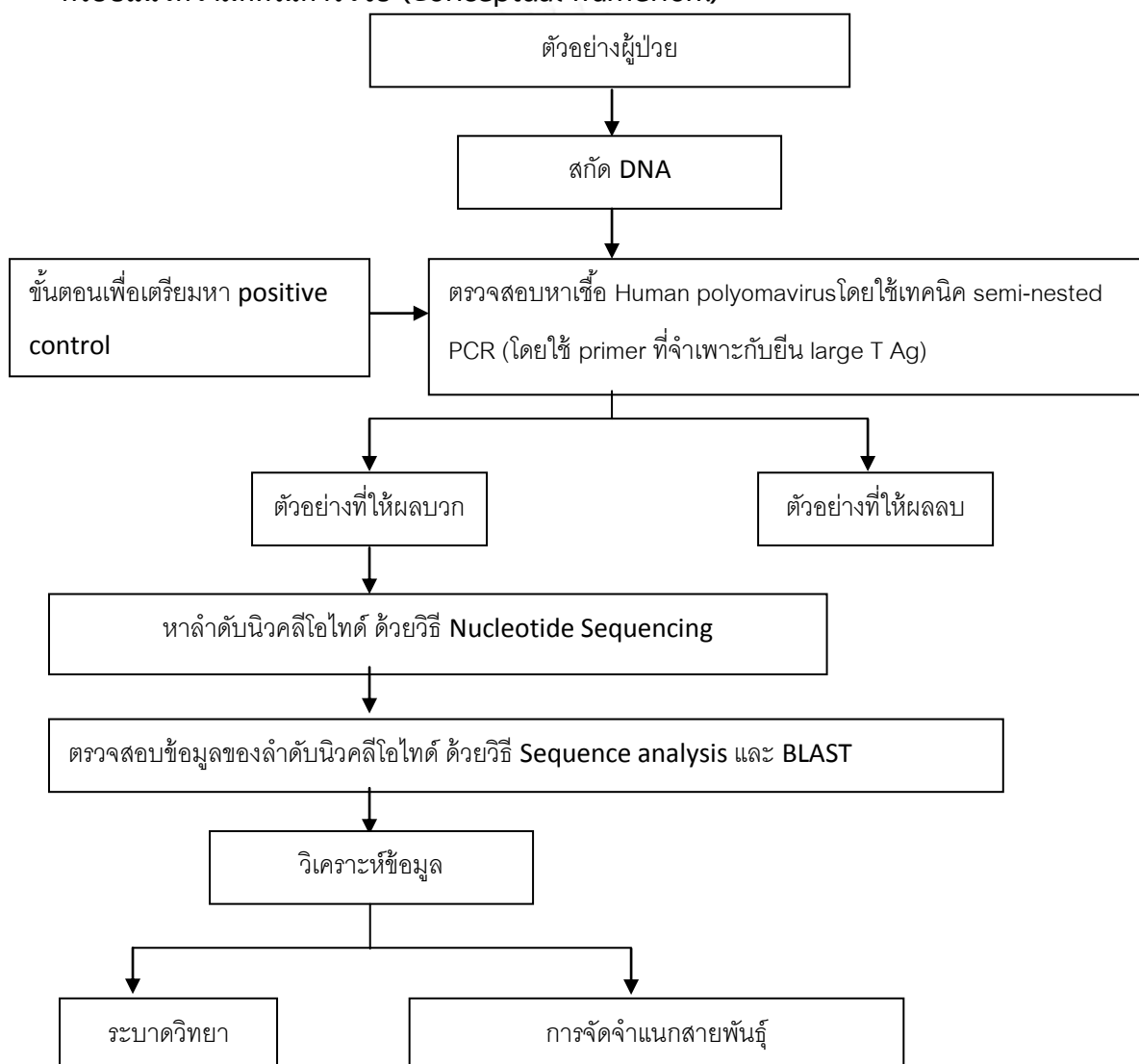
1. การติดเชื้อ Human Polyomaviruses ในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยมีอัตราความชุกใกล้เคียงกับที่มีรายงานในประเทศต่าง ๆ
2. เชื้อ Human Polyomaviruses ที่พบในประเทศไทยมีสายพันธุ์ และลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสที่มีรายงานไว้ในประเทศต่าง ๆ

ข้อตกลงเบื้องต้น : ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Phylogenetic analysis คือ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตเชิงวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



หมายเหตุ : จะศึกษาแต่ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น Positive เท่านั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและการประยุกต์ใช้ (Expected benefit and application)

1. ทำให้ทราบความชุกของเชื้อ Human Polyomaviruses ในประเทศไทย และสายพันธุ์ที่พบการระบาดในประเทศไทย
2. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการวางแผนเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ในแต่ละปี พร้อมทั้งเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ Human Polyomaviruses ในประเทศไทยต่อไปได้
3. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น
4. ข้อมูล nucleotide sequences ที่ได้จากการศึกษา จะถูกเผยแพร่ใน GenBank database เพื่อใช้ในการอ้างอิง และการวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บททวนวรรณกรรม (Review of the Related Literatures)

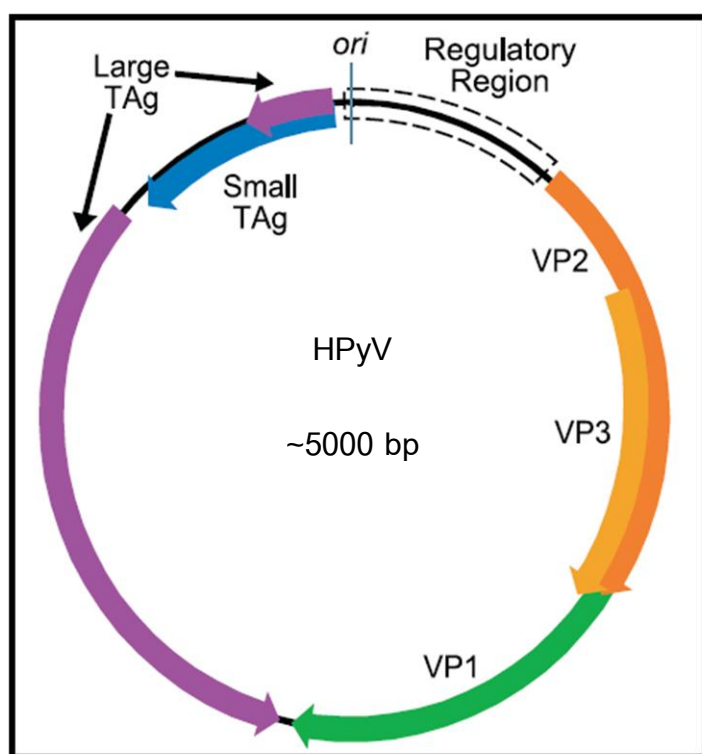
Polyomaviruses เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-50 นาโนเมตร ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-enveloped) ดังรูปที่ 1 จัดอยู่ใน family *Polyomaviridae* เป็นดีเอ็นเอไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (2)

โดยไวรัสนี้สามารถติดเชื้อในนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ โดยเมื่อปีที่ผ่านมามีการเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์เชื้อไวรัสชนิดดังกล่าวเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังพบว่าไวรัสนี้สามารถติดเชื้อในมนุษย์ได้อีกด้วยโดยไวรัสนี้มีขนาดจีโนมประมาณ 5,000 base pairs ลักษณะของจีโนมเป็นวงกลม (circular genome) ซึ่งประกอบด้วย VP1, VP2, VP3, small T antigen และ large T antigen ดังรูปที่ 2 ภายในจีโนมสามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ

1. Early region ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง regulatory proteins ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส และการแสดงออกของยีน โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวจะประกอบไปด้วย (3)
 - Large T antigen : จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณภายใน cell cycle
 - Small T antigen : เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์
2. Late region จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง capsid proteins ประกอบไปด้วย (3)
 - Viral capsid protein 1 (VP1) : จัดเป็น major coat protein อีกทั้งยังเป็น target cell receptor
 - Viral capsid protein 2 (VP2) : จัดเป็น minor coat protein
 - Viral capsid protein 3 (VP3) : จัดเป็น minor coat protein
3. Non-coding region ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ origin of replication และการ transcription control elements (3)



รูปที่ 1 ลักษณะ viral particle ของเชื้อ human polyomavirus (1)



รูปที่ 2 ลักษณะสารพันธุกรรมของเชื้อ human polyomavirus (4)

ปัจจุบันพบว่าจำนวน Polyomaviruses ที่พบในมนุษย์นั้นมี 12 สายพันธุ์ คือ BK polyomavirus (BKPyV), JC polyomavirus (JCPyV), KI (Karolinska Institute) polyomaviruses (KIPyV), WU (Washington University) polyomaviruses (WUPyV), Merkel cell polyomavirus (MCPyV), Human polyomavirus 6 (HPyV-6), Human polyomavirus 7 (HPyV-7), Trichodysplasia Spinulosa-associated virus (TSPyV), Human polyomavirus 9 (HPyV-9), Human polyomavirus 10 (HPyV-10), Saint Louis polyomavirus (STLPyV) และ Human polyomavirus 12 (HPyV-12) ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีขนาดจีโนมแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1 (3)

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของ Human Polyomaviruses แต่ละชนิด (3)

HPyV	Accession number	Genome (bp)	LT-ag	ST-ag	VP1	VP2	VP3
JCV	NC_001699	5130	688	172	354	344	225
BKV	NC_001538	5153	695	172	362	351	232
KI	NC_009238	5040	641	191	378	400	257
WU	NC_009539	5229	648	194	369	415	272
MCPyV	NC_010277	5387	817	186	423	241	196
HPyV6	NC_014406	4926	669	190	387	336	215
HPyV7	NC_014407	4952	671	193	380	329	209
TSPyV	NC_014361	5232	698/692	199	376	313	195
HPyV9	NC_015150	5026	680	189	371	352	233
HPyV10	JX262162	4927	668	199	403	310	200
STLPyV	JX463183	4776	660	195	401	303	195
HPyV12	JX308829	5033	708	182	380	313	197

หมายเหตุ : ตัวเลขที่แสดงในตารางนั้นแสดงถึงจำนวนของกรดอะมิโน ยกเว้นในส่วน Genome เป็นตัวเลขที่แสดงขนาดของจีโนมในแต่ละสายพันธุ์

Human polyomaviruses ทั้ง 12 สายพันธุ์ ที่กล่าวไปข้างต้น สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคแตกต่างกันออกไป ดังตารางที่ 2 ได้แก่

- BKPyV ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับไตและกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งไวรัสนี้สามารถตรวจพบได้จากปัสสาวะของผู้ป่วย (5)
- JCPyV พบในผู้ป่วย Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) (6)
- KIPyV และ WUPyV สามารถตรวจพบได้ทางระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยซึ่งไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ส่วนใหญ่พบในวัยเด็กที่เป็นไขหวัด (7)
- MCPyV จะพบในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิด Merkel cell carcinoma (8)
- HPyV-6 ,HPyV-7 และ TSPyV สามารถพบในกลุ่มผู้ป่วยโรคผิวหนัง (3)
- HPyV-9 พบในผู้ป่วยที่มีภาวะโรคไตหรือมีการเปลี่ยนไต (9)
- HPyV-10 และ Saint Louis polyomavirus (STLPyV) พบในตัวอย่างอุจจาระ (10)
- HPyV-12 พบในระบบทางเดินอาหาร (11)

นอกจากนี้โดยปัจจุบัน Human Polyomaviruses ที่พบในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ KI (Karolinska Institute) และ polyomaviruses, WU (Washington University) polyomaviruses อีกทั้งยังเป็นที่น่าสนใจ ว่า Merkel cell polyomavirus (MCPyV) และ HPyV-9 นั้นสามารถตรวจพบใน specimen ในทางเดินหายใจอีกด้วยจึงทำให้ไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้อาจเป็นสาเหตุในการก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจเพิ่มขึ้นอีกด้วย

ตารางที่ 2 แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ Human Polyomaviruses ทั้ง 12 สายพันธุ์ (12)

Human polyomavirus	Source
BKPyV	Kidney transplant recipient (5)
JCPyV	PML patient (6)
KIPyV	Respiratory Tract (7)
WUPyV	Respiratory Tract (4)
MCPyV	Merkel Cell Carcinoma (8)
HPyV6	Normal skin (13)
HPyV7	Normal skin (13)
TSPyV	Trichody splasia Spinulosa (14)
HPyV9	Kidney transplant recipient (15)
HPyV10	Healthy Stool form Malawi WHM patient (16, 17)
STLPyV	Clinical stool specimens (10)
HPyV12	Gastrointestinal Tract (11)

จากการศึกษาตัวอย่าง respiratory tract ในผู้ป่วยเพื่อตรวจหาเชื้อ KIPyV, WUPyV และ MCPyV โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า WUPyV ให้ผลที่เป็นเปอร์เซ็นต์ positive มากกว่า KIPyV และ MCPyV (18) อีกทั้งยังพบว่าจากการศึกษาการติดเชื้อของ KIPyV, WUPyV และ MCPyV ที่รวบรวมได้จากตัวอย่างเลือด , อุจจาระ และสารคัดหลั่งทางระบบทางเดินหายใจ ในผู้ป่วยทั่วโลกไม่ว่าจะเป็น

ประเทศสวีเดน อิตาลี ออสเตรเลีย ฝรั่งเศส ไทย เกาหลีเหนือ จีน อเมริกา แคนาดา เป็นต้น ยังพบว่า WUPyV และ KIPyV พบในอัตราที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีการติดตามระบบทางเดินหายใจ (19) อาจสรุปได้ตามตารางที่ 3 ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงความชุกของการพบเชื้อ Human polyomavirus บริเวณระบบทางเดินหายใจ (19)

Polyomavirus	Sample type	prevalence	Country
KIPyV	RST	1.99%	Thailand (2)
KIPyV	RST	0.94%	Sweden (7)
KIPyV	RST	2.6%	United Kingdom (20)
KIPyV	RST	0.48%	China (21)
KIPyV	RST	0.55%	France (22)
KIPyV	RST	1.03%	South Korea (23)
KIPyV	RST	2.52%	Australia (24)
KIPyV	RST	0.45%	Italy (19)
WUPyV	RST	6.29%	Thailand (2)
WUPyV	RST	1.02%	United Kingdom (25)
WUPyV	RST	2.97%	Australia (4)
WUPyV	RST	2.42%	France (22)
WUPyV	RST	2.41%	China (21)
WUPyV	RST	6.41%	Canada (26)
WUPyV	RST	6.99%	South Korea (23)
MCPyV	RST	4.25%	Sweden (27)
MCPyV	RST	1.33%	Australia (28)
MCPyV	RST	17.2%	Italy (19)
HPyV9	RST	2.0%	Hungary (29)

หมายเหตุ : RST คือ respiratory tract secretion

การศึกษาในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ WUPyV และ KIPyV ที่ก่อโรคในผู้ป่วยเด็กที่มีอายุที่ 3 เดือน ถึง 9 ปีโดยการตรวจพบทางระบบทางเดินหายใจ (2) พบว่ามีการติดเชื้อ WUPyV ในเด็กไทยถึง 6.29% ซึ่งมีอัตราที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับประเทศออสเตรเลีย (4.5%) (24) และสหราชอาณาจักร (1%) (25) และพบเชื้อ KIPyV ในเด็กไทย 1.99% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ ประเทศสวีเดน (1%) (7), ออสเตรเลีย (2.6%) (24) และสหราชอาณาจักร (1.4%) (20) นอกจากนี้มีการศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ AIDS พบว่ามีการตรวจพบเชื้อ WUPyV และ KIPyV โดยให้ผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย (9)

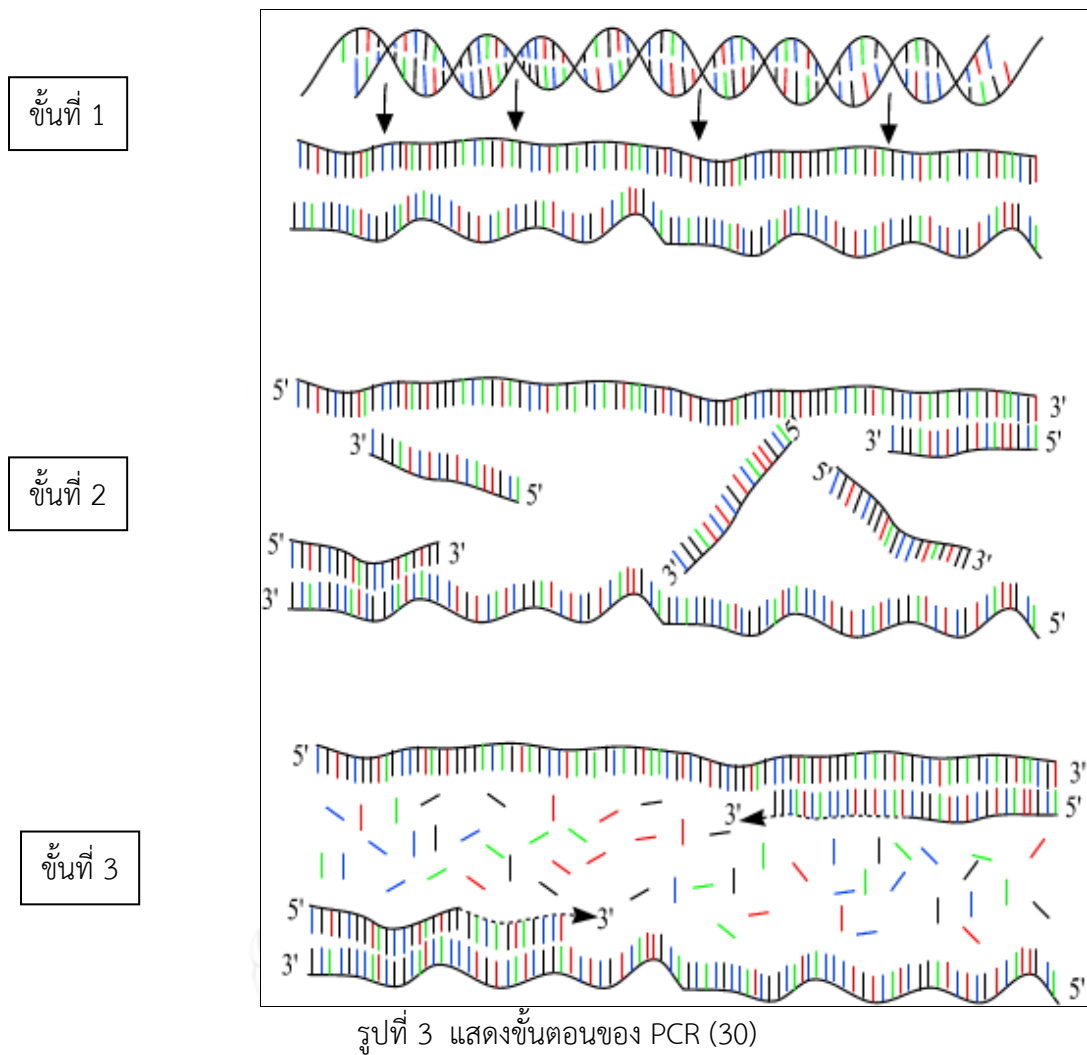
สำหรับการศึกษา HPyV-9 ในผู้หญิงตั้งครรภ์โดยศึกษาใน 3 ตัวอย่างด้วยกันคือเลือด ปัสสาวะ และทางระบบทางเดินหายใจ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสดังกล่าวในผู้หญิงที่ตั้งครรภ์ แต่ขณะเดียวกันไม่สามารถตรวจพบ WUPyV และ KIPyV จากทั้ง 3 ตัวอย่างในผู้หญิงที่ตั้งครรภ์ (29)

โดยพบว่าจากการศึกษาส่วนใหญ่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปนั้นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย คือ เทคนิค polymerase chain reaction หรือ PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออาศัยหลักการ DNA replication เทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงเท่านั้นโดยเทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี 1983 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation ซึ่งด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้มีความไวและจำเพาะเจาะจงจึงเป็นที่นิยมและใช้ในการตรวจวินิจฉัยจนถึงปัจจุบัน โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1 : Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นสายคู่ ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° C

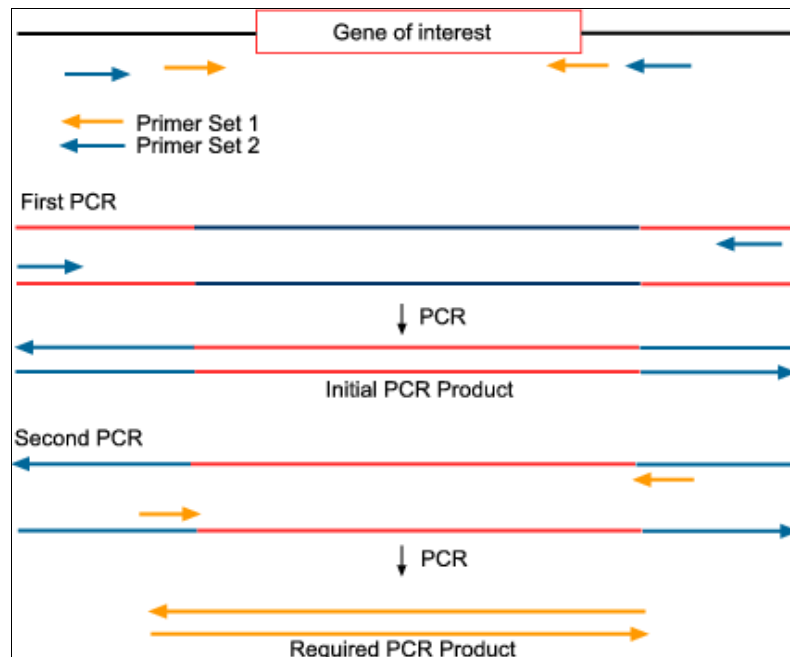
ขั้นที่ 2 : Annealing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 10-14 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60° C

ขั้นที่ 3 : Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ซึ่งเอนไซม์นี้ สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75° C



Nested PCR

คือการทำให้ PCR โดยใช้ primer 2 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณของ DNA ที่ต้องการ โดยการทำให้ PCR ครั้งแรกจะใช้ไพรเมอร์คู่แรก (F1, R1) จากนั้นจะใช้ผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ได้จากรอบแรกมาเป็น DNA template ในการทำให้ PCR รอบที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 (F2, R2) (รูปที่ 4) ทั้งนี้วิธีดังกล่าวนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มค่า sensitivity ของการตรวจวิเคราะห์ให้สูงขึ้นกว่าการทำ PCR ทั่วไป



รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนของ Nested PCR (30)

Semi-nested PCR

คือการทำให้ PCR ที่ประยุกต์มาจากเทคนิค Semi-nested PCR ซึ่งวิธีนี้จะใช้ไพรเมอร์น้อยกว่าวิธี nested PCR กล่าวคือจะประกอบไปด้วยการทำ PCR 2 รอบด้วยกัน โดยจะใช้ผลิตภัณฑ์ของ PCR รอบที่ 1 เป็น DNA template ในการทำ PCR รอบที่ 2 โดยจะใช้ไพรเมอร์ใหม่ร่วมกับไพรเมอร์เดิมทั้งนี้วิธีดังกล่าวนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มค่า sensitivity ของการตรวจวิเคราะห์ให้สูงขึ้นกว่าการทำ PCR ทั่วไปเช่นเดียวกับเทคนิค nested PCR

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Descriptive Study)

รูปแบบการวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Cross-sectional study) โดยโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้ว IRB No. 457/56

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ
 - ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit (Real Genomics, USA)
2. สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR
 - DNA template
 - dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)
 - Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)
 - *Taq* DNA polymerase, Recombination (Invitrogen, USA; Cat No. 11615-010)
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)
 - RBC HiYield™ Ge/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YDF300)
4. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector
 - RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. RC013)

5. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation

- Agar (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. RC013)
- Ampicillin (General Drugs House, Thailand)
- Distill water (DW)
- Glucose (Ajax Finechem, NZ; Cat No. 783)
- Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMRESCO, USA; Cat No. 0487)
- Potassium chloride (KCl)
- Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
- Tryptone (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. 223000)
- X-gal (AMRESCO, USA; Cat No. 0428)
- Yeast extract (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. 210934)

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)

- RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YPD300)

7. สารเคมีที่ใช้ในการ Agarose gel electrophoresis

- 100 bp DNA ladder H3 RTU (Ready-to-Use) (GeneDireX, Taiwan; Cat No. DM003-R500)
- Agarose (Invitrogen, USA; Cat No. 75510-019)
- Boric acid (Fisher Scientific, UK)
- Ethidium bromide (AMRESCO, USA; Cat No. 0.492)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Singapore, Cat No. E9884)
- Tris base (Promega, USA)

8. วัสดุ และอุปกรณ์ทั่วไปสำหรับงานวิจัย

- Heat block (Bioer Technology)
- Mini Centrifuge (Eppendorf)

- ตู้ป่น 37 องศาเซลเซียส (Biosan)
 - MicroCentrifuge Tube ขนาด 0.2 และ 1.5 ml (Axygen)
 - Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 μ l (Neptune)
 - Autopipette ขนาด 3, 10, 20, 100, 200 และ 1,000 μ l (Biohit)
9. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
(www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)
 - BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.4.1)
(bioedit.software.informer.com)
 - Oligos Primer Design Software (Version 9.1) (www.oligo.net)
 - Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) (version 5.05)
(<http://www.megasoftware.net>)
 - Simplot (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRoftware/simplot>)

วิธีดำเนินงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยไม่ได้เป็นผู้ดำเนินการขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและการสกัด DNA ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่เหลือเก็บจากงานตรวจวินิจฉัย ในงานบริการประจำวันของทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก เพื่อการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งจะมีทั้งตัวอย่างเก่าที่เคยเก็บมาแล้วและตรวจวินิจฉัยในงานบริการของทางศูนย์เรียบร้อยแล้ว อีกทั้งตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ในโครงการวิจัย IRB No. 386/53 และ IRB No. 378/56 ซึ่งเป็นโครงการวิจัยที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างของผู้ป่วย

ตัวอย่างที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ประกอบไปด้วย 641 ตัวอย่างจากผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลชลบุรี ประกอบด้วย

- Nasopharyngeal aspirate (NP suction) จำนวน 607 ตัวอย่าง
- Tracheal suction จำนวน 28 ตัวอย่าง
- endotracheal suction (ET suction) จำนวน 6 ตัวอย่าง

การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit

ตัวอย่างที่จะนำมาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- แบ่งตัวอย่างปริมาตร 200 μ l ใส่ microcentrifuge tube จากนั้นเติม VB buffer ลงไป จากนั้นนำไป vortex
- incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- เติม 95% ethanol ลงไป นำไป vortex
- นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน VB column ที่เตรียมไว้ให้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 4 °C 13,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 1 นาทีแล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- เติม W1 buffer ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 1 นาทีแล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- เติม R-Wash buffer ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C 13,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นต่ออีก 5 นาทีเพื่อให้สารที่เหลือใน column หายไปจนหมด
- ย้าย column ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากนั้นเติม RNase free water 50 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อชะล้าง RNA จาก column ลงไปใน microcentrifuge tube

หมายเหตุ : การจัดเก็บตัวอย่าง DNA ที่เหลือจากโครงการวิจัยในครั้งนี้ทั้งหมดจะถูกเก็บใส่ไว้ใน microcentrifuge tube ที่ อุณหภูมิ -70 °C ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิกชั้น 9 อาคาร ส.ก. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

การตรวจสอบผลการสกัด DNA

ตรวจสอบผลด้วยการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งใช้เป็น universal housekeeping gene โดยใช้ไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการตรวจหายีน GAPDH

Primer's name	Sequence (5' → 3')	Position	Product size (bp)
GAPDH_F404	CTTCACCACCATGGAGAAGG	404-424	199
GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	603-583	

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน GAPDH

สารเคมี	ปริมาตร (μl)	Final conc.
10X Dream Taq Green Buffer	1.25	1X
Forward primer (10 mM)	0.25	0.2 mM
Reverse primer (10 mM)	0.25	0.2 mM
dNTP	0.25	0.2 mM
Dream Taq DNA Polymerase	0.06	1.25 U
DNA template	1	-
Distilled water	9.44	-
Total	12.5 μl	

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน GAPDH

PCR reaction	อุณหภูมิ / เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94°C เป็นเวลา 3 นาที	1
Denaturation Step	94°C เป็นเวลา 30 วินาที	} 40 รอบ
Annealing Step	55°C เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension Step	72°C เป็นเวลา 30 วินาที	
Final extension	72°C เป็นเวลา 7 นาที	1

วิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยการทำ Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose gel โดยมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ในการแยกหาขนาดของ PCR Product ตามที่ต้องการและเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder (marker) และย้อมดูแถบ PCR Product ที่ต้องการด้วย Ethidium bromide ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ที่คาดการณ์ไว้ คือ 199 bp

การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะต่อ human polyomavirus ด้วยวิธี Semi-nested PCR

นำตัวตัวอย่างที่ได้มาเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของยีน large T Ag ซึ่งยีนบริเวณดังกล่าวนี้เป็นช่วงที่มี conserve regions มากที่สุดเมื่อเทียบกับยีนบริเวณอื่นๆของเชื้อ Human Polyomaviruses ในทุกสายพันธุ์ โดยการเปรียบเทียบข้อมูลนั้นจะใช้โปรแกรม Bioedit ในการวิเคราะห์เพื่อหาช่วงยีนที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์

หลักการที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์นั้นอาศัยหลักการดังต่อไปนี้

- ความยาวของไพรเมอร์ควรมีขนาดประมาณ 18-22 bp
- ไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายบนสาย DNA ต้นแบบเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด non-specific product
- ไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีลำดับเบสที่ซ้ำๆกันอยู่ติดกัน
- หลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์บนไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกันเอง (primer dimer)
- ค่า GC content ควรมีค่า 50-60%
- ค่า Tm (melting temperature) ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ควรมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งหาได้จากสูตร

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

จากนั้นจะทำมาทดสอบหาเชื้อ Human Polyomaviruses ด้วยวิธี semi-nested PCR โดยใช้ primers ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR

Primer Name	Sequence (5' → 3') [#]	Position*
KI/WU_4337F	CATTATTAACWCCTTTACARAATAA	4337-4361
KI/WU_4390F	AAGTTATTAAYAGCACTAACTCTATG	4390-4415
SP6 KI/WU_4585R	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> TGTCWCAWGCTGTATTTAGTAATA	4565-4585
HPyV9_4180F	GTTTAATAACAGCTTTACAATGAAT	4180-4204
HpyV9_4233F	AAATGTTTTACAGCAGAACTCTA	4233-4256
SP6_HpyV9_4443R	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> TAAGTCATGCTATCTATAGTAATA	4420-4443
MCPyV_4180F	CAAATCTAAGAGATTCCCTGGA	4180-4201
MCPyV_4231F	AAGAATTCTTCAAAGTGGAACCA	4231-4253
SP6_MCPyV_4443R	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> CCTCAATAAGAATATTGAGCAG	4422-4443

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึง primer ของ SP6

Degenerate nucleotide: W = A or T, R = A or G, Y = C or T

* Position ของ KIPyV / WUPyV เทียบกับ genome sequence (Accession no. NC_009539.1)

* Position ของ HPyV9 เทียบกับ genome sequence (Accession no. NC_015150.1)

* Position ของ MCPyV เทียบกับ genome sequence (Accession no. NC_010277.1)

ตารางที่ 8 แสดงการเข้าคู่ของ primer ในการตรวจสอบ human polyomavirus

Virus	First PCR	Size (bp)	Second PCR	Size (bp)
KIPyV & WUPyV	KI/WU_4337F / SP6_KI/WU_4585R	268	KI/WU_4390F / SP6 KI/WU_4585R	215
HPyV9	HPyV9_4180F / SP6_HpyV9_4443R	283	HPyV9_4233F/ SP6_HpyV9_4443R	230
MCPyV	MCPyV_4180F / SP6_MCPyV_4443R	283	MCPyV_4231F/ SP6_MCPyV_4443R	232

ตารางที่ 9 แสดงส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ HPyV

สารเคมี (ใช้ทั้ง 1 st และ 2 nd PCR)	ปริมาตร (µl)	Final conc.
10X PCR buffer minus Mg	1.25	1X
10 mM dNTP	0.25	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	0.375	1.5 mM
Forward primer (10 mM)	0.25	0.2 mM
Reverse primer (10 mM)	0.25	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	0.1	1.25 U
DNA template	1 µl	-
Distilled water	9.025	-
Total	12.5 µl	

จากนั้นนำ PCR tube ที่ใส่ส่วนผสมของสารเคมีทั้งหมดใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Master cycler personal) ในสถานะอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ของเชื้อ Human Polyomaviruses

PCR reaction	อุณหภูมิ / เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94°C เป็นเวลา 3 นาที	1
Denaturation Step	94°C เป็นเวลา 30 วินาที	} 40 รอบ
Annealing Step	55°C เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension Step	72°C เป็นเวลา 30 วินาที	
Final extension	72°C เป็นเวลา 7 นาที	1

ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

1. นำ PCR product ของ 2nd PCR ที่ได้มาทำการแยกด้วย 2% Agarose gel electrophoresis โดยมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker แล้วย้อมดูแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide เพื่อตรวจสอบขนาด DNA ที่ต้องการ

2. ตัด gel บริเวณที่มีแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction ด้วย HiYield™ Gel Extraction

- ตัด agarose gel ที่มี DNA ที่สนใจ
- ใส่ชิ้น agarose gel ที่ได้ลงใน microcentrifuge tube
- เติม DF Buffer 500 µl ลงใน microcentrifuge tube ดังกล่าวผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex
- บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C 10-15 นาที หรือจนกระทั่ง agarose gel ละลายหมด โดยระหว่างบ่มนั้นควรกลับ microcentrifuge tube ทุกๆ 2-3 นาที
- นำสารละลายที่ได้ข้อด้านบนเติมลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube
- Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที
- ถ่ายของเหลวใน collection tube ออก แล้วใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
- เติม Wash Buffer 600 µl ลงใน DF column
- Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที
- ถ่ายของเหลวใน collection tube ออก แล้วใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
- Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm 2 นาที
- ถ่าย DF column ไปยัง microcentrifuge อันใหม่
- เติม Elution Buffer 20-50 µl ลงไปใน column
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Elution Buffer ถูกดูดซึมบนเยื่อใน DF column
- Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm 2 นาที
- จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์ โดยจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ -20 °C

การเตรียม Positive control ด้วยวิธี Cloning

เมื่อได้ผลของยีนในส่วนที่ต้องการแล้วจะนำมาทำการโคลนเพื่อเก็บเป็น Positive control และเพื่อใช้ในการค่า specificity และ sensitivity ของไพรเมอร์ต่อไป โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Ligation

เตรียมสารละลายสำหรับทำ Ligation ระหว่าง PCR product กับพลาสมิด T/A vector (RBC)

- 2x buffer 5.0 μ l	- T4 DNA ligase 1.0 μ l
- T/A vector (RBC) 1.0 μ l	- purified DNA 3.0 μ l

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2. Transformation ด้วยวิธี heat shock

1. เตรียม competent cell *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ปริมาตร 50 μ l ในหลอด 1.5 ml จากนั้นเติมสารละลาย ligation 2 μ l
2. นำหลอดไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
3. เพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปใส่ใน heat block ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีด้วยการบ่มบนน้ำแข็ง 2 นาที
4. เติม SOC medium (รายละเอียดดังภาคผนวก) ปริมาตร 950 μ l ลงในหลอด
5. นำไปเขย่าที่ความเร็วประมาณ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
6. จากนั้นนำไปปั่นที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
7. เทสารละลายทิ้ง จะเหลือตะกอนของเซลล์ที่ก้นหลอดประมาณ 45 μ l
8. เติม X-gal ปริมาตร 15 μ l และ IPTG ปริมาตร 5 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้น spread บน LB agar plate ที่ผสมด้วย ampicilin (100 mg/ml)
9. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ recombinant plasmid ด้วยวิธี White/Blue Selection
10. คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar มาใส่ลงใน LB broth ที่ผสมด้วย ampicilin (100 mg/ml)
11. นำไปเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีพลาสมิด

3. Plasmid extraction

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการสกัด plasmid ปริมาตร 1.5 ml มาใส่ลงในหลอด 2 ml
2. นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อสลายเซลล์ให้แตกก่อนเซลล์ไว้
3. นำเซลล์ที่ได้มาละลายในสารละลายสำหรับ lysis ปริมาตร 400 μ l ปั่นที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
4. นำสารละลายเซลล์จากข้อ 3. ใส่ลงใน spin column และปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
5. เติม diluted wash buffer ปริมาตร 400 μ l
6. นำ spin column ไปปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที
7. เทสารละลายที่ผ่าน spin column ทิ้ง และนำไปปั่นที่ความเร็วเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อชะเอาสารละลายที่หลงเหลือใน column ออกให้หมด
8. จากนั้นนำ spin column ใส่ลงใน collection tube ใหม่และเติม elution buffer ปริมาตร 50 μ l
9. นำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด 1 นาทีได้สารละลายของพลาสมิดที่บริสุทธิ์แล้วปริมาตร 50 μ l

การวัดปริมาณพลาสมิด

วัดค่าการดูดกลืนแสงของพลาสมิดที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิด ความบริสุทธิ์ของสารละลายพลาสมิด (DNA purity) คำนวณโดยอาศัยความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} โดยความบริสุทธิ์ที่คำนวณได้ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0 (31)

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย μ g/ml

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = (A_{260} - A_{320}) \times \text{dilution factor} \times 50$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของ $A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ ของสารละลาย DNA บริสุทธิ์
 dilution factor = จำนวนเท่าของการเจือจาง

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย Copy/ μl

$$[\text{DNA}] \text{ Copy/ } \mu\text{l} = \frac{[\text{DNA}](\text{g/ } \mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Length of recombinant plasmid (nt)} \times 660}$$

การคำนวณค่า sensitivity ของไพรเมอร์ด้วยการทำ 10-fold serial dilution

เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับใช้ Positive control แล้ว จึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 (10-fold serial dilution) และให้มีค่าความเข้มข้นของ พลาสมิดอยู่ระหว่าง 10^{10} - 10^0 Copies/ μl ต่อ PCR reaction ค่า sensitivity คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถให้ PCR product ขนาดตรงตามต้องการได้ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ยอมรับได้สำหรับการทำ PCR คือประมาณ 10 - 10^3 Copies/ μl

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ Direct Nucleotide Sequencing

นำ DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งไปตรวจกับบริษัท First base laboratories Sdn Bhd จากนั้นนำผล sequencing ที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไปโดยการ BLAST เทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast เพื่อยืนยันในขั้นต้นว่ารหัสพันธุกรรมที่ได้เป็นเชื้อ HPyV หรือไม่ และจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มใด รวมถึงทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPyV สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

Whole genome

หลังจากทราบสายพันธุ์ของเชื้อ HPyV แล้วจะนำมาศึกษา Whole genome ต่อไป โดยใช้ไพรเมอร์ (2) ดังแสดงในตารางที่ 11 ในการทำ PCR โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR จะใช้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 11 แสดงไพรเมอร์ของ WUPyV ในการทำ PCR (2)

Primer Name	Sequence (5' → 3') [#]	Position*	Size (bp)
WU/KI_4969F	TTGCAGTTTTTAAATATAAAGAATTAAG	4969-4995	1395
WU/KI_761R	ACAGTAGYAGCTGCTTCAGATAT	761-739	
WU/KI_1134R	GGCAATTCTATTGAACACGTCCT	1134-1112	
WU/KI_989F	CCCCCTACYCAGGAATGGCA	989-1008	1560
WU/KI_1990R	ATTWGGWATATCAGGGGGAGCAA	1990-1968	
WU/KI_2548R	CCTTCTTTGTCTAAARTGTAGCCTA	2548-2524	
WU/KI_2407F	ACTRTTGGATGAAAATGGCATTGG	2407-2430	1695
WU/KI_2870F	GCAAAYTCAGTAAGGCCTATATA	2870-2892	
WU/KI_4101R	CATAGAGTTAGTGCTRTTAATAACTT	4101-4076	
WU/KI_3780F	TACTAYTGCATTTTTTCACTCTTC	3780-3804	1389
WU/KI_4703R	TGTGGATAGAGTGYTACTGCTA	4703-4682	
WU/KI_5168R	AAGAAGGCAAATGGATAAACTTT	5168-5144	

หมายเหตุ

Degenerate nucleotide: W = A or T, R = A or G, Y = C or T

* Position ของ WUPyV เทียบกับ genome sequence (Accession no. NC_009539.1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การทำ Multiple Sequence Alignment และ Phylogenetic analysis

ทำการวิเคราะห์ Multiple Sequence Alignment และทำ whole genome assembly โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1) นอกจากนี้ Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) (version 5.05) โดยใช้วิธี Neighbor-joining method และตั้งค่า Boost strapping เท่ากับ 1000 replicates

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทำ Positive control

การคำนวณค่า sensitivity ของไพรเมอร์ด้วยการทำ 10 fold serial dilution

วัดค่าการดูดกลืนแสงของพลาสมิดที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิด ความบริสุทธิ์ของสารละลายพลาสมิด (DNA purity) คำนวณโดยอาศัยความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280}

$$\begin{aligned} \text{DNA purity} &= A_{260}/A_{280} \\ &= 0.0476/0.0240 = 1.98 \end{aligned}$$

โดยความบริสุทธิ์ที่คำนวณได้จากการทดลองนั้นมีค่า 1.98 จึงถือเป็นค่าที่ยอมรับได้เนื่องจากอยู่ระหว่าง 1.7-2.0 (31)

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิด

$$\begin{aligned} [\text{DNA}] &= (A_{260} - A_{320}) \times \text{dilution factor} \times 50 \\ &= 0.0476 \times 10 \times 50 \\ &= 23.8 \text{ ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

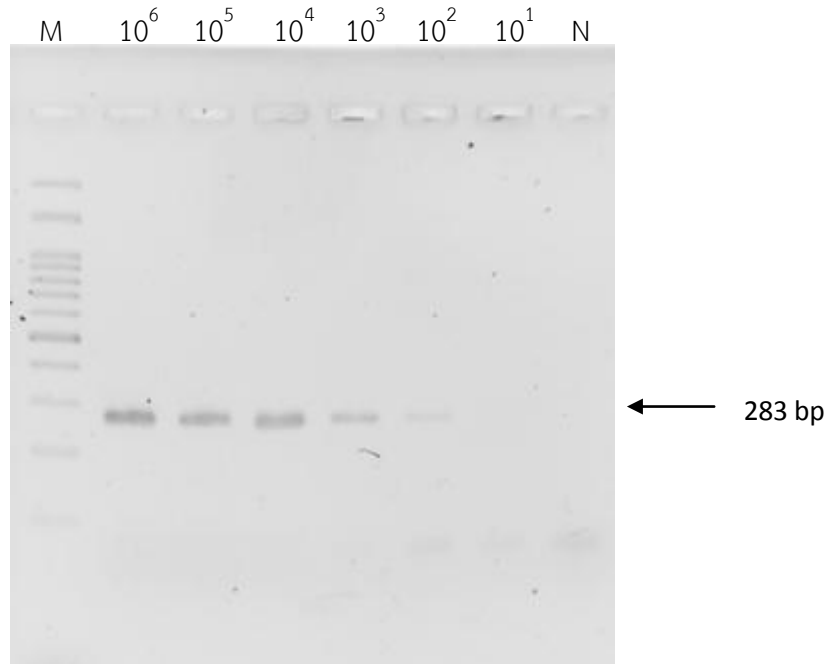
กำหนดให้ 1 หน่วยของ $A_{260} = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ของสารละลาย DNA บริสุทธิ์
dilution factor = จำนวนเท่าของการเจือจาง

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย Copy/ μl

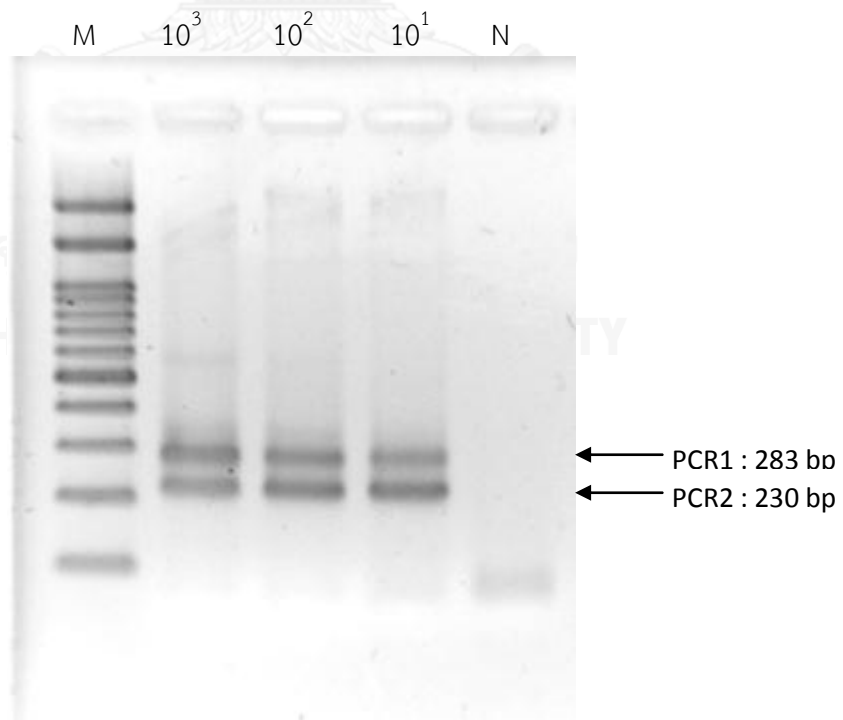
$$\begin{aligned} [\text{DNA}] \text{ Copy}/\mu\text{l} &= \frac{[\text{DNA}](\text{g}/\mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Length of recombinant plasmid (nt)} \times 660} \\ &= \frac{23.8 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{(2723+248+18) \times 660} \\ &= 7.26 \times 10^9 \text{ Copies}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับใช้ Positive control แล้ว จึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 (10 fold serial dilution) และให้มีค่าความเข้มข้นของ พลาสมิดอยู่ระหว่าง $10^{10} - 10^0$ Copies/ μl ต่อ PCR reaction ค่า sensitivity คือค่า

ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถให้ PCR product ขนาดตรงตามต้องการได้ โดยพบว่า ค่า sensitivity ที่ได้จาก PCR1 มีค่า 10^2 Copies/ μ l ดังแสดงในรูปที่ 5 และค่า sensitivity ที่ได้จาก PCR2 มีค่า 10 Copies/ μ l ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ sensitivity (PCR1)



รูปที่ 6 ผลการวิเคราะห์ sensitivity (PCR2)

ผลการศึกษาระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อ Human Polyomaviruses ในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย

ผลการตรวจสอบผลการสกัด DNA ด้วยการทำ PCR

เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งใช้เป็น universal housekeeping gene ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 199 bp

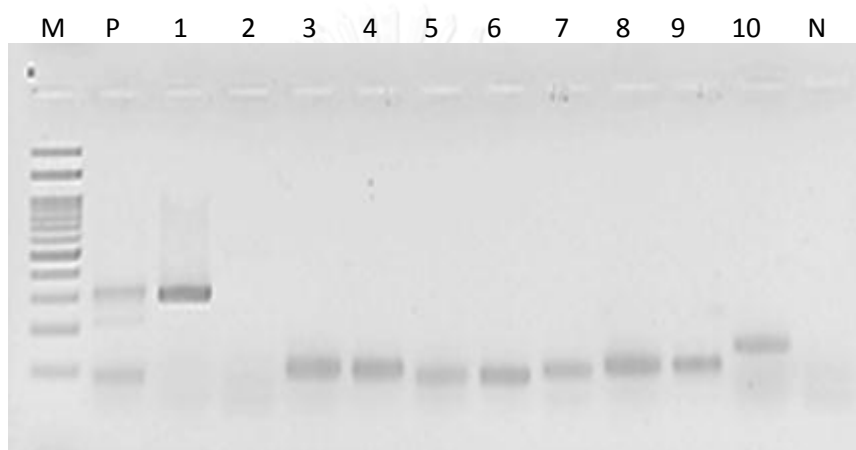


รูปที่ 7 ตัวอย่างตรวจสอบยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

จากการศึกษาการตรวจสอบยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งใช้เป็น universal housekeeping gene จากตัวอย่าง NP suction, Tracheal suction และ ET suction โดยใช้ตัวอย่างที่เหลือเก็บจากงานตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 หรือ Influenza H1N1 ซึ่งเป็นงานบริการประจำวันของทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ยังเป็นตัวอย่างที่เหลือจากโครงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนเรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัสจากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และจากโครงการการศึกษาการติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วยโรคปอดอักเสบ ที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยหนักกุมารเวชกรรมของโรงพยาบาลชลบุรีจำนวน 641 ตัวอย่างนั้นพบว่า 614 ตัวอย่างนั้นพบยีน GAPDH และ อีก 27 ตัวอย่างไม่พบยีน GAPDH โดยการตรวจสอบดังกล่าวนี้เป็นการตรวจสอบว่าคุณภาพของตัวอย่างผู้ป่วยหลังจากการสกัดว่ามี DNA อยู่หรือไม่ ซึ่งจากที่กล่าวข้างต้นนั้นพบว่า 27 ตัวอย่างที่ให้ผลลบกับยีน GAPDH ซึ่งผู้วิจัยจึงตัด 27 ตัวอย่างดังกล่าวทิ้งและจะนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับยีน GAPDH ซึ่งมีทั้งหมด 614 ตัวอย่างไปทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Human polyomavirus ต่อไป

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ Human Polyomaviruses โดยใช้เทคนิค semi-nested PCR

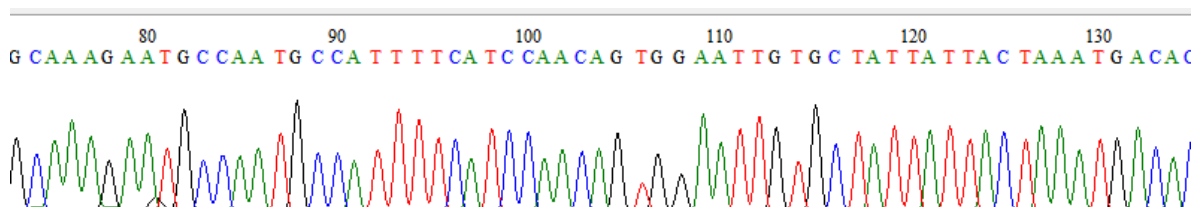
วินิจฉัยเชื้อ Human Polyomaviruses โดยใช้เทคนิค semi-nested PCR ของยีน LTAg โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR 2 มีค่าเท่ากับ (KIPyV / WUPyV = 215 pb, HPyV9 = 230 bp และ MCPyV = 232 bp) จากการศึกษาค้นพบว่ามี 1 ตัวอย่าง (CU_Chonburi 3) ที่ให้ผลบวกกับเชื้อ Human Polyomaviruses



รูปที่ 8 ตัวอย่างผลการตรวจหาเชื้อ Human Polyomaviruses ด้วยวิธี semi-nested PCR

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ Direct Nucleotide Sequencing

จากการศึกษาตัวอย่าง ในผู้ป่วยจำนวน 614 ราย พบว่ามี 1 ตัวอย่าง (CU_Chonburi 3) ที่ให้ผลเป็นบวกกับเชื้อ Human Polyomaviruses จึงนำ DNA ที่ปรากฏ band ตามขนาดที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งไปตรวจกับบริษัท First base laboratories Sdn Bhd ซึ่งได้ผล sequencing ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจสอบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast ซึ่งจากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับเชื้อ Human Polyomaviruses นั้นมีการความคล้ายคลึงกับ WUPyV สายพันธุ์ HN111 โดยมีค่า Query cover ถึง 100 % และมีค่า Identity ถึง 100 % ดังแสดงในรูปที่ 10 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า CU_Chonburi 3 จัดเป็น WUPyV

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HN111. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571699.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HN007. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571698.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HB140. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571697.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HB087C. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571696.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HB039C. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571695.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HB037C. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571694.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate HB033. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	KC571693.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus large T antigen gene. partial cds	228	228	100%	1e-56	100%	KF201692.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus strain BJJF5276. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	HQ218321.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate MN2726. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	GU296405.1
<input type="checkbox"/> WU Polyomavirus isolate MN2607. complete genome	228	228	100%	1e-56	100%	GU296404.1

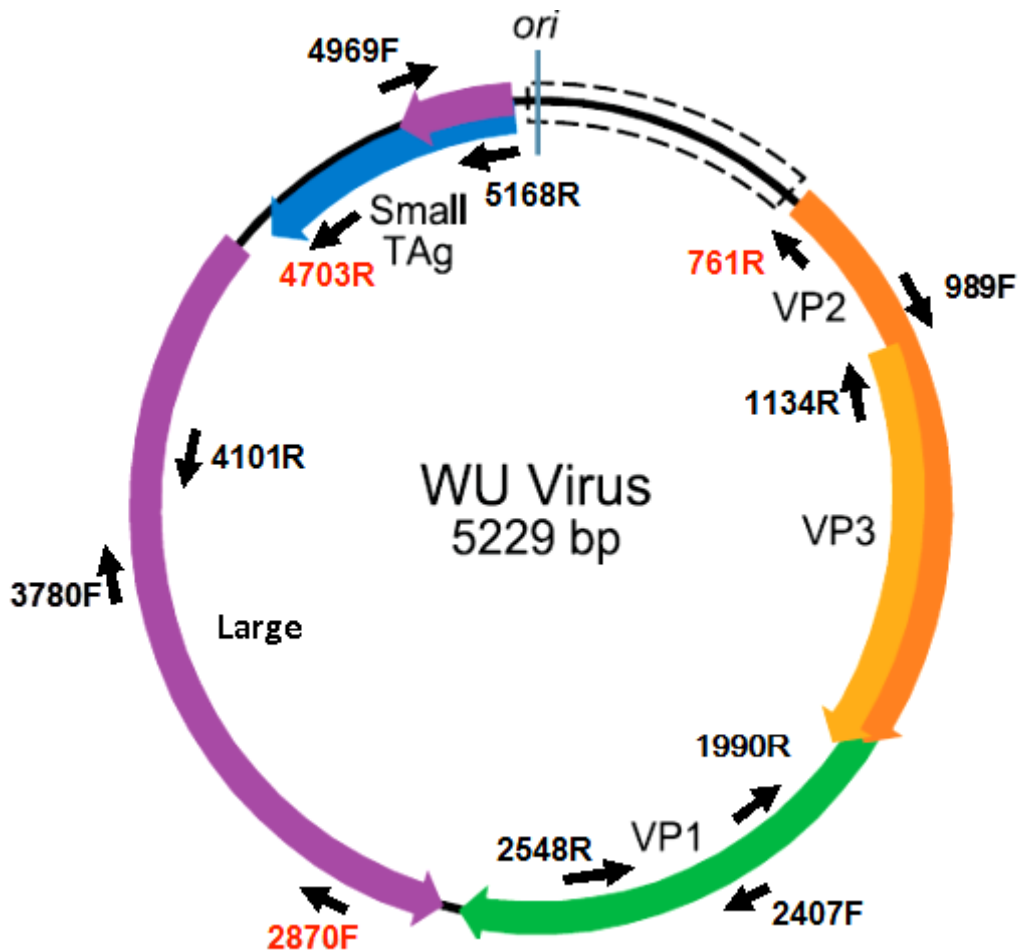
รูปที่ 10 ผลการ BLAST ของตัวอย่างที่ตรวจพบ Human Polyomaviruses

Whole genome assembly

จากการตรวจสอบพบว่าผู้ป่วยที่ให้ผลเป็นบวกกับ WUPyV นั้นนำมาศึกษา Whole genome โดยใช้ไพรเมอร์ต่างๆ (2) ดังแสดงในรูปที่ 11 โดยการทำให้ PCR และตรวจสอบผลลำดับนิวคลีโอไทด์

การทำ Multiple Sequence Alignment

จากการศึกษา Whole genome ของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 นั้นได้ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลของ WUPyV ที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ที่พบในประเทศต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นไทย จีน อเมริกา เยอรมัน ออสเตรเลีย ในช่วงปี 2007-2011



รูปที่ 11 แสดงไฟรเมอร์ whole genome ของ WUPyV

การวิเคราะห์ Multiple Sequence Alignment จะใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1) ซึ่งผลในส่วนของ Whole genome ของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 นี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่า identity matrix ของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 กับ WUPyV ที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ที่พบในประเทศต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นไทย จีน อเมริกา เยอรมัน ออสเตรเลีย ในช่วงปี 2007-2011 พบว่ามีค่า identity matrix อยู่ที่ประมาณ 97.5 – 99.0 % ซึ่งจากค่าที่ได้นั้นอาจสรุปได้ว่า ตัวอย่าง CU_Chonburi 3 นั้นมีความเหมือนกับ WUPyV reference sequence (NC 009539) , WUPyV_CU-295 (Thailand,2008) , WUPyV_CLFF (China,2008) และ WUPyV_MN2726 (Australia,2010) สูงถึง 99% ดังแสดงในตารางที่ 12

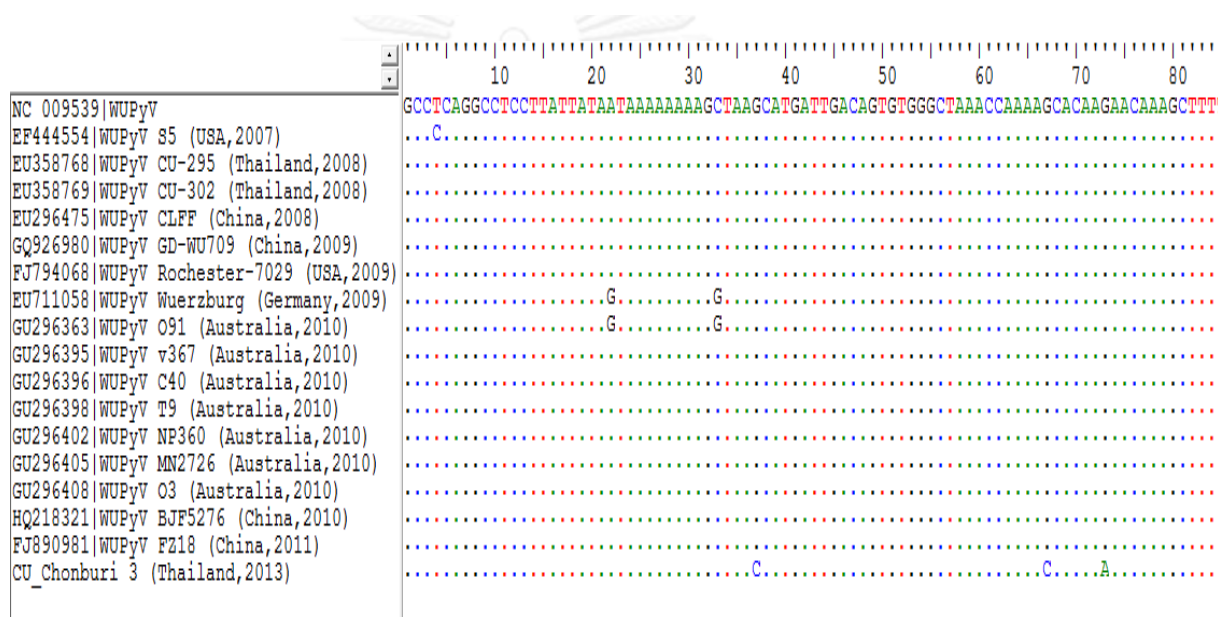
อีกทั้งยังได้นำตัวอย่าง CU_Chonburi 3 ไปเปรียบเทียบกับ WUPyV reference sequence (NC_009539), WUPyV_CU-295 (Thailand,2008) และ WUPyV_MN2726 (Australia,2010) โดยใช้โปรแกรม Simplot เพื่อ 1 % ที่แตกต่างในแต่ละ isolate ว่ามีบริเวณใดบ้างที่แตกต่างกัน โดยจากกราฟเป็นการแสดงผลระหว่าง similarity score กับ position ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าในส่วน of whole genome นั้นจะประกอบไปด้วยบริเวณ non-coding regions, บริเวณยีน VP1, VP2, LTA_g และ STA_g ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้มีความแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 14

นอกจากนี้ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CU_Chonburi 3 เทียบกับ WUPyV reference sequence (NC_009539) บริเวณ non-coding regions โดยบริเวณนี้จะประกอบด้วย 4 ช่วงด้วยกันคือตำแหน่งที่ 1-573, 2780-2811, 4507-4572 และ 5158-5229 ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 37, 63, 73, 95, 130, 152, 173, 177, 180, 181, 206, 275, 293, 294, 350, 451, 499, 4522, 4558 และ 5211

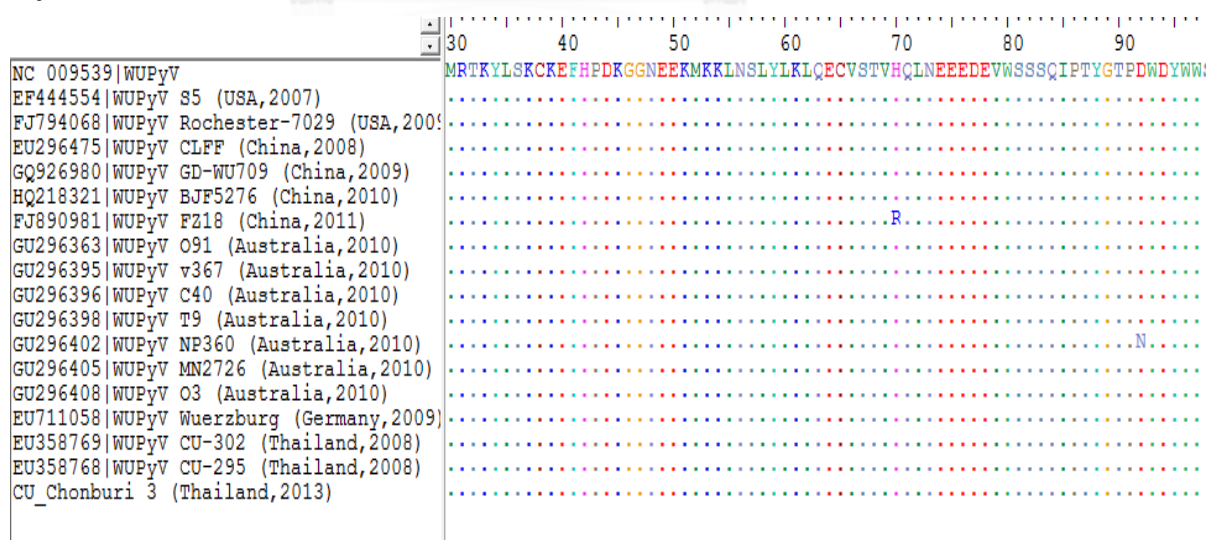
ในส่วน of Whole genome ของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 เทียบกับประเทศไทย (CU_295 และ CU_302) เมื่อปี 2008 ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ non-coding regions ที่ตำแหน่ง 37, 63, 73, 95, 130, 152, 173, 177, 180, 181, 206, 275, 286, 293, 294, 350, 451, 499, 4522, 4558, 4559 และ 5211 โดยสรุปการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding regions ไว้ในตารางที่ 13

นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนภายในโปรตีนของไวรัส (VP1, VP2, LTA_g และ STA_g) ในตัวอย่าง CU_Chonburi 3 เทียบกับ WUPyV reference sequence (NC_009539) โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ใน Bioedit พบว่าในส่วน of VP1 พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนคือ S347T (ตารางที่ 14) ในขณะเดียวกันพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในโปรตีน VP2 ดังนี้ L40V, G120R, Y121I, P123R, L137F, Q287R และ A327V (ตารางที่ 15) ในโปรตีน LTA_g พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนดังนี้ Q357P, V369E, E377K, D378V, A381T, R382E, R383G และ D389G (ตารางที่ 16) ในโปรตีน STA_g พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังนี้ R139S, K141E, R148K และ W153C (ตารางที่ 17)

การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนภายในโปรตีนของไวรัส (VP1 , VP2, LTA_g และ STA_g) ใน ตัวอย่าง CU_Chonburi 3 เทียบกับประเทศไทย (CU_295 และ CU_302) พบว่า VP1 พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใน CU_295 ประเทศไทย ปี 2008 คือ G79T (ตารางที่ 14) ใน ขณะเดียวกันพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในโปรตีน VP2 เหมือนกับใน WUPyV reference sequence (NC 009539) แต่ที่เพิ่มเติมขึ้นมาอีก 1 ตำแหน่งเมื่อเทียบกับ CU_302 คือ Q239E (ตารางที่ 15) สำหรับโปรตีน LTA_g (ตารางที่ 16) และ STA_g (ตารางที่ 17) นั้นพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเหมือนกับการเปรียบเทียบใน WUPyV reference sequence (NC 009539)



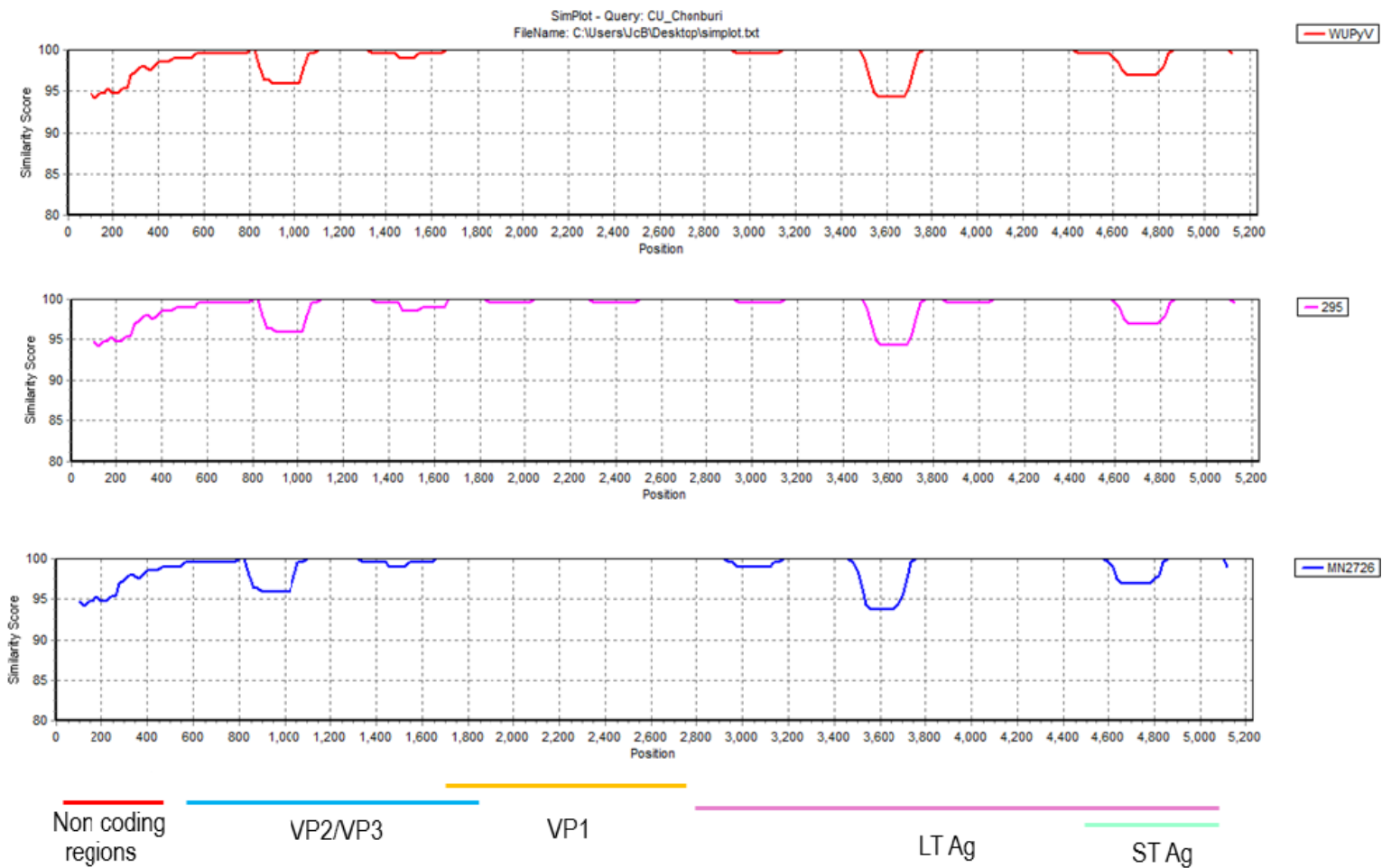
รูปที่ 12 แสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 กับ 17 isolate ของ WUPyV



รูปที่ 13 แสดงผลลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่าง CU_Chonburi 3 กับ 17 isolate ของ WUPyV

ตารางที่ 12 แสดงค่า identity matrix ของ WUPyV

Sequence	NC_009559 WUPyV	EF444554 WUPyV_S5 (USA,2007)	EU358768 WUPyV_CU-295 (Thailand,2008)	EU358769 WUPyV_CU-302 (Thailand,2008)	EU296475 WUPyV_CLFF (China,2008)	GQ926980 WUPyV_GD-WU709 (China,2009)	FJ794068 WUPyV_Rochester-7029 (USA,2009)	EU711058 WUPyV_Wuerzburg (Germany,2009)	GU296363 WUPyV_O91 (Australia,2010)	GU296395 WUPyV_v367 (Australia,2010)	GU296396 WUPyV_C40 (Australia,2010)	GU296398 WUPyV_T9 (Australia,2010)	GU296402 WUPyV_NP360 (Australia,2010)	GU296405 WUPyV_MN2726 (Australia,2010)	GU296408 WUPyV_O3 (Australia,2010)	HQ218321 WUPyV_BJF5276 (China,2010)	FJ890981 WUPyV_FZ18 (China,2011)	CU_Chonburi 3 (Thailand,2013)
NC_009559 WUPyV	ID	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	0.983	0.988	0.988	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.993	0.998	0.996	0.99
EF444554 WUPyV_S5 (USA,2007)	99.7	ID	99.7	99.6	99.6	99.6	0.984	0.987	0.987	0.997	0.998	0.998	0.998	0.997	0.992	0.997	0.995	0.989
EU358768 WUPyV_CU-295 (Thailand,2008)	99.9	99.7	ID	99.7	99.8	99.6	98.3	98.8	98.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	99.3	99.7	99.5	99
EU358769 WUPyV_CU-302 (Thailand,2008)	99.7	99.6	99.7	ID	99.7	99.5	98.2	98.8	98.8	99.6	99.6	99.6	99.7	99.7	99.3	99.6	99.5	98.9
EU296475 WUPyV_CLFF (China,2008)	99.9	99.6	99.8	99.7	ID	99.6	98.3	98.8	98.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	99.3	99.7	99.5	99
GQ926980 WUPyV_GD-WU709 (China,2009)	99.7	99.6	99.6	99.5	99.6	ID	98.2	98.6	98.7	99.6	99.7	99.6	99.7	99.7	99.1	99.6	99.5	98.8
FJ794068 WUPyV_Rochester-7029 (USA,2009)	98.3	98.4	98.3	98.2	98.3	98.4	ID	97.3	97.4	98.3	98.5	98.5	98.5	98.3	97.8	98.3	98.1	97.5
EU711058 WUPyV_Wuerzburg (Germany,2009)	98.8	98.7	98.8	98.8	98.8	98.6	97.3	ID	99.6	98.7	98.7	98.7	98.7	98.8	99	98.8	98.7	98
GU296363 WUPyV_O91 (Australia,2010)	98.8	98.7	98.8	98.8	98.8	98.7	97.4	99.6	ID	98.7	98.8	98.8	98.8	98.8	98.9	98.8	98.6	98.1
GU296395 WUPyV_v367 (Australia,2010)	99.8	99.7	99.7	99.6	99.7	99.6	98.3	98.7	98.7	ID	99.8	99.8	99.8	99.8	99.2	99.8	99.6	98.9
GU296396 WUPyV_C40 (Australia,2010)	99.8	99.8	99.7	99.6	99.7	99.7	98.5	98.7	98.8	99.8	ID	99.9	99.9	99.7	99.2	99.7	99.5	98.9
GU296398 WUPyV_T9 (Australia,2010)	99.8	99.8	99.7	99.6	99.7	99.6	98.5	98.7	98.8	99.8	99.9	ID	99.9	99.7	99.2	99.7	99.5	98.9
GU296402 WUPyV_NP360 (Australia,2010)	99.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	98.5	98.7	98.8	99.8	99.9	99.9	ID	99.8	99.3	99.7	99.5	98.9
GU296405 WUPyV_MN2726 (Australia,2010)	99.8	99.7	99.8	99.7	99.8	99.7	98.3	98.8	98.8	99.8	99.7	99.7	99.8	ID	99.3	99.8	99.6	99
GU296408 WUPyV_O3 (Australia,2010)	99.3	99.2	99.3	99.3	99.3	99.1	97.8	99	98.9	99.2	99.2	99.2	99.3	99.3	ID	99.3	99.1	98.5
HQ218321 WUPyV_BJF5276 (China,2010)	99.8	99.7	99.7	99.6	99.7	99.6	98.3	98.8	98.8	99.8	99.7	99.7	99.7	99.8	99.3	ID	99.7	98.9
FJ890981 WUPyV_FZ18 (China,2011)	99.6	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	98.2	98.7	98.6	99.6	99.5	99.5	99.5	99.6	99.1	99.7	ID	98.7
CU_Chonburi 3 (Thailand,2013)	99	98.9	99	98.9	99	98.8	97.5	98	98.1	98.9	98.9	98.9	98.9	99	98.5	98.9	98.7	ID



รูปที่ 14 แสดงภาพการเปรียบเทียบจากโปรแกรม Simplot

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non coding regions

Isolate name	country	year	Nucleotide variations in non-coding regions*																				Accession no.	
			4	22	33	37	67	73	95	107	130	152	173	177	179	180	181	191	198	206	213	219		244
WU Ref strain	Australia	2007	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	NC_009539
S5	USA	2007	c	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	EF444554
CU-295	Thailand	2008	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	EU358768
CU-302	Thailand	2008	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	EU358769
CLFF	China	2008	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	EU296475
GD-WU709	China	2009	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	c	g	GQ926980
Rochester-7029	USA	2009	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	FJ794068
WU/Wuerzburg	Germany	2009	t	g	g	g	g	g	g	t	c	g	c	c	a	g	g	c	t	a	g	t	g	EU711058
O91	Australia	2010	t	g	g	g	g	g	g	a	c	g	c	c	a	g	g	c	c	a	c	t	g	GU296363
v367	Australia	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	GU296395
C40	Australia	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	a	GU296396
T9	Australia	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	GU296398
NP360	Australia	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	GU296402
MN2726	Australia	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	a	g	c	c	a	c	t	g	GU296405
O3	Australia	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	GU296408
BJF5276	China	2010	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	c	c	a	c	t	g	HQ218321
FZ18	China	2011	t	a	c	g	g	g	g	t	c	g	c	c	c	g	g	t	c	a	c	t	g	FJ890981
CU_Chonburi 3	Thailand	2013	t	a	c	c	c	a	c	t	a	t	a	a	c	t	a	c	c	c	c	t	g	KJ725828

* * ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ยึดตาม position ของ NC_009539, หมายเหตุ : ส่วนที่คาดด้วยสีเทาแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non coding regions (ต่อ)

Isolate name	country	year	Nucleotide variations in non-coding regions *															Accession no.
			247	274	275	286	293	294	350	451	499	4522	4529	4558	4559	5209	5211	
WU Ref strain	Australia	2007	g	t	a	c	t	a	c	c	a	a	a	t	c	g	t	NC_009539
S5	USA	2007	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	g	EF444554
CU-295	Thailand	2008	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	t	EU358768
CU-302	Thailand	2008	g	t	a	g	t	a	c	c	g	a	a	a	c	g	t	EU358769
CLFF	China	2008	g	t	a	c	t	a	c	c	a	a	g	t	c	g	t	EU296475
GD-WU709	China	2009	g	t	a	c	t	a	c	c	g	g	a	t	t	a	g	GQ926980
Rochester-7029	USA	2009	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	g	FJ794068
WU/Wuerzburg	Germany	2009	g	a	a	g	t	a	c	c	g	a	a	t	g	a	t	EU711058
O91	Australia	2010	g	g	a	g	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	g	GU296363
v367	Australia	2010	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	g	a	t	GU296395
C40	Australia	2010	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	g	GU296396
T9	Australia	2010	a	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	g	GU296398
NP360	Australia	2010	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	g	GU296402
MN2726	Australia	2010	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	g	a	t	GU296405
O3	Australia	2010	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	c	a	t	GU296408
BJF5276	China	2010	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	g	a	t	HQ218321
FZ18	China	2011	g	t	a	c	t	a	c	c	g	a	a	t	g	a	t	FJ890981
CU_Chonburi 3	Thailand	2013	g	t	g	c	g	g	a	t	t	g	a	c	t	c	t	KJ725828

* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ยึดตาม position ของ NC_009539, หมายถึง : ส่วนที่คาดด้วยสีเทาแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณยีน VP1

Isolate name	country	year	Amino acid changes*																												Accession no.
			VP1																												
			7	24	40	49	50	51	79	82	101	131	136	138	165	175	179	195	227	273	276	307	341	347	357						
WU Ref strain	Australia	2007	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	NC_009539					
S5	USA	2007	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	EF444554					
CU-295	Thailand	2008	P	V	A	E	F	K	G	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	EU358768					
CU-302	Thailand	2008	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	EU358769					
CLFF	China	2008	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	EU296475					
GD-WU709	China	2009	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	V	N	G	A	V	S	T	GQ926980					
Rochester-7029	USA	2009	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	FJ794068					
WU/Wuerzburg	Germany	2009	A	L	S	E	F	Q	A	A	A	F	V	N	L	A	V	D	M	N	R	V	I	T	T	EU711058					
O91	Australia	2010	A	L	S	E	F	K	A	A	A	F	V	N	I	A	V	D	M	N	R	V	I	T	T	GU296363					
v367	Australia	2010	P	V	A	Q	F	K	T	T	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	GU296395					
C40	Australia	2010	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	GU296396					
T9	Australia	2010	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	GU296398					
NP360	Australia	2010	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	GU296402					
MN2726	Australia	2010	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	S	T	GU296405					
O3	Australia	2010	P	L	A	E	F	Q	A	A	A	V	I	N	L	T	V	E	M	N	R	V	I	T	T	GU296408					
BJF5276	China	2010	P	V	A	E	F	K	T	T	A	V	I	T	L	A	V	E	M	S	R	V	V	S	T	HQ218321					
FZ18	China	2011	P	V	A	E	S	K	T	T	V	V	I	T	L	A	I	E	M	N	R	V	V	T	S	FJ890981					
CU_Chonburi 3	Thailand	2013	P	V	A	E	F	K	T	A	A	V	I	T	L	A	V	E	M	N	R	V	V	T	T	KJ25828					

* * ตำแหน่งกรดอะมิโนยึดตาม position ของ NC_009539 , หมายเหตุ : ส่วนที่คาดด้วยสีเทาแสดงถึงกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณยีน VP2

Isolate name	country	year	Amino acid changes*																				Accession no.			
			VP2																							
			40	120	121	123	127	137	239	250	270	272	280	284	286	287	324	327	356	372	389	393		402	405	414
WU Ref strain	Australia	2007	L	G	Y	P	G	L	E	E	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	NC_009539
S5	USA	2007	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	H	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	EF444554
CU-295	Thailand	2008	L	G	Y	P	G	L	E	E	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	EU358768
CU-302	Thailand	2008	L	G	Y	P	G	L	Q	E	R	T	E	D	T	Q	M	A	I	A	S	S	R	G	R	EU358769
CLFF	China	2008	L	G	Y	P	G	L	E	E	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	EU296475
GD-WU709	China	2009	L	G	Y	P	G	L	E	E	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	GQ926980
Rochester-7029	USA	2009	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	FJ794068
WU/Wuerzburg	Germany	2009	L	G	Y	P	G	L	E	E	T	R	Q	D	T	E	M	A	I	G	T	S	R	V	R	EU711058
O91	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	GU296363
v367	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	T	GU296395
C40	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	GU296396
T9	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	GU296398
NP360	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	GU296402
MN2726	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	E	Q	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	GU296405
O3	Australia	2010	L	G	Y	P	G	L	Q	E	R	T	Q	D	S	Q	M	A	I	A	T	S	G	G	R	GU296408
BJF5276	China	2010	L	G	Y	P	G	L	E	E	R	T	E	D	T	Q	M	A	T	A	S	S	R	G	R	HQ218321
FZ18	China	2011	L	G	Y	P	G	L	E	E	R	T	E	D	T	Q	I	A	T	A	S	P	R	G	R	FJ890981
CU_Chonburi 3	Thailand	2013	V	R	I	R	S	F	E	E	R	T	E	D	T	R	M	V	T	A	S	S	R	G	R	KJ725828

* ตำแหน่งกรดอะมิโนยึดตาม position ของ NC_009539 , หมายเหตุ : ส่วนที่คาดด้วยสีเทาแสดงถึงกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป

ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณยีน Large T antigen (LTA_g)

Isolate name	country	year	Amino acid changes*																			Accession no.	
			LTA _g																				
			70	92	134	182	357	369	375	377	378	381	382	383	389	397	419	440	452	536	560		594
WU Ref strain	Australia	2007	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	I	NC_009539
S5	USA	2007	H	D	Q	K	Q	V	S	E	G	A	R	R	D	G	D	I	V	Q	K	L	EF444554
CU-295	Thailand	2008	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	I	EU358768
CU-302	Thailand	2008	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	I	EU358769
CLFF	China	2008	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	G	V	V	R	K	I	EU296475
GD-WU709	China	2009	H	D	Q	K	Q	V	P	E	D	A	R	R	D	G	G	V	V	Q	K	L	GQ926980
Rochester-7029	USA	2009	H	D	E	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	FJ794068
WU/Wuerzburg	Germany	2009	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	L	Q	K	I	EU711058
O91	Australia	2010	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	L	Q	K	I	GU296363
v367	Australia	2010	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	GU296395
C40	Australia	2010	H	D	E	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	GU296396
T9	Australia	2010	H	D	E	K	Q	V	S	E	D	A	T	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	GU296398
NP360	Australia	2010	H	N	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	GU296402
MN2726	Australia	2010	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	S	D	V	V	Q	R	I	GU296405
O3	Australia	2010	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	I	GU296408
BJF5276	China	2010	H	D	Q	K	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	HQ218321
FZ18	China	2011	R	D	Q	E	Q	V	S	E	D	A	R	R	D	G	D	V	V	Q	K	L	FJ890981
CU_Chonburi 3	Thailand	2013	H	D	Q	K	P	E	S	K	V	T	E	G	G	G	D	V	V	Q	K	I	KJ725828

* * ตำแหน่งกรดอะมิโนยึดตาม position ของ NC_009539 , หมายเหตุ : ส่วนที่คาดด้วยสีเทาแสดงถึงกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณยีน Small T antigen (STAg)

Isolate name	country	year	Amino acid changes*								Accession no.
			STAg								
			70	97	127	133	139	141	148	153	
WU Ref strain	Australia	2007	H	R	Y	Y	R	K	R	W	NC_009539
S5	USA	2007	H	R	Y	Y	R	K	R	W	EF444554
CU-295	Thailand	2008	H	R	Y	Y	R	K	R	W	EU358768
CU-302	Thailand	2008	H	R	Y	Y	R	K	R	W	EU358769
CLFF	China	2008	H	R	Y	Y	R	K	R	W	EU296475
GD-WU709	China	2009	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GQ926980
Rochester-7029	USA	2009	H	R	Y	Y	R	K	R	W	FJ794068
WU/Wuerzburg	Germany	2009	H	K	H	H	R	K	K	W	EU711058
O91	Australia	2010	H	K	Y	H	R	K	K	W	GU296363
v367	Australia	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GU296395
C40	Australia	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GU296396
T9	Australia	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GU296398
NP360	Australia	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GU296402
MN2726	Australia	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GU296405
O3	Australia	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	GU296408
BJF5276	China	2010	H	R	Y	Y	R	K	R	W	HQ218321
FZ18	China	2011	R	R	Y	Y	R	K	R	W	FJ890981
CU_Chonburi 3	Thailand	2013	H	R	Y	Y	S	E	K	C	KJ725828

* * ตำแหน่งกรดอะมิโนยึดตาม position ของ NC_009539

หมายเหตุ : ส่วนที่คาดด้วยสีเทาแสดงถึงกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป

การวิเคราะห์ผลทาง Phylogenetic tree

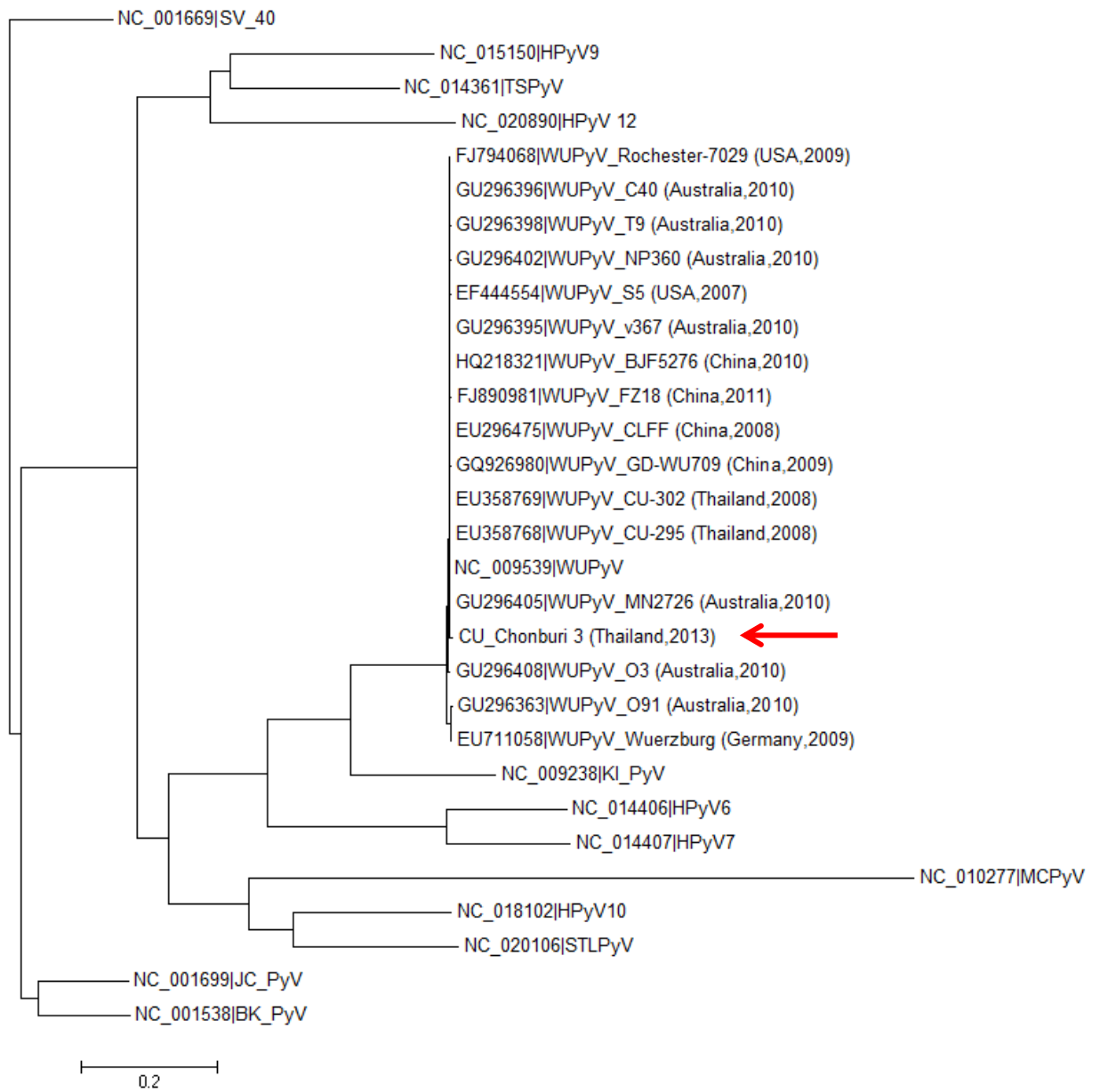
จากผลการศึกษาทาง Phylogenetic tree โดยโดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) (version 5.05) โดยใช้วิธี Neighbor-joining method และตั้งค่า Boost strapng เท่ากับ 1000 replicates นั้นพบว่า ตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 ในกรณี เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ whole genome นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับกลุ่มของ WUPyV_MN 2726 ในประเทศออสเตรเลีย ปี 2010 WUPyV reference sequence (NC 009539) , WUPyV_CU-295 ในประเทศไทย ปี2008 และ WUPyV_CLFF ในประเทศจีน ปี 2008 อีกด้วย ดัง แสดงในรูป 16

นอกจากนี้หากดูความสัมพันธ์ของยีนนั้น พบว่า กรณีที่เปรียบเทียบในยีน VP2/VP3 ตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 นั้นให้ผลแตกต่างจากยีนอื่นๆ เนื่องจากบริเวณยีนนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ กรดอะมิโนค่อนข้างมาก (รูปที่ 17) หากเปรียบเทียบในยีน VP1 นั้นพบว่า ตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ WUPyV reference sequence (NC 009539) มาก ที่สุด (รูปที่ 18) นอกจากนี้หากเปรียบเทียบในยีน LTA_g พบมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับกลุ่มของ WUPyV_MN 2726 ในประเทศออสเตรเลีย ปี 2010 WUPyV reference sequence (NC 009539) , WUPyV_CU-295 และ WUPyV_CU-302 ที่พบในประเทศไทย ปี2008 (รูปที่ 19) และหาก เปรียบเทียบในยีน STA_g พบว่ามีความแตกต่างจากยีนอื่นๆ เนื่องจากบริเวณยีนนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ กรดอะมิโนค่อนข้างมากเช่นเดียวกับยีน VP2/VP3 เมื่อเทียบกับในทุกๆ isolate ตั้งแต่ปี 2007-2011 (รูปที่ 20)

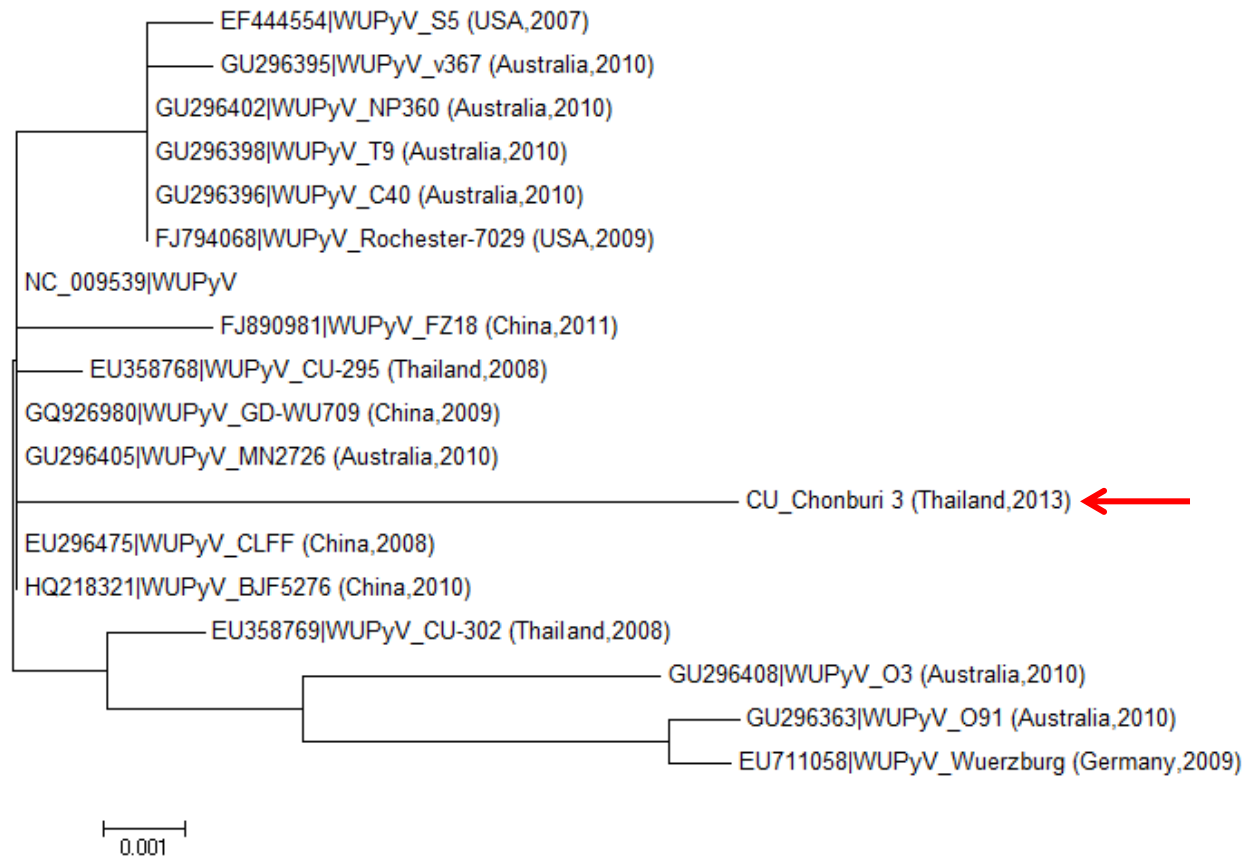
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
WU Polyomavirus strain B0, complete genome	9407	9407	100%	0.0	99%	EF444549.1
WU Polyomavirus isolate MN2726, complete genome	9396	9396	100%	0.0	99%	GU296405.1
WU Polyomavirus isolate B8805, complete genome	9396	9396	100%	0.0	99%	GU296387.1
WU Polyomavirus strain GD-WU1218, complete genome	9396	9396	100%	0.0	99%	GQ926978.1
WU Polyomavirus isolate HB140, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	KC571697.1
WU Polyomavirus isolate HB039C, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	KC571695.1
WU Polyomavirus isolate HB037C, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	KC571694.1
WU Polyomavirus isolate HB033, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	KC571693.1
WU Polyomavirus isolate MN2607, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	GU296404.1
WU Polyomavirus isolate MN2174, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	GU296403.1
WU Polyomavirus isolate CU-295, complete genome	9391	9391	100%	0.0	99%	EU358768.1
WU Polyomavirus isolate NP186, complete genome	9385	9385	100%	0.0	99%	GU296401.1
WU Polyomavirus isolate M241, complete genome	9385	9385	100%	0.0	99%	GU296393.1

รูปที่ 15 แสดงผลการ BLAST ของตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3

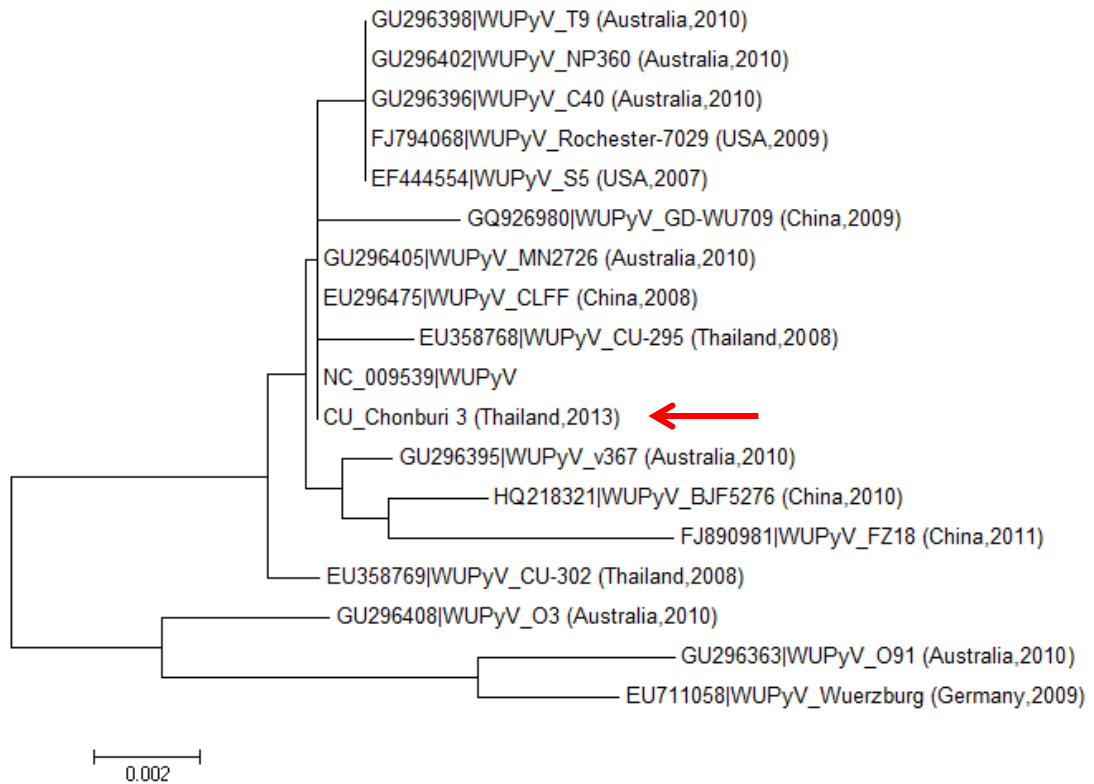




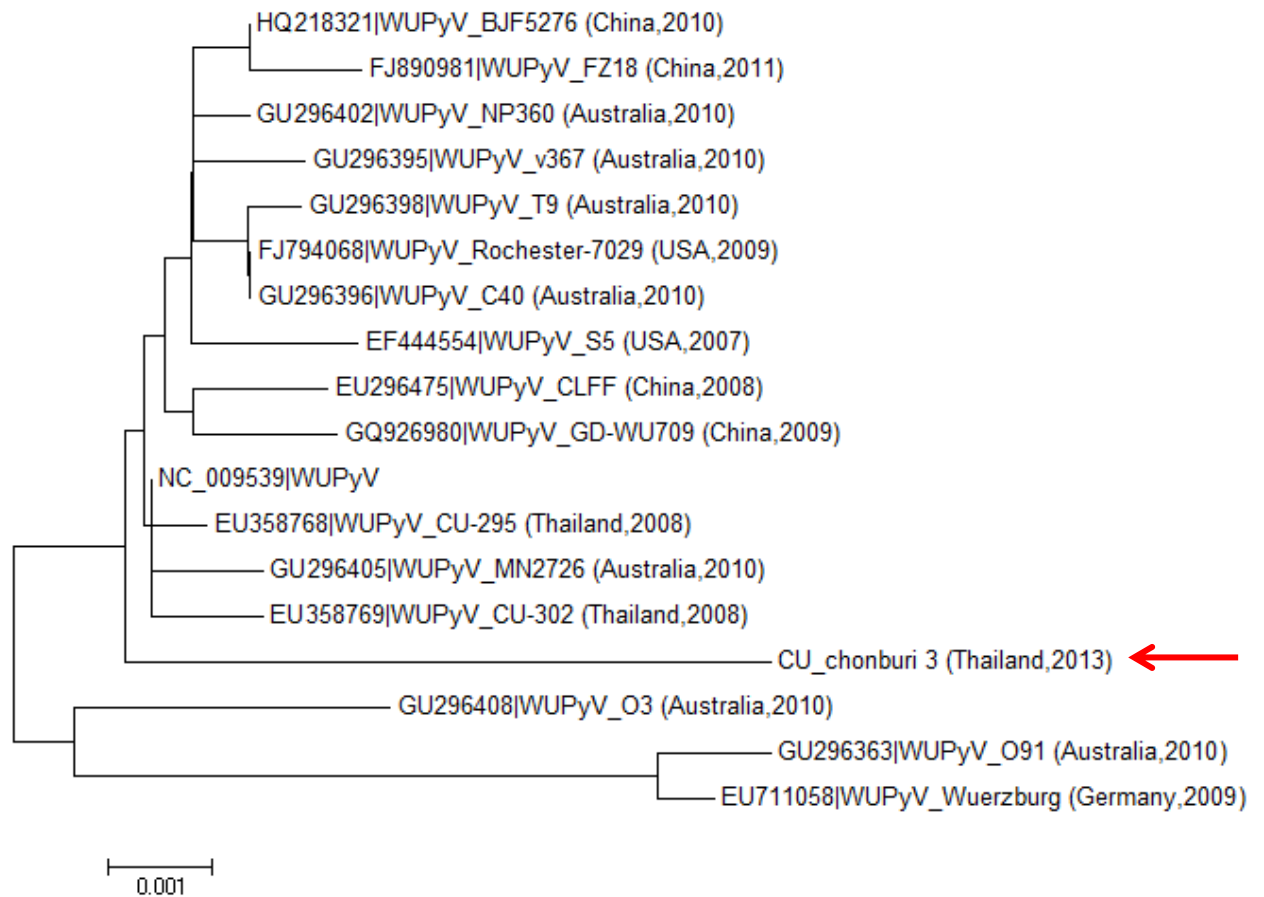
รูปที่ 16 แสดง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์จาก whole genome ของ HPyV



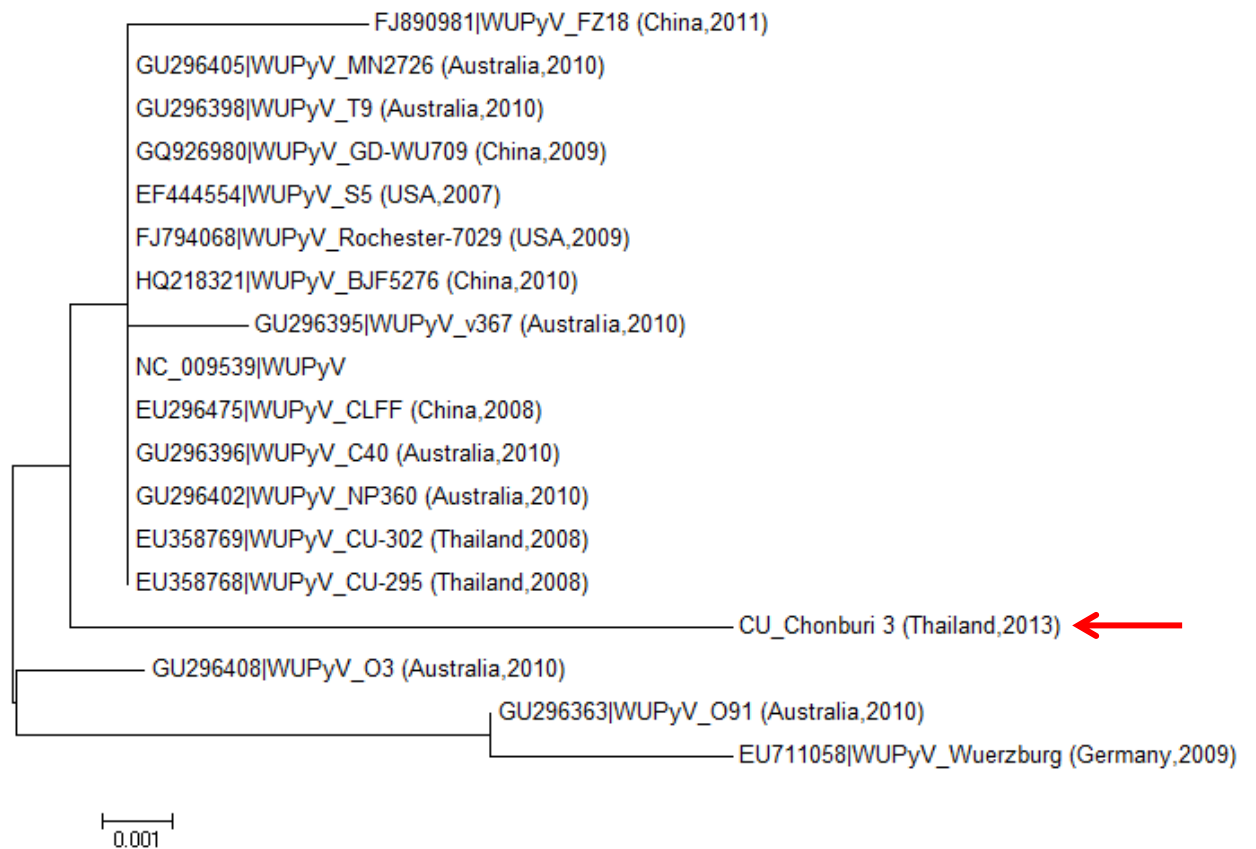
รูปที่ 17 แสดง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์จากยีน VP2/VP3 ของ WUPyV



รูปที่ 18 แสดง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์จากยีน VP1 ของ WUPyV



รูปที่ 19 แสดง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์จากยีน LTA_g ของ WUPyV



รูปที่ 20 แสดง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์จากยีน STAg ของ WUPyV

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาของเชื้อ Polyomavirus นั้นเริ่มต้นตั้งแต่ช่วงปี 1971 ในกลุ่มผู้ป่วย progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) ซึ่งพบภาวะนี้ได้กับผู้ป่วยที่มีปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (AIDS/HIV) โดยสายพันธุ์ที่พบก็คือ JCPyV ซึ่งจัดว่าเป็นสายพันธุ์ต้นๆของไวรัสชนิดดังกล่าว

ปัจจุบันนี้พบว่า Polyomavirus นั้นประกอบไปด้วย ที่พบในมนุษย์นั้นมี 12 สายพันธุ์ คือ BK polyomavirus (BKPyV), JC polyomavirus (JCPyV), KI (Karolinska Institute) polyomaviruses (KIPyV), WU (Washington University) polyomaviruses (WUPyV), Merkel cell polyomavirus (MCPyV), Human polyomavirus 6 (HPyV-6), Human polyomavirus 7 (HPyV-7), Trichodysplasia Spinulosa-associated virus (TSPyV), Human polyomavirus 9 (HPyV-9), Human polyomavirus 10 (HPyV-10), Saint Louis polyomavirus (STLPyV) และ Human polyomavirus 12 (HPyV-12)

โดยพบว่าปัจจุบัน Human Polyomaviruses ที่พบในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ KI (Karolinska Institute) และ polyomaviruses, WU (Washington University) polyomaviruses , Merkel cell polyomavirus (MCPyV) และ HPyV-9 โดยส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่มีอาการไข้หวัด

ในช่วงปี 2007 ได้พบการระบาดของเชื้อ WUPyV สามารถตรวจพบได้จากตัวอย่าง Respiratory Tract ทางระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยในประเทศออสเตรเลีย [18] โดยใช้เทคนิค PCR พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การระบาดของเชื้ออยู่ที่ 2.97% อีกทั้งในช่วงปีเดียวกันนั้นก็ได้มีการศึกษาการระบาดของเชื้อ KIPyV ในตัวอย่าง Respiratory Tract ทางระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยในประเทศสวีเดน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การระบาดของเชื้ออยู่ที่ 0.94% (7) และในปี 2009 ได้พบการระบาดของเชื้อ MCPyV ในประเทศสวีเดนโดยพบเปอร์เซ็นต์การระบาดอยู่ที่ 4.25% (27) และเมื่อปี 2012 ได้

พบการระบาดของเชื้อ HPyV9 ในประเทศฮังการีพบเปอร์เซ็นต์การระบาดอยู่ที่ 2.0% (29) ซึ่งการระบาดดังกล่าวนั้นได้มีการศึกษาไปในอีกหลายประเทศไม่ว่าจะเป็นเยอรมัน เกาหลี จีน เป็นต้น รวมถึงในประเทศไทยเมื่อปี 2008 ก็ได้ทำการศึกษาเชื้อ WUPyV และ KIPyV อีกด้วย

ผลการศึกษาระบาดวิทยาของ 4 สายพันธุ์ที่พบการติดเชื้อในผู้ป่วยในระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยนั้นในช่วงปี 2009-2013 ด้วยวิธี semi-nested PCR พบว่า จากตัวอย่างของผู้ป่วยทั้งหมดนั้น มีความชุกของเชื้อ WUPyV เพียง 0.16% ซึ่งน้อยกว่าในประเทศไทยปี 2008 ที่พบความชุกของเชื้อ WUPyV (6.29%) (2) ในขณะที่อีก 3 สายพันธุ์ซึ่งประกอบด้วย KIPyV , MCPyV และ HPyV 9 นั้นไม่พบการระบาดของเชื้อประเทศไทย โดยอัตราการระบาดของ WUPyV นี้พบว่ามีค่าลดลงเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ทั้งนี้หากเปรียบเทียบกับประเทศไทยที่เคยมีการศึกษามาก่อนนั้นพบค่าความชุกที่สูงกว่าที่พบในปัจจุบัน หากวิเคราะห์ทางด้านปัจจัยต่างๆนั้นไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เมื่อเทียบระหว่างปี 2008 กับปัจจุบัน นั้นพบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นก็มาจาก NP suction เช่นเดียวกัน รวมไปถึงเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบนั้นก็จะเป็นเทคนิค semi-nested PCR เช่นเดียวกันจึงอาจกล่าวได้ว่าทั้ง 2 ปัจจัยนี้ไม่อาจจะส่งผลทำให้การพบเชื้อดังกล่าวลดน้อยลง แต่หากเปรียบเทียบข้อแตกต่างทางวิธีการศึกษานั้นพบว่า ขั้นตอนการสกัดนั้นในปี 2008 วิธีที่ใช้คือ Phenol chloroform แต่การศึกษาปัจจุบันนั้นการสกัด DNA จะใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit ซึ่งอาจทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอลดลงแต่อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบยีน GAPDH ซึ่งให้ผลค่อนข้างดีรวมถึงการศึกษาทางด้าน sensitivity นั้นก็ให้ผลดีเช่นเดียวกันจึงทำให้ปัจจัยต่างๆที่กล่าวไปข้างต้นไม่น่าจะส่งผลต่อความชุกของเชื้อ WUPyV ที่ลดลงในปัจจุบัน

ทั้งนี้การพบการระบาดของเชื้อ WUPyV ที่ลดลงในประเทศไทยนั้นอาจเนื่องมาจากการที่ในปี 2008 เคยพบการระบาดแล้วอาจทำให้คนไทยนั้นมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นอีกทั้งตัวอย่างที่นำมาศึกษาเมื่อปี 2008 นั้นเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในปี 2003 ซึ่งพบว่าระยะเวลานั้นต่างกันประมาณ 10 ปี อีกทั้งพบว่า WUPyV_CU-295 และ WUPyV_CU-302 ที่พบในประเทศไทยในปี 2008 นั้นเมื่อเปรียบเทียบดูความเหมือนกับ CU_chonburi 3 ที่พบในปี 2013 นั้นมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนถึง 99% เมื่อเปรียบเทียบ amino acid variation ที่เกิดขึ้นบริเวณโปรตีน VP1 นั้นพบว่ามีการดัดแปลงไปเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นเนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ซึ่งพบ mutation ได้น้อย โดยโปรตีน VP1 นี้จัดเป็น target cell receptor อีกทั้งยังเป็น major coat protein ซึ่งกระตุ้นการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นจากการศึกษาพบว่าบริเวณนี้เกิด amino acid variation น้อยจึงทำให้ไวรัสไม่สามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันได้ จึงอาจกล่าวได้ว่า

เมื่อเคยพบการติดเชื้อเมื่อปี 2008 ทำให้ร่างกายของมนุษย์มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดนี้ ทำให้ antibody ในร่างกายคนเรานั้นสามารถไป block ไวรัสชนิดนี้ได้ซึ่งอาจจะเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้พบการระบาดของไวรัสนี้น้อยลงในช่วงปี 2009-2013 เมื่อเทียบกับปี 2008 ที่เคยมีการศึกษาในประเทศไทย อีกทั้งตัวอย่างผู้ป่วยนั้นได้มาจากเด็กที่ยังรับประทานนมแม่อยู่จึงทำให้พบการติดเชื้อลดลงเนื่องจากเด็กจะมีภูมิคุ้มกันที่ได้จากน้ำนมแม่ส่วนใหญ่เป็น IgA

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 ที่พบในปี 2013 ซึ่งได้จาก NP suction นั้นเป็นผู้ป่วยเด็กเพศชาย โดยผู้ป่วยนั้นมีอาการของโรค severe pneumonia กล่าวคือมีภาวะปอดอักเสบเชื้อที่เป็นสาเหตุมักจะอยู่ในน้ำลายและเสมหะของผู้ป่วยและสามารถแพร่กระจายออกมาเวลาไอ จาม ซึ่งเข้ารับการรักษาในช่วงเดือนมิถุนายน ปี 2013 อีกทั้งยังมีการตรวจพบเชื้อ Adenovirus เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการคล้ายหัดจนถึงท้องร่วง หรือปอดบวมร่วมด้วย

จากการศึกษานั้นพบว่าผู้ป่วยรายนี้ให้ผลเป็นบวกกับเชื้อ WUPyV และพบการเกิด mutation ที่ตำแหน่ง non-coding regions ที่ตำแหน่ง 37, 63, 73, 95, 130, 152, 173, 177, 180, 181, 206, 275, 286, 293, 294, 350, 451, 499, 4522, 4558, 4559 และ 5211 ซึ่งการเกิด mutation บริเวณ Non-coding region อาจส่งผลกับ origin of replication และการ transcription control elements

นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณยีน VP1 (S347T และ G79T) , VP2 (L40V, G120R, Y121I, P123R, L137F, Q287R และ A327V), LTA_g (Q357P, V369E, E377K, D378V, A381T, R382E, R383G และ D389G) และ STA_g (R139S, K141E, R148K และ W153C) โดยยีนต่างๆนี้จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง regulatory proteins ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอของไวรัส และการแสดงออกของยีน ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจึงสามารถส่งผลต่อหน้าที่การทำงานต่างๆของโปรตีน อาทิเช่น ring structure , กระบวนการเกิด glycosylation และ disulfide linkage เป็นต้น

นอกจากการศึกษาทางด้าน Phylogenetic tree นั้นพบว่าตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 ที่พบในปี 2013 นั้นมีความสัมพันธ์ตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 ในกรณีเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ whole genome นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับกลุ่มของ WUPyV_MN 2726 ใน

ประเทศออสเตรเลีย ปี 2010 WUPyV reference sequence (NC 009539) , WUPyV_CU-295 ในประเทศไทย ปี2008 และ WUPyV_CLFF ในประเทศจีน ปี 2008 อีกด้วย

นอกจากนี้หากดูความสัมพันธ์ของยีน VP1, VP2/VP3, LTAg และ STAg ในตัวอย่างผู้ป่วย CU_Chonburi 3 กับกลุ่มประเทศอเมริกา ออสเตรเลีย จีน เยอรมันและไทยที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ในช่วงปี 2007-2011 นั้นพบว่าความสัมพันธ์นั้นก็ไม่แตกต่างจากการเปรียบเทียบในกลุ่มของ Whole genome มากนัก หากจะมีความแตกต่างจาก Whole genome เล็กน้อยนั้นก็จะได้พบได้ใน ยีน VP2/VP3 และ STAg เนื่องจากทั้ง 2 ยีนนี้พบการเปลี่ยนของกรดอะมิโนที่ค่อนข้างแตกต่างจาก isolate อื่นๆที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล อาจตั้งข้อสันนิษฐานได้ว่าผู้ป่วยนั้นอาจได้รับเชื้อมาจากประเทศอื่น ๆ รวมถึงอาจเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวเนื่องจากเป็นที่สนใจว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยรายนี้กับผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวที่มีการศึกษาในประเทศไทยนั้นพบว่าในระยะเวลา 5 ปีนั้นพบการกลายพันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้นจึงเป็นที่น่าสนใจและควรเฝ้าระวังเชื้อดังกล่าวเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนป้องกันการระบาด อีกทั้งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านระบาดวิทยาและการจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโพลีโอมาไวรัสซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อไปในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. Kleines M, Hausler M, Kruttgen A, Scheithauer S. WU Polyomavirus (WUPyV): A Recently Detected Virus Causing Respiratory Disease? *Viruses*. 2009;1(3):678-88.
2. Payungporn S, Chieochansin T, Thongmee C, Samransamruajkit R, Theamboolers A, Poovorawan Y. Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand. *Virus research*. 2008;135(2):230-6.
3. Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Reviews in medical virology*. 2012;22(6):354-77.
4. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS pathogens*. 2007;3(5):e64.
5. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971;1(7712):1253-7.
6. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971;1(7712):1257-60.
7. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *Journal of virology*. 2007;81(8):4130-6.
8. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008;319(5866):1096-100.
9. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS pathogens*. 2009;5(3):e1000363.
10. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*. 2013;436(2):295-303.
11. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, et al. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS one*. 2013;8(3):e58021.
12. White MK, Gordon J, Khalili K. The rapidly expanding family of human polyomaviruses: recent developments in understanding their life cycle and role in human pathology. *PLoS pathogens*. 2013;9(3):e1003206.

13. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell host & microbe*. 2010;7(6):509-15.
14. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS pathogens*. 2010;6(7):e1001024.
15. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kuhn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *Journal of virology*. 2011;85(9):4586-90.
16. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *Journal of virology*. 2012;86(19):10321-6.
17. Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *Journal of virology*. 2012;86(19):10887.
18. Dalianis T, Ramqvist T, Andreasson K, Kean JM, Garcea RL. KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Seminars in cancer biology*. 2009;19(4):270-5.
19. Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Campitelli L, Aquaro S, Lo Coco A, Perno CF, et al. Identification of the novel KI Polyomavirus in paranasal and lung tissues. *Journal of medical virology*. 2009;81(3):558-61.
20. Abedi Kiasari B, Vallely PJ, Corless CE, Al-Hammadi M, Klapper PE. Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;43(1):123-5.
21. Ren L, Gonzalez R, Xu X, Li J, Zhang J, Vernet G, et al. WU polyomavirus in fecal specimens of children with acute gastroenteritis, China. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(1):134-5.
22. Foulongne V, Brieu N, Jeziorski E, Chatain A, Rodiere M, Segondy M. KI and WU polyomaviruses in children, France. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(3):523-5.
23. Han TH, Chung JY, Koo JW, Kim SW, Hwang ES. WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(11):1766-8.
24. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Wang D, Nissen MD, Sloots TP. A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian

children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(1):15-8.

25. Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(4):307-11.

26. Abed Y, Wang D, Boivin G. WU polyomavirus in children, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(12):1939-41.

27. Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Allander T. Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(3):489-91.

28. Bialasiewicz S, Whitley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(3):249-54.

29. Csoma E, Sapy T, Meszaros B, Gergely L. Novel human polyomaviruses in pregnancy: higher prevalence of BKPyV, but no WUPyV, KIPyV and HPyV9. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;55(3):262-5.

30. 2014. Available from: http://www.barascientific.com/article/DNA/dna_4.php.

31. Beadle GW, Tatum EL. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1941;27(11):499-506.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม Annealing Buffer

- 10 มิลลิโมลาร์ Tris
- 50 มิลลิโมลาร์ NaCl
- 1 มิลลิโมลาร์ EDTA

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 และเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารสำหรับ Cloning

2.1 LB Agar

- Agar 3.75 กรัม
- Yeast Extract 1.25 กรัม
- Tryptone 2.5 กรัม
- NaCl 1.25 กรัม
- น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 LB Broth

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

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 SOC Medium

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

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีและใส่

2 โมลาร์ของ Mg^{2+} , 2 โมลาร์ Glucose และ 1 โมลาร์ KCl

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) : นางสาวปราวลัย จันท์แจ่ม

เกิด : 28 สิงหาคม 2531 อายุ 25 ปี

สถานที่เกิด : โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ : 46 ซอยประชาชื่น 39 ถนนประชาชื่น แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800

e-mail address : pc_redseed@hotmail.com

ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2550-2553 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขา พันธุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)

หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสนอผลงานในรูปแบบ proceeding

หัวข้อเรื่อง “Comparative Genome Characterization and Phylogenetic Analysis of WU Polyomavirus”

ชื่อผู้นิพนธ์ Prangwalai Chanchaem, Kritsada Khongnomnan, Yong Poovorawan, Sunchai Payungporn

นำเสนองานวิจัย ณ งานประชุม The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014 “Bridging ASEAN Biochemical Research Communities” วันที่ 2-3 เมษายน 2557 ณ โรงแรม Rama Gardens Hotel & Resort กรุงเทพมหานคร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY