

การจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนเรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัสกลุ่ม A และ B ใน
ประเทศไทย

นายวิษวัช อักษรกิตติ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS
GROUP A AND B IN THAILAND

Mr. Vichtavat Auksornkitti

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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมน เรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัสกลุ่ม A และ B ในประเทศไทย
โดย	นายวิษวช อักษรกิตติ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภัตต์ สำราญสำรวงกิจ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภัตต์ สำราญสำรวงกิจ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร ชินชัย)

วิชรัช อักษรกิตต์: การจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนเรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัสกลุ่ม A และ B ในประเทศไทย. (Molecular Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus group A and B in Thailand) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.นพ.ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.นพ.รุจิภัตต์ สาราณีสารวจกิจ, 89 หน้า.

ในการศึกษานี้ได้รายงานถึงระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนเรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัส (RSV) ที่พบในประเทศไทยตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ปี 2009 ถึงเดือนธันวาคม 2011 จากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 1,481 ตัวอย่างซึ่งทำการเก็บจากโรงพยาบาลในกรุงเทพและขอนแก่น พบว่ามีจำนวนตัวอย่าง 148 ตัวอย่าง คิดเป็น 10% ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV เมื่อทำการตรวจโดยวิธี semi-nested PCR โดยได้ทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจำนวน 124 ตัวอย่าง และเมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่า 101 ตัวอย่างของ RSV-A สามารถจำแนกได้เป็น 2 จีโนไทป์คือ NA1 และ ON1 โดย ON1 นั้นเป็นจีโนไทป์ใหม่ที่เพิ่งถูกค้นพบเมื่อไม่นานนี้ ลักษณะเด่นของจีโนไทป์นี้คือมีการจำลองตัวเองของนิวคลีโอไทด์เพิ่มเข้าไปถึง 72 คู่เบสในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีน นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RSV-B จำนวน 23 ตัวอย่างมาทำการสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 จีโนไทป์ คือ BA4, BA9, BA10 และ THB โดย THB นั้นเป็นถือเป็นจีโนไทป์ใหม่ที่ถูกอธิบายถึงรายละเอียดในการศึกษานี้เป็นครั้งแรก จีโนไทป์ NA1 นั้นถูกพบตลอดช่วง 3 ปีที่ทำการศึกษา โดยในปี 2009 นั้นพบในจำนวนใกล้เคียงกับ BA9 ก่อนจะกลายเป็นจีโนไทป์ที่พบมากที่สุดในปี 2010 และ 2011 สำหรับ ON1 ในการศึกษานี้พบครั้งแรกในปี 2011 อย่างไรก็ตามลักษณะทางพันธุกรรมของ ON1 ที่พบในประเทศไทยนั้นไม่ได้มีความแตกต่างจากที่พบในประเทศอื่นมากนัก สำหรับ THB ในการศึกษานี้พบครั้งแรกในปี 2010 โดยมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับจีโนไทป์ GB2 โดยสรุปแล้วการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ RSV ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนหรือวัคซีนในอนาคตได้

สาขาวิชา...วิทยาศาสตร์การแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา...2555..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5374657230: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: RSV / Genotype / Attachment G glycoprotein / Phylogenetic tree / Amino acid / Nucleotide

VICHTAVAT AUKSORNKITTI: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS GROUP A AND B IN THAILAND. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D. CO-ADVISOR: ASSOC.PROF. RUJIPAT SAMRANSAMRUAJKIJ, M.D., 89 pp.

This study reports the molecular epidemiology and genetic characterization of human respiratory syncytial virus (RSV) samples collected in Thailand from July 2009 to December 2011. In total, 1,481 clinical samples were collected from Bangkok and Khon kean provinces and were screened by semi-nested PCR for RSV infection. We found 148 samples (10%) to be RSV positive and sequenced 124 of these samples. Phylogenetic analysis revealed that 101 of the RSV-A positive samples clustered into either genotype NA1 or the recently discovered genotype ON1 strain, which has a 72-nucleotide duplication in the second variable region of its G protein. Moreover, 23 of RSV-B positive samples clustered into four genotypes; BA4, BA9, BA10 and the novel genotype THB, first described here. The NA1 genotype was found during all three years of the study: In 2009, it was as common as BA9, while it was found to be the predominant strain in 2010 and 2011. The ON1 strain detected in this study first emerged in 2011 and is genetically similar to ON1 strains characterized in other countries. We also describe the novel genotype THB which first emerged in 2010 and is genetically similar to the GB2 genotype. In conclusion, this study indicates the importance of molecular epidemiology and characterization of RSV in Thailand in order to better understand this virus. Further studies should be conducted to bolster the development of anti-viral agents and a vaccine.

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

Academic Year : 2012..... Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท และที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในการทำงานวิจัย ในการช่วยตรวจสอบและแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.นพ.รุจิภัตต์ สาราณีสารวจกิจ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และแพทย์หญิงฐิติญา ไตรโสรัส ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำตลอดจนถึงช่วยจัดหาตัวอย่างที่มีคุณภาพจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลต่างๆ สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ สำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณนางสาวอภิรดี เทียมบุญเลิศ ผศ.ดร. สัญชัย พยุงภร ดร.กมล สุวรรณการ นางสาวณิชาภัทร คำประเสริฐ นางสาวศิวานัส ทองคำเปลว นางสาวปรีชาพร วิชัยวัฒนา และนายสุเมธ ก่อทอง รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณแพทย์หญิงสุรีย์ จิรไพฑูถย์สุข และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลสิรินธรในการจัดหาตัวอย่างที่มีคุณภาพ ตลอดจนถึงข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยดำเนินการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท รวมทั้งคอยให้ความรัก ความอบอุ่น และกำลังใจจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
สมมติฐาน.....	3
กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ประวัติความเป็นมา.....	6
ไวรัสวิทยาของเชื้อ RSV.....	7
วงจรชีวิตของเชื้อ RSV.....	9
Attachment G glycoprotein.....	11
จีโนไทป์ (genotype) ของเชื้อ RSV.....	12

	หน้า
พยาธิกำเนิดของเชื้อ RSV.....	13
อาการแสดงของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV.....	15
ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง.....	15
การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ทางห้องปฏิบัติการ.....	16
การรักษา.....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
รูปแบบการวิจัย.....	22
ประชากรศึกษา.....	22
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย.....	23
การเก็บตัวอย่าง.....	26
การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA extraction).....	27
การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วย random hexamer primer.....	28
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH.....	29
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ RSV.....	30
การตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อ RSV ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	31
การตรวจสอบผลการทำ PCR และการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์.....	33
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	34
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	34
การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	36
ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH.....	36
ผลการตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อ RSV.....	37
ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ G โปรตีน.....	38
ผลการทำ phylogenetic tree.....	40
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	45

หน้า

ผลของระบาศรีวิชาเซ็งโมเลกุล.....	47
ผลแสดงลักษณะของกรดอะมิโนและตำแหน่งของ N-glycosylation.....	49
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	57
รายการอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก.....	78
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ GAPDH.....	29
2	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ GAPDH.....	29
3	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ GAPDH.....	30
4	แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ RSV.....	31
5	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR รอบที่ 1 และ 2 สำหรับเชื้อ RSV.....	32
6	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR สำหรับเชื้อ RSV-A และ RSV-B	32
7	แสดงผลการพบเชื้อ RSV ในช่วงอายุต่างๆ ตั้งแต่ปี 2009-2011.....	42
8	แสดงค่า p-distance ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไทป์ THB.....	47
9	แสดงจำนวนจีโนมไทป์ของ RSV ตั้งแต่ปี 2009 ถึง ปี 2011.....	49

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงลักษณะ syncytia ของเซลล์.....	6
2 แสดงลักษณะและโครงสร้างของเชื้อ RSV.....	7
3 แสดงลักษณะการเรียงตัวและขนาดของยีนบนจีโนมของเชื้อ RSV.....	8
4 แสดงการออกจากเซลล์ของเชื้อ RSV โดยการ budding.....	10
5 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ RSV ในเซลล์ของเจ้าบ้าน.....	11
6 แสดงแผนภาพและส่วนประกอบต่างๆ ของ G โปรตีน.....	12
7 แสดงบริเวณของ nasopharynx.....	14
8 แสดงลักษณะของ airway obstruction.....	14
9 แสดงลักษณะของ nasal flaring.....	15
10 แสดงลักษณะของ flocked-nasopharyngeal swab.....	17
11 แสดงตัวอย่างการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ RSV ด้วยวิธี EIA.....	18
12 แสดงขั้นตอนต่างๆ ของ PCR.....	20
13 แสดงวิธีการเก็บน้ำล้างโพรงจมูก.....	26
14 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH ด้วยวิธี PCR.....	36
15 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ RSV-A ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	37
16 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ RSV-B ด้วยวิธี semi-nested PCR.....	37
17 แสดงตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ G โปรตีน.....	38
18 แสดงตัวอย่างผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV.....	39
19 แสดงตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV.....	39
20 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของเชื้อ RSV-A.....	43
21 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของเชื้อ RSV-B.....	44
22 แสดงตัวอย่างตารางแสดงค่า p-distance.....	45

ภาพที่	หน้า
23 แสดงระบาศวิตยาของเชื้อ RSV ในปี 2009-2011.....	47
24 แสดงระบาศวิตยาของเชื้อ RSV ในปี 2009-2011 โดยแบ่งตามกลุ่มของเชื้อ.....	48
25 แสดงผลการ alignment ลำดับกรดอะมิโนของ RSV-A.....	51
26 แสดงผลการ alignment ลำดับกรดอะมิโนของจีโนไทป์ ON1.....	52
27 แสดงผลการ alignment ลำดับกรดอะมิโนของ RSV-B.....	55
28 แสดงผลการ alignment ลำดับกรดอะมิโนของจีโนไทป์ THB เทียบกับจีโนไทป์อื่น....	56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Base pair
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DFA	Direct Immunofluorescent assay
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EIA	Enzyme immunosorbent assays
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IgE	Immunoglobulin E
mAb	Monoclonal antibody
ml	Mililiter
rpm	Round per minute
RSV	Respiratory syncytial virus
TBE	Tris Borate Buffer
T _m	Melting temperature
μm	micrometre
μl	microliter

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัส (Respiratory syncytial virus, RSV) เป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กทารก และเด็กเล็ก [1, 2] ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะเริ่มมีอาการในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น เช่น มีไข้ ไอ และเยื่อโพรงจมูกอักเสบ (rhinitis) เป็นต้น จากนั้นประมาณ 2-5 วันจะมีอาการที่ทางเดินหายใจส่วนล่างร่วมด้วย เช่น มีอาการหายใจเร็ว (tachypnea) หน้าอกยุบขณะหายใจ (chest retraction) หรือหายใจลำบากและมีเสียงดัง (wheezing) ตลอดจนถึงอาการปอดบวม (pneumonia) และหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) [1, 3-5] ซึ่งอาการปอดบวมและหลอดลมฝอยอักเสบนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในเด็กทั่วโลก แม้แต่ในประเทศที่เจริญก้าวหน้าอย่างสหรัฐอเมริกาพบว่าเด็กที่ป่วยด้วยอาการปอดบวม และหลอดลมฝอยอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อชนิดนี้ถึง 70,000-126,000 รายต่อปี [1] เนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ RSV นี้ยังไม่สมบูรณ์มากนักทำให้ผู้ป่วยสามารถติดเชื้อซ้ำได้ตลอดชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง [6, 7] และผู้สูงอายุ [8-10] ถึงแม้จะมีการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้กันอย่างกว้างขวางแต่ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีน หรือการรักษาที่มีประสิทธิภาพดีพอเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดนี้ได้ [11]

RSV แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Subgroup) คือ RSV-A และ RSV-B โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) กับ G โพรตีน (attachment G glycoprotein) [12, 13] นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมในการจำแนกได้อีกด้วย [14] จากข้อมูลของ G โพรตีนที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในหลายประเทศได้แสดงข้อมูลเกี่ยวกับวิวัฒนาการ และระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลซึ่งมีลักษณะพอสังเขปดังนี้คือ ในแต่ละปีจะมีการระบาดของเชื้อ RSV ทั้งสองกลุ่ม และในแต่ละกลุ่มพบหลายจีโนไทป์ (genotype) ระบาดร่วมกันแต่อาจพบจีโนไทป์ใดจีโนไทป์หนึ่งในจำนวนที่มากกว่า และในปีถัดมาก็อาจจะแทนที่ด้วยจีโนไทป์อื่นได้ [15, 16] นอกจากนี้ในกลุ่มจีโนไทป์เดียวกันลำดับนิวคลีโอไทด์ของ G โพรตีนมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณ hypervariable region ทั้ง 2 ของ G

โปรตีน วิวัฒนาการดังกล่าวที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากแรงกดดันจากภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถอยู่รอดต่อไปได้ [17, 18] ซึ่งคล้ายคลึงกับวิวัฒนาการของ Influenza virus type B [19, 20] สำหรับประเทศไทยจะพบการระบาดของเชื้อ RSV มากในหน้าฝน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม โดยจะพบมากในเดือนสิงหาคมหรือกันยายนของทุกปี [21, 22] ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี และพบในผู้สูงอายุเป็นส่วนน้อย [23] การศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาในประเทศไทยที่ผ่านมาโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับ G โปรตีนแสดงให้เห็นว่ากลุ่มของเชื้อที่พบมากสามารถถูกแทนที่ด้วยอีกกลุ่มหนึ่งได้ในปีถัดไป [22, 24] สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลพบว่ามีการศึกษาเดี่ยวเท่านั้น โดย Boonyasuppayakorn และคณะ ซึ่งทำการศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนธันวาคมปี 2007 [25] ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์ที่พบมากในประเทศไทยขณะนั้นคือ GA2 ของ RSV-A และ BA4 ของ RSV-B อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวทำการศึกษาในช่วงระยะเวลาสั้นๆ และจำนวนตัวอย่างที่ใช้ค่อนข้างน้อยทำให้ยังขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้ในประเทศไทยอีกมาก

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาถึงระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ RSV ที่พบในประเทศไทยตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2009 ถึงเดือนธันวาคม 2011 โดยวิธี semi-nested PCR และ nucleotide sequencing บริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีนโดยหวังว่าความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะช่วยให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ RSV ในประเทศไทยมากขึ้น และข้อมูลดังกล่าวอาจมีประโยชน์ต่อการนำไปผลิตวัคซีนสำหรับเชื้อชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

คำถามงานวิจัย

1. ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ RSV ในช่วงปี 2009-2011 ในประเทศไทยเป็นอย่างไร และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการศึกษาในประเทศอื่นๆ เป็นอย่างไร
2. จีโนไทป์ของเชื้อ RSV ที่พบในช่วงที่ทำการศึกษามีอะไรบ้าง และมีความเหมือนหรือแตกต่างจากที่พบในปี 2007 หรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์งานวิจัย

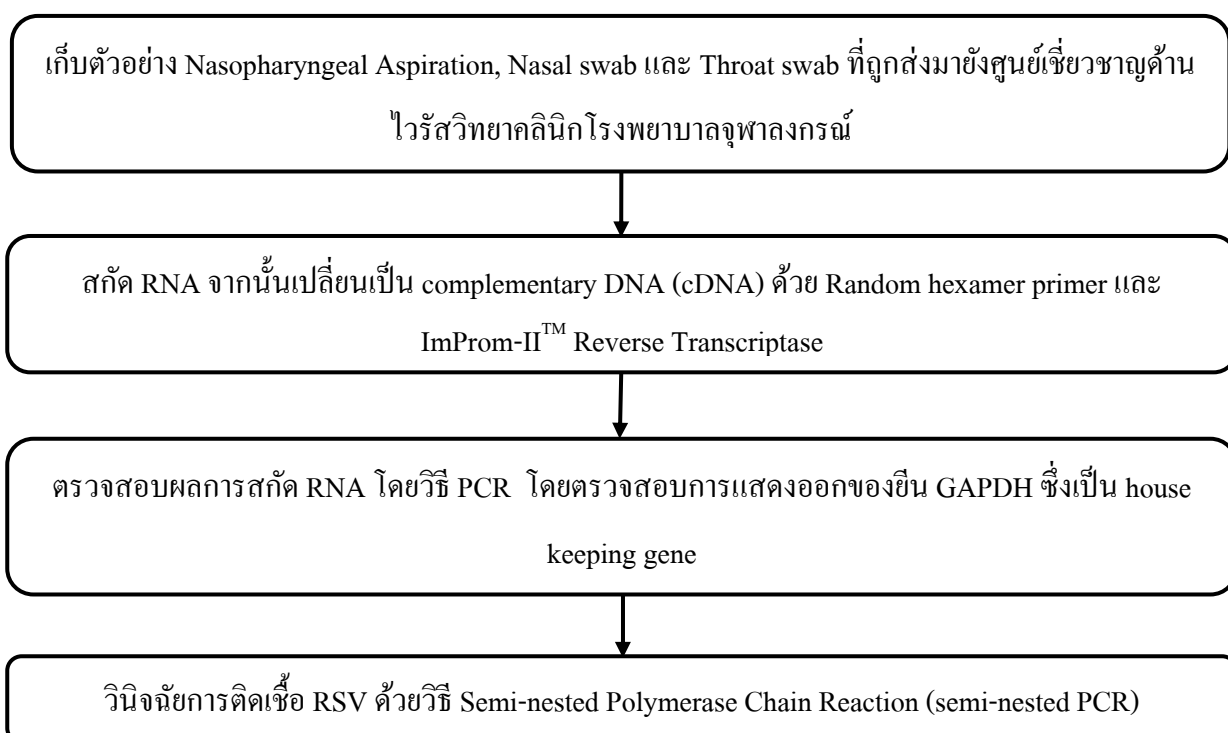
เพื่อศึกษาถึงระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจีโนมใหม่ของเชื้อ RSV ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย และวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้งใน และต่างประเทศ

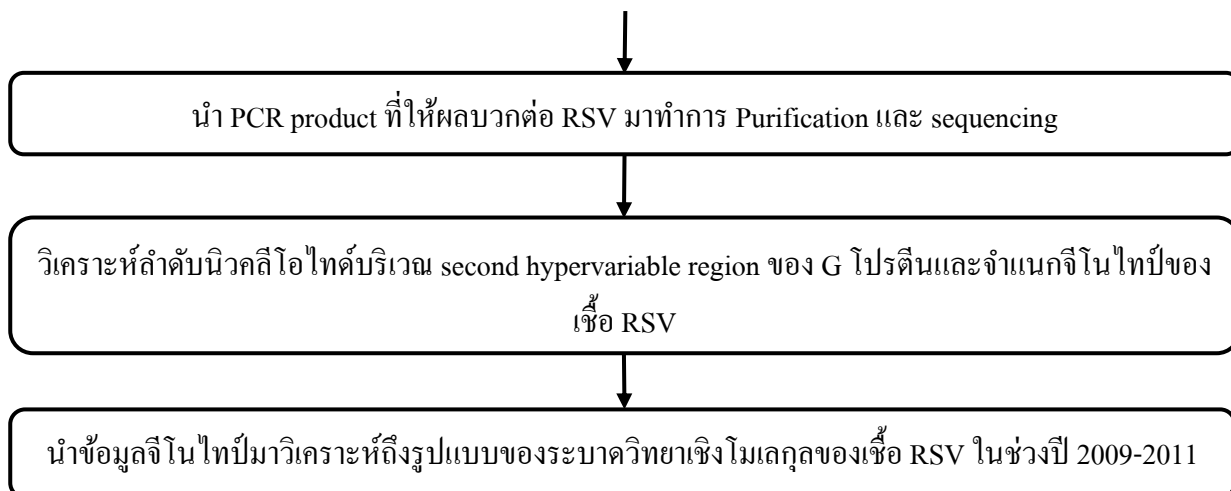
สมมติฐาน

1. เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีนแล้วพบว่าจีโนมใหม่ของเชื้อ RSV ที่พบในช่วงที่ทำการศึกษาดังกล่าวต่างจากที่พบในปี 2007
2. เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลในการศึกษานี้กับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ารูปแบบของระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลมีความแตกต่างกัน

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การจำแนกจีโนมใหม่และการวิเคราะห์ถึงรูปแบบของระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ RSV





คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. Subgroup คือ การแบ่งกลุ่มของ RSV โดยอาศัยการทำปฏิกริยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับ G โปรตีนซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ RSV กลุ่ม A (RSV-A) และ RSV กลุ่ม B (RSV-B)
2. Genotype คือ การแบ่งกลุ่มของ RSV ต่อจาก subgroup โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีน

ข้อจำกัดในการวิจัย

ในการเก็บตัวอย่างที่เป็น nasopharyngeal aspiration นั้นอาจก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วยมากกว่าการเก็บตัวอย่างโดยวิธี nasal swab หรือ throat swab ซึ่งผู้ปกครองของผู้ป่วยบางรายอาจไม่ยินยอมให้มีการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าว ดังนั้นจึงอาจส่งผลให้ตัวอย่างที่เป็น nasopharyngeal aspiration มีจำนวนน้อยกว่าตัวอย่างที่เป็น nasal swab หรือ throat swab ได้

คำสำคัญ

RSV, Genotype, Attachment G glycoprotein, Phylogenetic tree, Amino acid, Nucleotide

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

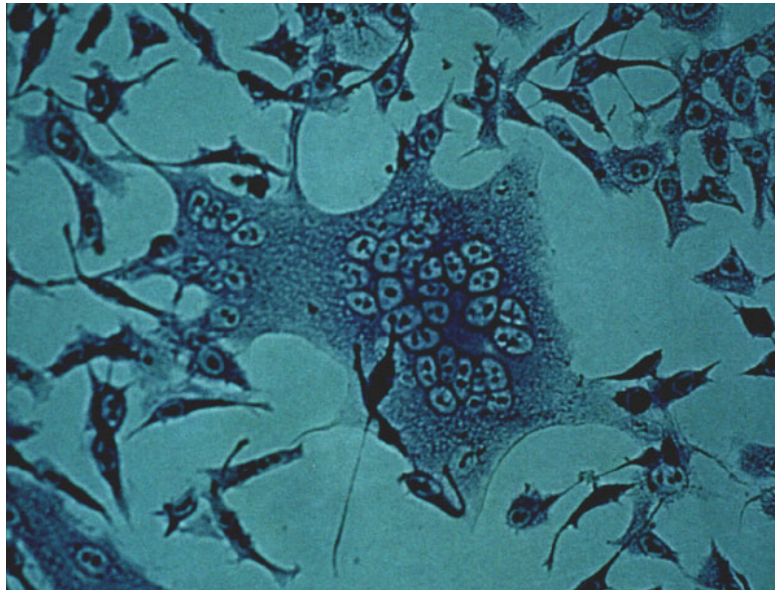
1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจีโนมไทป์ของเชื้อ RSV ที่พบในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นและสามารถนำข้อมูลนี้มาใช้ประโยชน์ในการป้องกัน ควบคุมโรค และการผลิตวัคซีนในอนาคตต่อไปได้
2. ฝึกกระบวนการคิด การวิเคราะห์ และสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการทดลอง
3. ได้เรียนรู้และฝึกฝนการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ตลอดจนวิธีการใหม่ในการวิจัยทางอนุชีววิทยา
4. ได้ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง ในวารสารที่เกี่ยวข้องกับไวรัส หรือระบาดวิทยาของโรค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติความเป็นมา

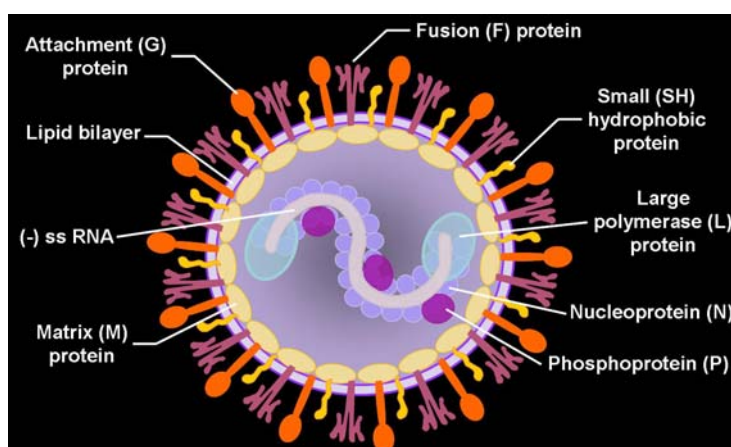
เชื้อ respiratory syncytial virus (RSV) ถูกพบครั้งแรกในปี 1955 โดยพบระบาดอยู่ในลิงชิมแปนซี ไวรัสนี้จึงได้ชื่อว่า chimpanzee coryza ต่อมาเมื่อมีการแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากเด็กที่ป่วยด้วยโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ จึงเชื่อว่าไวรัสนี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคในมนุษย์ [26-29] และเมื่อมีการนำเชื้อมาเพาะเลี้ยง แล้วทำการสังเกตลักษณะของเซลล์พบว่าเชื้อ RSV นี้ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่อยู่เคียงข้างกันเกิดการรวมกัน (fusion) ทำให้มองเห็นเป็น 1 เซลล์แต่มีหลายนิวเคลียส (ภาพที่ 1) เรียกลักษณะของเซลล์แบบนี้ว่า syncytia จากคุณสมบัติและความสามารถดังกล่าวของไวรัสทำให้ภายหลังได้ถูกเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น respiratory syncytial virus [30]



ภาพที่ 1: แสดงลักษณะ syncytia ของเซลล์ หรือลักษณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ข้างเคียงเกิดการรวมกัน [31]

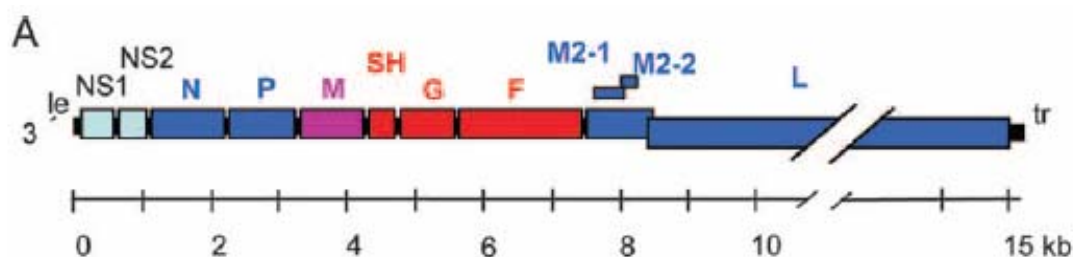
ไวรัสวิทยาของเชื้อ RSV

Human respiratory syncytial virus หรือ RSV เป็นไวรัสที่ถูกจัดอยู่ในลำดับ (order) *Mononegavirales*, วงศ์ (family) *Paramyxoviridae* สกุล (genus) *Pneumovirus* จัดเป็น envelope ไวรัสหรือเป็นไวรัสที่มีชั้นของไขมันหุ้มสารพันธุกรรมอีกชั้นหนึ่งโดยมีขนาดของอนุภาคประมาณ 200 นาโนเมตร [32, 33] ไวรัสนี้มีต้นกำเนิดมาจากสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในคนแล้วยังมีสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์บางชนิดได้อีกด้วย เช่น วัว (bovine RSV หรือ BRSV) หรือ หนู (pneumonia virus of mice หรือ PVM) ไวรัสอื่นๆ ในวงศ์เดียวกันนี้นอกจาก RSV แล้ว ได้แก่ human metapneumovirus (HMPV), Sendai virus, human parainfluenza virus (HPIVs) และ measles virus เป็นต้น [34, 35] (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2: แสดงลักษณะและโครงสร้างของเชื้อ RSV [36]

สารพันธุกรรมของไวรัสนี้เป็น RNA สายเดี่ยว มี polarity เป็นลบ และมีขนาด 15,222 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมียีนที่สามารถถอดรหัสเป็น mRNA ได้ถึง 10 ยีน เรียงตามลำดับดังนี้ NS1-NS2-N-P-M-SH-F-G-M2-L ซึ่งสามารถถอดรหัส (transcription) เป็น mRNA ได้ 10 ตัว โดย mRNA แต่ละตัวจะมีกระบวนการเติม cap และเกิด polyadenylated ของตัวเอง ยกเว้นยีน M2 สามารถถอดรหัสได้เป็น M2-1 และ M2-2 เนื่องจาก mRNA ดังกล่าวมีจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (open reading frame หรือ ORF) อยู่ 2 ตำแหน่งซ้อนทับกันอยู่ (overlap) (ภาพที่ 3) [33, 37, 38]



ภาพที่ 3: แสดงลักษณะการเรียงตัวและขนาดของยีนบนจีโนมของเชื้อ RSV [34]

สำหรับรายละเอียดและหน้าที่ของโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้นมีดังนี้คือ

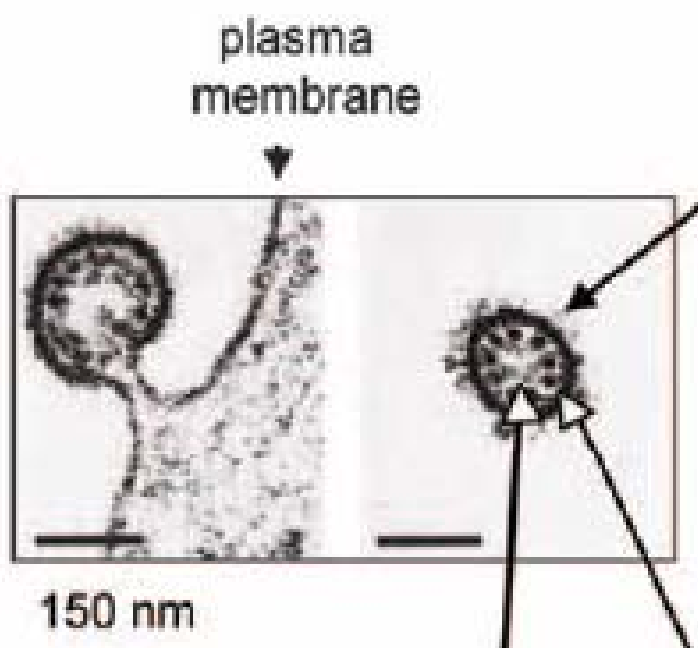
- NS1 เป็น Non-structural protein มีขนาดประมาณ 532 คู่เบส (bp) แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 139 ตัว ทำหน้าที่ในการยับยั้งไม่ให้มีการทำงานของ interferon-alpha และ Interferon-beta [33, 35]
- NS2 เป็น Non-structural protein อีกชนิดหนึ่ง มีขนาดประมาณ 503 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 124 ตัว ทำหน้าที่ในการยับยั้งไม่ให้มีการทำงานของ interferon-alpha และ Interferon-beta เช่นเดียวกับ NS1 [33, 35]
- N หรือ nucleocapsid N protein มีขนาดประมาณ 1203 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 391 ตัว โปรตีนตัวนี้จะจับกับจีโนมของไวรัสอย่างแน่นหนาเพื่อเป็นการป้องกันการเสื่อมสภาพของ RNA (degradation) และเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่จีโนมของไวรัส นอกจากนี้ยังช่วยลดการตรวจจับของ viral RNA โดย toll-like receptors cell (TLRs) ของ host และยังลดการตรวจจับของเอนไซม์ RNA recognition helicases เพื่อไม่ให้เกิดการกระตุ้นให้มีการตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) อีกด้วย [35, 39, 40]
- P หรือ P phosphoprotein มีขนาดประมาณ 914 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 241 ตัว ทำหน้าที่เป็น co-factor ในกระบวนการสังเคราะห์ RNA (transcription) [35, 41]
- M หรือ matrix M protein มีขนาดประมาณ 958 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 256 ตัว โปรตีนตัวนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันเป็นอนุภาคไวรัส (viral assembly) โดยเป็นเยื่ออยู่ภายในชั้น envelop อีกทอดหนึ่ง [33, 35, 42]
- SH หรือ small hydrophobic protein มีขนาดประมาณ 410 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 64 ตัว ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด [33, 35]

- G หรือ attachment G glycoprotein มีขนาดประมาณ 923 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 298 ตัว หน้าที่หลักของโปรตีนตัวนี้คือช่วยให้อนุภาคของไวรัสสามารถเกาะกับเซลล์ของเจ้าบ้านได้ [33, 35]
- F หรือ fusion F protein มีขนาดประมาณ 1903 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 574 ตัว หน้าที่หลักของโปรตีนตัวนี้คือช่วยให้สารพันธุกรรมของไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้โดยการรวม (fusion) ชั้นไขมัน (envelop) ของไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเจ้าบ้าน (plasma membrane) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการรวมกันของเซลล์ข้างเคียงเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า syncytia คือลักษณะที่ 1 เซลล์มีหลายนิวเคลียสอีกด้วย [33, 35]
- M2 มีขนาดประมาณ 961 bp สามารถถอดรหัสเป็น mRNA ได้ 2 แบบคือ M2-1 และ M2-2 ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะได้ 194 ตัวสำหรับ M2-1 และ 90 ตัวสำหรับ M2-2 โปรตีนตัวนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัส (transcription) เป็น mRNA และยังมีส่วนช่วยในการปรับสมดุลระหว่างกระบวนการ transcription และ RNA replication ของไวรัส [35, 43, 44]
- L หรือ large L protein มีขนาดประมาณ 6578 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 2165 ตัว ทำหน้าที่เป็น RNA polymerase ในกระบวนการสังเคราะห์ RNA สายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการ capping และ polyadenylation ของ mRNA [35, 45]

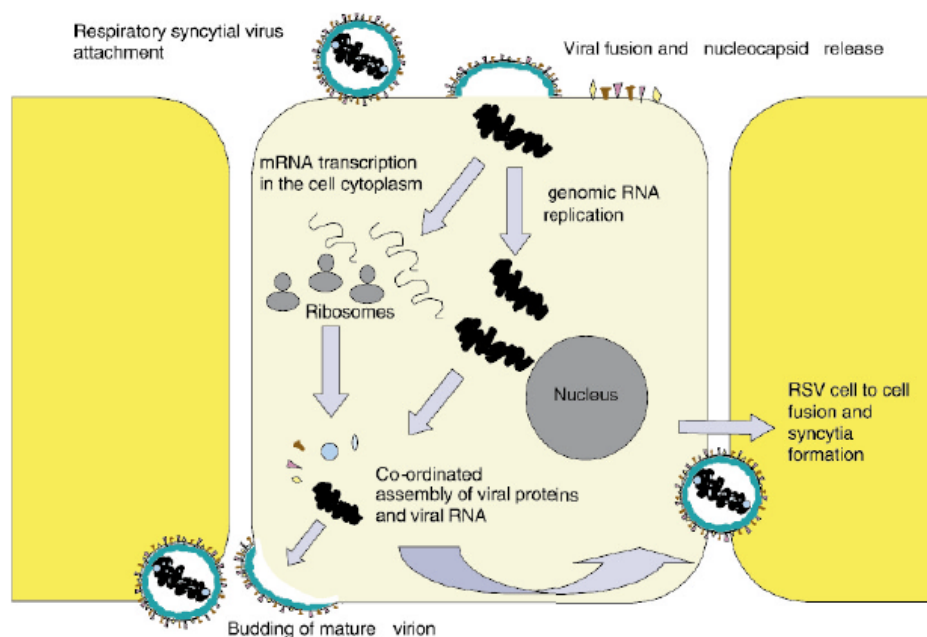
วงจรชีวิตของเชื้อ RSV

เซลล์ที่พบว่ามีกรดนิวคลีอิก RSV ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจตั้งแต่จมูกรวมถึงเซลล์เยื่อบุท่อลมต่างๆ สำหรับวงจรชีวิตของเชื้อ RSV นั้นในขั้นแรกอนุภาคของไวรัสจะเข้าเกาะกับเซลล์ของเจ้าบ้านผ่านทาง G โปรตีนจากนั้น envelope ของเชื้อไวรัสและเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์เจ้าบ้านจะเกิดการรวมกัน (fusion) ผ่าน F โปรตีนทำให้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์ของเจ้าบ้านได้ เมื่อสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ของเจ้าบ้านแล้วจะเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ไปเป็น mRNA เพื่อผลิตโปรตีนต่างๆ หลังจากเกิดกระบวนการ transcription ประมาณ 15 ชั่วโมง อัตราการเกิด transcription จะค่อยๆ คงที่ จากนั้นจะเกิดการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมโดยการจำลองตัวเอง (replication) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจาก

กระบวนการ transcription ไปเป็นกระบวนการ replication จะถูกควบคุมโดยโปรตีน M2-2 เมื่อสร้างโปรตีนต่างๆ เรียบร้อยแล้ว โปรตีนเหล่านี้จะรวมเข้ากับสารพันธุกรรมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเจ้าบ้าน จากนั้นจึงออกจากเซลล์ของเจ้าบ้าน โดยการ budding เป็นอนุภาคของไวรัสตัวใหม่ต่อไป โดยกระบวนการดังกล่าวอาจทำให้เซลล์ของเจ้าบ้านเกิดการฉีกขาด หรืออาจทำให้เกิดลักษณะของ syncytia ขึ้นมาได้ [33, 46] (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5)



ภาพที่ 4: แสดงการออกจากเซลล์ของเชื้อ RSV โดยการ budding ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

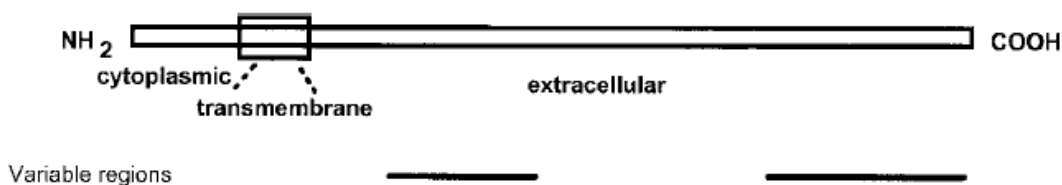


ภาพที่ 5: แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ RSV ในเซลล์ของเจ้าบ้าน [33]

Attachment G glycoprotein

Attachment G glycoprotein หรือ G โปรตีน เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 298 ตัว อย่างไรก็ตามจำนวนดังกล่าวอาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ [32] หน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้นอกจากจะมีส่วนช่วยให้ไวรัสสามารถเกาะกับเซลล์ของเจ้าบ้านดังได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อตัวไวรัสอีกด้วย [47] การศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมามีเกี่ยวกับ G โปรตีน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนตัวนี้จัดเป็นโปรตีนที่แทรกทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane protein) ชนิดหนึ่งซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ cytoplasmic domain, transmembrane domain และ extracellular domain (ภาพที่ 6) โดยในส่วน extracellular domain นั้นประกอบด้วยบริเวณ hypervariable region 2 บริเวณซึ่งถูกคั่นด้วยกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserved amino acid) จำนวน 13 ตัว [48, 49] โดยบริเวณ hypervariable นี้ยังมีการเติมหมู่ น้ำตาลที่ไนโตรเจนอะตอมของหมู่ฟังก์ชัน amine group ของกรดอะมิโน asparagines ซึ่งต้องมีลำดับเป็น Asn-X-Ser/Thr โดย X เป็นกรดอะมิโนตัวใดก็ได้ยกเว้น proline (N-glycosylation) การศึกษาที่ผ่านมามีพบว่ากระบวนการดังกล่าวจะช่วยในการปกปิด epitope บน G โปรตีนของไวรัสทำให้

แอนติบอดีไม่สามารถจับกับไวรัสได้ [50] สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมกุลที่ผ่านมา จะอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมจากบริเวณ second hypervariable region เป็นหลัก [15, 49]



ภาพที่ 6: แสดงแผนภาพและส่วนประกอบต่างๆ ของ G โปรตีน [51]

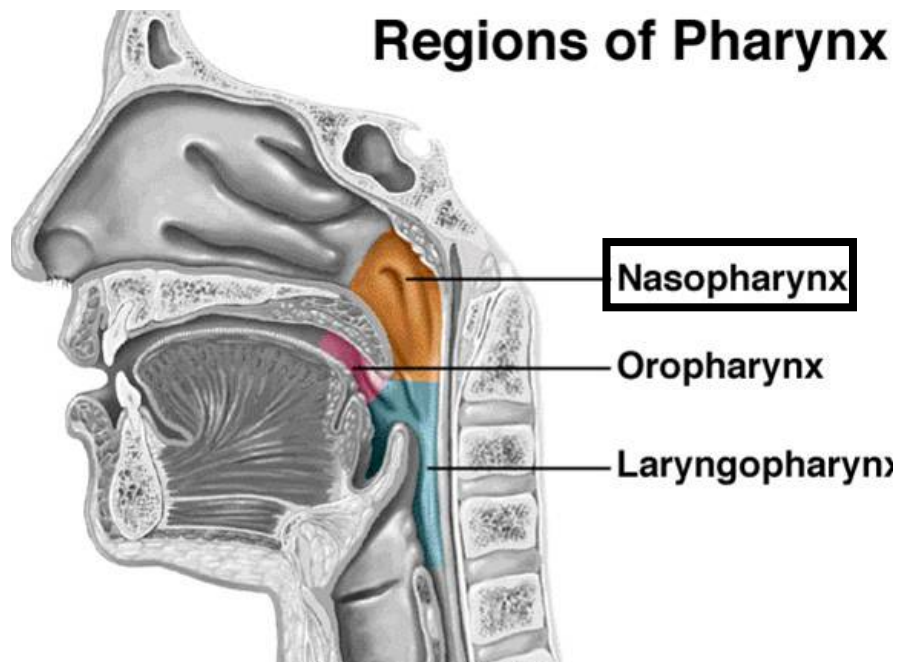
จีโนไทป์ (genotype) ของเชื้อ RSV

เชื้อ RSV นี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (subgroup) ใหญ่ๆ คือ RSV-A และ RSV-B โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่าง monoclonal antibody กับ G โปรตีน [12, 13, 52, 53] นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ G โปรตีนยังสามารถใช้จัดจำแนกไวรัสในแต่ละกลุ่มทั้ง RSV-A และ B ออกเป็นจีโนไทป์ (genotype) ต่างๆ ได้ [48] โดย RSV-A สามารถจำแนกได้เป็นจีโนไทป์ GA1-GA7, [15, 54] SAA1 (South Africa A1) [16], NA1, NA2 (Niigata) [55] และ ON1 (Ontario) ซึ่งเป็นจีโนไทป์ใหม่ที่เพิ่งถูกค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ที่ประเทศแคนาดาที่น่าสนใจคือจีโนไทป์นี้มีการจำลองตัวเองของลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเข้าไปถึง 72 bp นับเป็นการเปลี่ยนแปลงครั้งใหญ่ที่เกิดขึ้นกับ G โปรตีน โดยเฉพาะกับ RSV-A [56] ปัจจุบันมีเพียงไม่กี่ประเทศเท่านั้นที่พบจีโนไทป์นี้ ได้แก่ ญี่ปุ่น (GenBank data base) เกาหลีใต้ [57] และแอฟริกาใต้ [58] สำหรับ RSV-B นั้นสามารถจำแนกได้เป็น GB1-GB4, [15] SAB1-SAB4, [16, 59], URU1-URU2 (Uruguay) [60] BA1-BA10 (Buenos Aires) โดยจีโนไทป์ BA นี้พบว่ามี การจำลองตัวเองของนิวคลีโอไทด์เพิ่มเข้ามาถึง 60 bp [61-63] ปัจจุบันยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการเกี่ยวกับเกณฑ์ในการจัดจำแนกเป็นจีโนไทป์ใหม่ของเชื้อ RSV จะมีก็แต่เกณฑ์ของ Venter และคณะ ที่กล่าวไว้ว่าการจะเป็นจีโนไทป์ใหม่ได้นั้นจะต้องมีการจับกลุ่มกันใน phylogenetic tree ด้วยค่า bootstrap ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มตั้งแต่ 70% ขึ้นไป และสมาชิกในกลุ่มจะต่างกันได้ไม่เกิน 7% หรือมีค่า pair-wise nucleotide distance (*p*-distance) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.07 ซึ่งกฎเกณฑ์ดังกล่าวก็ยังคงมีการถูกกล่าวถึงและถูกใช้มาจนถึงปัจจุบันนี้ [16]

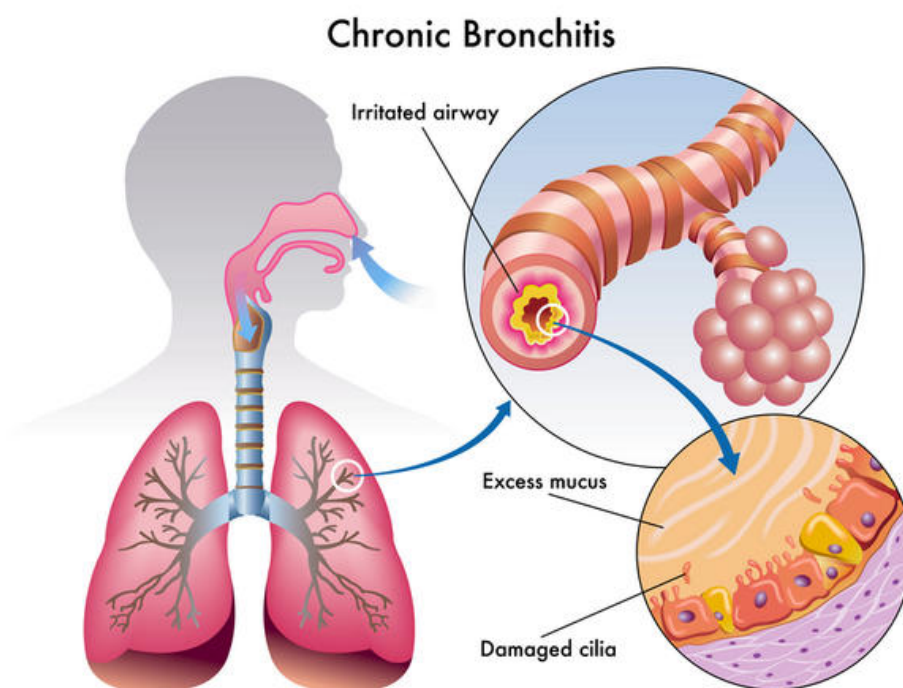
พยาธิกำเนิดของเชื้อ RSV

เชื้อ RSV สามารถติดต่อได้โดยการสัมผัสโดยตรงกับสารคัดหลั่งของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ (droplet transmission) หรือติดต่อทางอากาศ (airborne transmission) อย่างไรก็ตามการสัมผัสสารคัดหลั่งโดยตรงจะทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้มากกว่า สำหรับอวัยวะที่ไวต่อการติดเชื้อ ได้แก่ ตา และ จมูก ดังนั้นการล้างมือที่ถี่วิธี หรือไม่สัมผัสกับบริเวณที่มีการติดเชื้อจะสามารถช่วยลดการติดเชื้อได้ในระดับหนึ่ง เชื้อ RSV สามารถมีชีวิตอยู่ได้บน stethoscope ถึง 6 ชั่วโมง บนพื้นผิวที่ไม่มีรูพรุน ประมาณ 12 ชั่วโมง และสามารถมีชีวิตอยู่บนมือได้มากกว่า 30 นาที เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะใช้เวลาในการฟักตัวประมาณ 3-5 วัน และสามารถแพร่กระจายอยู่ในตัวผู้ป่วยได้นานถึง 3-8 วัน แต่อาจนานถึง 3 สัปดาห์ในเด็กเล็กและผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ส่วนในผู้ใหญ่จะอยู่ได้เพียงแค่ 1-6 วัน เท่านั้น [64, 65]

เชื้อ RSV จะทำการเพิ่มจำนวนในโพรงจมูกใกล้กับส่วนคอหอย (nasopharynx) (ภาพที่ 7) จากนั้นจะแพร่กระจายไปตามเซลล์เยื่อบุท่อลมเป็นผลให้เกิดการตายของเซลล์ (necrosis) ที่ติดเชื้อ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการหลั่งของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) จำนวนมากส่งผลให้เกิดอาการบวม (edema) ของเนื้อเยื่อในชั้น submucosa ทำให้เกิดการตีบของท่อลมภายในปอด (airways obstruction) (ภาพที่ 8) นอกจากนี้การหลั่งของสารจำพวก interleukins, chemokines หรือ leukotrienes อันเนื่องมาจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันส่งผลให้เกิดการอักเสบและเกิดความเสียหายกับเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจซึ่งจะใช้เวลาในการฟื้นตัวค่อนข้างนานหลายสัปดาห์ โดยเฉพาะ ciliated cell [66]



ภาพที่ 7: แสดงบริเวณของ nasopharynx [67]

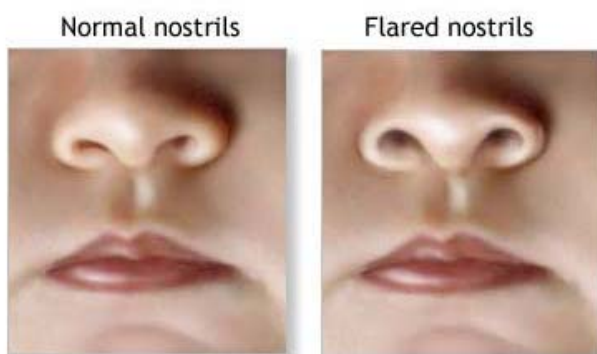


ภาพที่ 8: แสดงลักษณะของ airway obstruction [68]

อาการแสดงของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV

ลักษณะอาการที่แสดงออกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV นั้นค่อนข้างหลากหลายขึ้นอยู่กับอายุของผู้ป่วย โดยปกติแล้วเด็กทารกและเด็กเล็กที่ติดเชื้อครั้งแรกจะมีอาการที่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่างซึ่งได้แก่หลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) และอาการปอดบวม (pneumonia) อาการอื่นๆ ที่พบ ได้แก่ ไอ (cough) 98% มีไข้ (fever) 75% มีน้ำมูก (rhinorrhea) และหายใจมีเสียงดังเนื่องจากการตีบของหลอดลม (wheezing) 65-78% และหายใจลำบาก (labored respirations) 73% เด็กที่มีอาการป่วยรุนแรงจะแสดงลักษณะอาการดังต่อไปนี้ คือ เบื่ออาหาร และมีปัญหาเกี่ยวกับการหายใจ เช่น หายใจเร็ว ถี่ (tachypnea) รุนจมูกเปิดกว้าง (nasal flaring) (ภาพที่ 9) และมีภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) [69, 70] สำหรับในเด็กโต หรือ ผู้ใหญ่ จะมีอาการคล้ายไข้หวัดทั่วไป คือ ไอ มีไข้ และอาจมีอาการคั่งของเหลวในถุงลม (congestion) [66]

อาการของผู้ติดเชื้อ RSV จะค่อนข้างหนักในช่วงวันที่ 5 ของการป่วย และจะค่อยๆ ดีขึ้นในช่วงวันที่ 7-10 อย่างไรก็ตามอาการไออาจจะยังหลงเหลืออยู่ซึ่งอาจนานถึง 4 สัปดาห์เนื่องจาก ciliated cell ใช้เวลาค่อนข้างนานในการฟื้นตัว นอกจากนี้ 50% ของผู้ป่วยอาจจะยังคงมีอาการ wheezing อยู่ชั่วระยะหนึ่งหลังจากหายป่วยแล้ว [64, 65] โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องของการเกิด wheezing นั้นสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากปริมาณ IgE ที่เพิ่มมากขึ้นระหว่างการติดเชื้อ [71]



ภาพที่ 9: แสดงลักษณะของ nasal flaring [72]

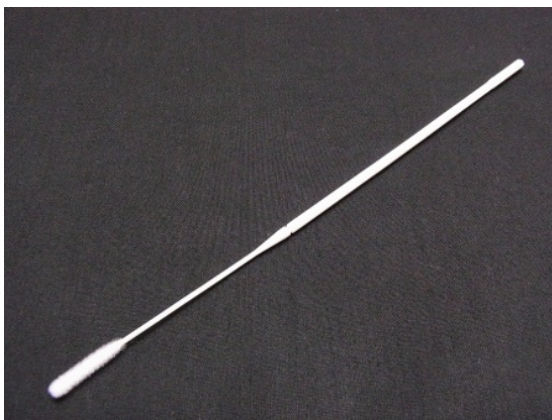
ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง

สำหรับปัจจัยต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ RSV อย่างรุนแรงนั้นมีดังนี้ [73, 74]

- โรคปอดเรื้อรัง (chronic lung diseases) เช่น bronchopulmonary dysplasia หรือภาวะที่เนื้อเยื่อปอดมีการเจริญผิดปกติ
- เด็กที่มีน้ำหนักแรกเกิดน้อยกว่า 2.5 กิโลกรัม
- เด็กที่เป็นโรคหัวใจแต่กำเนิด (cyanotic congenital heart disease)
- ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immune compromise)
- เด็กในครรภ์ที่ได้รับควันบุหรี่ผ่านทางมารดา (in utero exposure to tobacco smoke)
- บุคคลที่มีสถานะทางเศรษฐกิจและสังคมค่อนข้างต่ำ (low socioeconomic status)
- บุคคลที่มีภาวะกล้ามเนื้ออ่อนแรง (neuromuscular disease)
- เด็กที่คลอดก่อนกำหนด (คลอดก่อนกำหนด 35 สัปดาห์) (premature birth)

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ทางห้องปฏิบัติการ

ในการตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ทางห้องปฏิบัติการนั้นสามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแอนติเจนของไวรัสได้โดยตรง หรือตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสจากสารคัดหลั่งที่ได้จากระบบทางเดินหายใจ โดยชนิดและคุณภาพของสารคัดหลั่งที่ได้นั้นขึ้นอยู่กับความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อไวรัส สำหรับตัวอย่างสารคัดหลั่งที่ดีที่สุดในการนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ RSV คือ nasopharyngeal aspirate โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อมากกว่าตัวอย่างที่เป็น nasal swab มาก [75, 76] อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างโดยวิธี nasal swab ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์มากนัก นอกจากนี้ยังช่วยลดความไม่พึงพอใจที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วยขณะเก็บตัวอย่างอีกด้วย ปัจจุบันได้มีการพัฒนาอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างโดยวิธี nasal swab เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้กับการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการดังกล่าว อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่คือ flocked-nasopharyngeal swab [77] (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10: แสดงลักษณะของ flocced-nasopharyngeal swab [78]

วิธีการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่

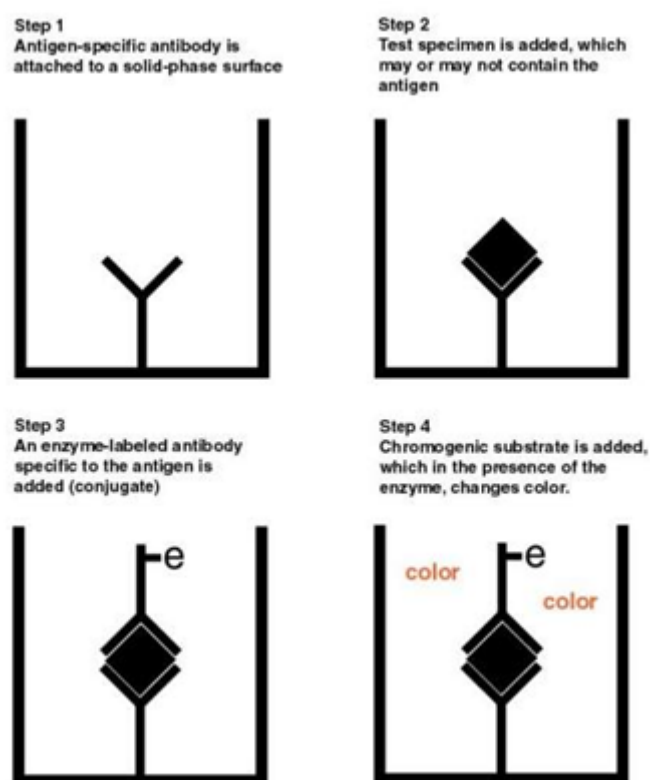
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื่องจากเชื้อไวรัส (virus isolate in tissue culture)

วิธีนี้จัดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจหาเชื้อ RSV โดยการนำ ตัวอย่างสารคัดหลั่งของผู้ป่วยที่สงสัยมาทำการเพาะเลี้ยงใน cell line ที่เหมาะสมซึ่งนิยมใช้ HEp-2 จากนั้นจึงตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้น หากตัวอย่างของผู้ป่วยรายใดมีเชื้อ RSV อยู่เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยแสดงลักษณะของ syncytia เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 3-6 วัน อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวใช้เวลาในการตรวจสอบค่อนข้างนาน ทำให้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อ ซึ่งภายหลังถูกเรียกว่า shell vial centrifugation culture ซึ่งเมื่อใช้ร่วมกับการตรวจสอบโดยวิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อแล้วจะสามารถรายงานผลได้ภายในเวลาไม่นาน [79-81]

- การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัส

การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ ไวรัสมียุ่มาหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ direct immunofluorescent assays (DFA) และ enzyme immunosorbent assays (EIA) โดยวิธี DFA นั้นใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ RSV และติดฉลากด้วย fluorescein เข้าจับกับแอนติเจนของเชื้อ RSV ที่อยู่ในเซลล์ซึ่งปะปนอยู่ในสารคัดหลั่งที่ทำ การเก็บมา แล้วจึงทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับวิธี EIA นั้นแอนติเจนหรือแอนติบอดีจะถูกติดฉลากด้วย เอนไซม์ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ substrate ที่เติมลงไปแล้วจึงทำการอ่านผลโดยหลักการของ EIA มี

ดังนั้นคือ แอนติเจนของเชื้อ RSV จะถูกจับโดยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ RSV จากนั้นแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์จะเข้ามาจับกับแอนติเจนซึ่งจะทำการย่อย substrate ที่เติมลงไป แล้วจึงนำไปทำการอ่านผล (ภาพที่ 11) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ RSV สำเร็จรูปขึ้นมา ซึ่งใช้ง่ายและใช้เวลาในการทำไม่นานก็สามารถอ่านผลได้ โดยมีความไวตั้งแต่ 72-94% และมีความจำเพาะถึง 95-100% เมื่อเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ อย่างไรก็ตามความไวของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี EIA ในเด็กโตและผู้ใหญ่จะลดลงโดยจะมีค่าตั้งแต่ 0-20% สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณไวรัสที่น้อยและระยะเวลาในการดำรงอยู่ก่อนข้างสั้นเนื่องจากผู้ป่วยในกลุ่มดังกล่าวอาจมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ RSV มาก่อนแล้ว [82-86]



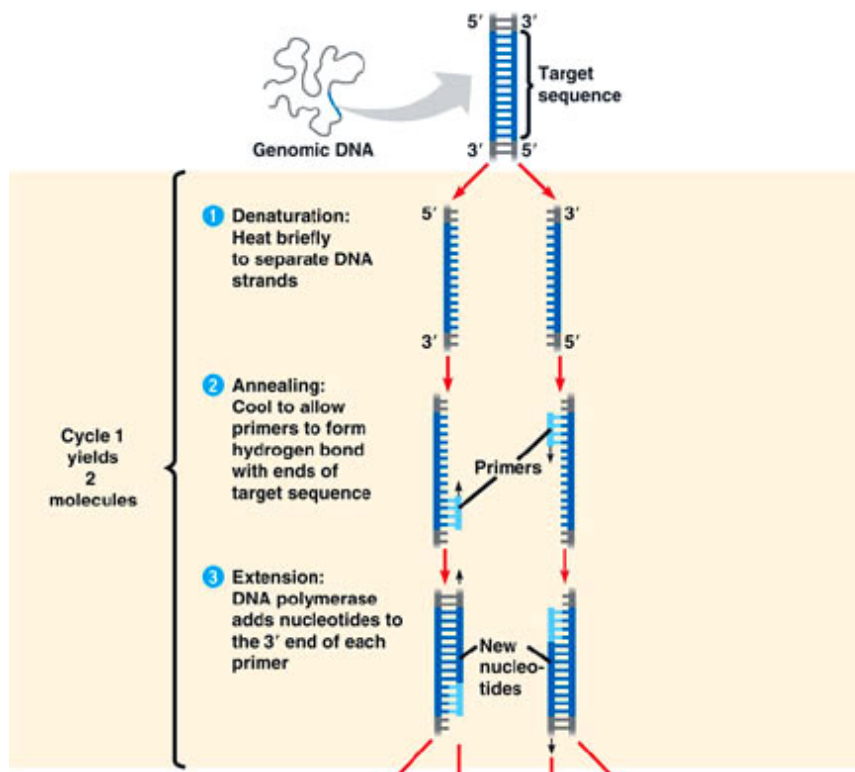
ภาพที่ 11: แสดงตัวอย่างการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ RSV ด้วยวิธี EIA [87]

■ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

จากวิธีการตรวจหาเชื้อ RSV ที่กล่าวมาข้างต้นนั้นจะเห็นว่าในเด็กโตหรือในผู้ใหญ่การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาแอนติเจนอาจก่อให้เกิดผลลบปลอมขึ้นได้เนื่องจากปริมาณไวรัสที่น้อยและระยะเวลาในการดำรงอยู่ของไวรัสค่อนข้างสั้น ทำให้วิธีการดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการนำมาใช้ทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อดู cytopathic effect ของเซลล์นั้นใช้เวลามากเกินไป จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการคิดค้นการตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ RSV โดยวิธีที่ใช้ในช่วงแรกและยังคงใช้กันโดยทั่วไปในปัจจุบันคือ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) [88-90]

RT-PCR เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่เป็น RNA เช่น RNA ของไวรัสโดยการเปลี่ยน RNA เป็น complimentary DNA หรือ cDNA ก่อนด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นจึงค่อยทำการเพิ่มจำนวน cDNA โดยกระบวนการต่างๆ ของ PCR ตามปกติ [91] ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้ [92] (ภาพที่ 12)

1. Denaturation ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่แยก DNA สายคู่ออกจากกัน โดยการให้ความร้อนประมาณ 90°C - 95°C
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณของ DNA ที่สนใจศึกษาเข้าไปเกาะกับสาย DNA แม่แบบ
3. Extension เป็นขั้นตอนสร้าง DNA สายใหม่ต่อจากนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase ซึ่งปัจจุบันใช้ DNA polymerase ที่แยกได้จาก *Thermus aquaticus* เนื่องจากสามารถทนความร้อนและทำงานได้ในอุณหภูมิที่อุณหภูมิสูงถึง 75°C - 80°C



ภาพที่ 12: แสดงขั้นตอนของ PCR ซึ่งประกอบด้วย Denaturation, Annealing และ Extension [93]

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี RT-PCR เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน N หรือ nucleocapsid gene [94-96] ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR ให้มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยมากขึ้น โดยนอกจากจะสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ได้รวดเร็วแล้วยังสามารถตรวจสอบปริมาณของไวรัสได้อีกด้วย เทคนิคดังกล่าว ได้แก่ real-time RT-PCR [97] ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ เหมือน PCR ปกติทุกประการ แต่ real-time PCR นั้นสามารถตรวจสอบผลขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ได้โดยการตรวจจับการเรืองแสงของสารเคมีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาในการทำ PCR [98]

การรักษา

ปัจจุบันมียาที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration) สำหรับใช้กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV อยู่ 2 ชนิด คือ Palivizumab และ Ribavirin

Palivizumab เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody หรือ mAb) ชนิดหนึ่งที่สามารถจับกับ F โปรตีนของเชื้อ RSV เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเข้าสู่เซลล์ของเจ้าบ้านได้ อย่างไรก็ตาม ยานชนิดนี้ไม่ได้มีผลต่อการรักษาอาการทางคลินิกของผู้ป่วย สำหรับกลุ่มเป้าหมายที่สามารถให้ยานชนิดนี้ได้ คือ ทารกในกลุ่มเสี่ยง (high risk infant) ซึ่งมีอาการของโรคปอดเรื้อรัง โรคหัวใจแต่กำเนิด และเด็กที่คลอดก่อนกำหนด สำหรับผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุ ได้แก่ เกิดผื่นขึ้น บริเวณรอยแผลที่เกิดจากการฉีดยา ตับทำงานหนัก ในบางรายอาจเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำร่วมด้วย [99-101]

Ribavirin เป็นยาที่สามารถยับยั้งการจำลองตัวเองของ DNA และ RNA ไวรัสได้ โดยจะให้กับผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มที่เสี่ยงต่อการติดเชื้ออย่างรุนแรงเท่านั้น เช่น ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ป่วยที่มีอาการของโรคหัวใจร่วมด้วย เนื่องจากยาดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพงและในกรณีที่ใช้ยานชนิด aerosolized อาจส่งผลกระทบต่อผู้ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงหรือเจ้าหน้าที่ๆ ทำหน้าที่ให้การรักษาได้ เช่น ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้หรือปวดหัว [66]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (Descriptive Cross-sectional study) โดยการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Ethics Committee of the hospital and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) หมายเลข IRB 386/53

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็น nasopharyngeal aspiration, nasal swab และ Throat swab โดยจะทำการเก็บจากผู้ป่วยที่มีอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ตัวอย่าง nasopharyngeal aspiration และ nasal swab ทำการเก็บจากผู้ป่วยแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลสิรินธร และ โรงพยาบาลต่างๆ ในกรุงเทพฯและปริมณฑล ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2010 ถึงเดือนธันวาคม 2011 สำหรับตัวอย่าง throat swab จะใช้ตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจไข้วัดใหญ่จากโรงพยาบาลชุมชนแห่งจังหวัดขอนแก่นตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2009 ถึงเดือนตุลาคม 2011

สำหรับจำนวนประชากรที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการคำนวณโดยใช้สมการ Cochran's sample size formula ซึ่งมีรูปแบบดังนี้

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

โดยที่

n คือ จำนวนตัวอย่าง

Z คือ ค่า alpha ที่ระดับความเชื่อถือว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ 1.96

p คือ อัตราความชุกของ RSV ในการศึกษาก่อนหน้านี้มีค่าเท่ากับ 16.3% โดยเฉลี่ย [102]

q คือ 1-p

d คือ ค่าความผิดพลาด ซึ่งในที่นี้เท่ากับ 0.05

เมื่อแทนค่าต่างๆ ลงในสมการแล้วจะได้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 210 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่จะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งสิ้นรวม 1,481 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่าง nasopharyngeal aspiration นั้นได้รวมตัวอย่างจากผู้ป่วยอายุมากกว่า 5 ปีเข้าไปด้วยเพื่อไม่ให้จำนวนตัวอย่างในกลุ่มนี้มีจำนวนน้อยเกินไป ตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จะถูกเก็บในรูปแบบนิรนามเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายแก่ตัวผู้ป่วย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Pipette tip: 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Elkay, Ireland)
- Microcentrifuge tube: 0.2 ml และ 1.5 ml (Axygen, USA)
- Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
- Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
- Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, USA)
- Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- Parafilm (American Nation Can, USA)
- Pasteur pipette (Hycon Plastics Inc., USA)
- Plastic wrap
- Stirring-magnetic bar
- Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- Combs (Bio-RAD, Hercules, California)

2. อุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P100 (20-100 μ l) และ P1,000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- Refrigerate microcentrifuge (Sigma, Germany)
- Microcentrifuge 0.2 ml (Sprout, USA)
- Microcentrifuge 1.5 ml (Eppendorf, Germany)
- Eppendorf Mastercycle personal (Eppendorf, Germany)
- Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)
- Refrigerator 4 °C (Mitsubishi, Japan)
- Freezer -20 °C (Sanyo, Japan)
- Freezer -70 °C (Forma Scientific, USA)
- PCR Cabinet (Augusta)
- Microwave oven (Sanyo, Japan)
- Water Purification equipment (Water pro PS, USA)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

3. วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัด RNA

- HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)

4. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ **Reverse Transcription** หรือการเปลี่ยน RNA เป็น **cDNA**

- Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma, Singapore)
- Improm-II™ Reverse transcriptase (Promega, USA)
- Random hexamer primer (Promega, USA)
- dNTP (Promega, USA)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, USA)

5. สารเคมีสำหรับกระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณเฉพาะด้วยวิธี **PCR**

- Perfect TaqPlus Master Mix kit (5 prime GmbH, Germany)

6. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบผลการทำ **PCR** ด้วยวิธี **Agarose gel electrophoresis**

- Tris base Biotechnology Grade (USB, Hongkong)
- Boric acid (USB, Hongkong)
- EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
- Agarose molecular grade (Promega, USA)
- 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)
- Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

7. วัสดุและสารเคมีสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ **PCR** ให้บริสุทธิ์

- Agarose Gel Extract mini kit (5 prime GmbH, Germany)

8. สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Phosphate buffered saline (PBS) (Bio Basic Inc.)
- Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

9. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทาง **Bioinformatic**

- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9)

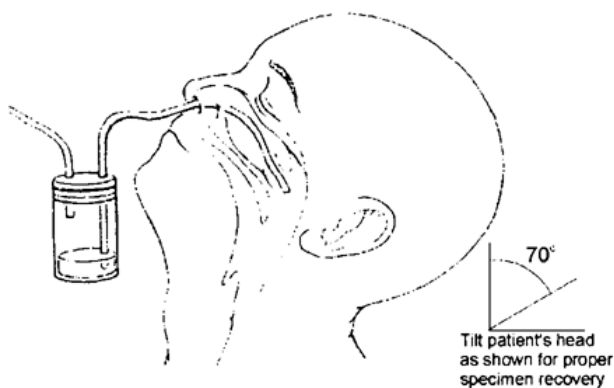
- Chromas Lite (version 2.01)
- SeqMan (DNA STAR, Madison, WI)
- EditSeq (DNA STAR, Madison, WI)
- Oligos primer design software (version 9.1)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 4.0.2)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

Nasopharyngeal aspiration

สำหรับการเก็บ nasopharyngeal aspiration จะใช้อุปกรณ์ดังต่อไปนี้ คือ กระจกสำหรับเก็บน้ำล้างโพรงจมูก หลอดยางสำหรับสอดเข้าโพรงจมูก และหลอดยางสำหรับต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่ใช้ในการดูด โดยมีขั้นตอนการเก็บดังนี้ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13: แสดงวิธีการเก็บน้ำล้างโพรงจมูก [103]

ในขั้นแรกแพทย์หรือพยาบาลจะทำการฉีดน้ำเกลือประมาณ 3-4 มิลลิลิตรเข้าไปในโพรงจมูก จากนั้นจะทำการสอดอุปกรณ์ดังรูป แล้วทำการดูดน้ำล้างโพรงจมูกเข้าสู่กระจกเก็บ จากนั้นตัวอย่างจะถูกเก็บใน viral transport media หลังจากได้รับตัวอย่างแล้วจะทำการแบ่งตัวอย่างลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ด้วย pasteur pipette แล้วทำการเก็บที่ -70°C เพื่อรอนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

Nasal swab

ในการทำ nasal swab นั้นมีอุปกรณ์ที่สำคัญคือไม้พันสำลี (cotton swab) โดยมีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้ คือ สอดไม้พันสำลีเข้าไปในบริเวณโพรงจมูกของผู้ป่วย จากนั้นหมุนไม้ประมาณ 2-3 วินาที แล้วดึงไม้ออกจุ่มปลายไม้ลงไป viral transport media หักไม้ส่วนที่เกินออก ปิดฝาให้สนิท หลังจากนั้นจึงทำการแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube แล้วเก็บที่ -70°C เพื่อรอนำไปใช้ในการทดลอง

Throat swab

หลักการคล้ายกับการทำ nasal swab คือ สอดไม้พันสำลีเข้าไปในลำคอแล้วใช้ไม้พันสำลีป้ายโดยรอบ จุ่มไม้ลงใน viral transport media หักไม้ส่วนเกินออก ปิดฝาให้สนิท หลังจากนั้นจึงทำการแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube แล้วเก็บที่ -70°C เพื่อรอนำไปใช้ในการทดลอง

2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วย HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit

(RNA extraction)

1. แบ่งตัวอย่างปริมาตร 200 μl ใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml จากนั้นเติม VB lysis buffer 400 μl นำไป vortex แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
2. เติม 95% ethanol ปริมาตร 500 μl แล้วนำไป vortex
3. แบ่งสารละลายที่ได้ใส่ลงใน VB column 600 μl จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
4. ดูดสารละลายที่เหลือลงใน VB column ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกครั้ง
5. เติม W1 ปริมาตร 400 μl ลงใน VB column นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
6. เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μl ลงใน VB column นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
7. นำ VB column ไป centrifuge อีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สารละลายที่ค้างบน filter ตกลงใน collection tube ให้หมด

8. นำ VB column ใส่ลงใน microcentrifuge 1.5 ml อันใหม่ จากนั้นเติม RNase-free water หรือ DEPC ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วจึงนำไป centrifuge
9. เก็บ RNA ที่ได้ไว้ที่ -70°C เพื่อรอนำไปใช้ต่อไป

3. การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วย random hexamer primer และ Improm-IITM Reverse transcriptase

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

- Distilled water (DW)	2.5 μl
- 3 mM MgCl_2	2.5 μl
- 0.5 mM dNTP	2.5 μl
- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase inhibitor	0.5 μl
- Reverse transcription buffer	3.5 μl
- Reverse transcriptase	1 μl
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) 5 นาที เพื่อให้ random hexamer primer เข้าไปจับกับสาย RNA ของไวรัส (Annealing)
5. นำไป Incubate ที่ 42°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้มีการสังเคราะห์สาย cDNA (Extension)
6. นำไป Heat ที่ 70°C เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อ inactivate การทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วนำ cDNA ไปเก็บที่ -20°C เพื่อรอนำไปใช้ต่อไป

4. การตรวจสอบผลการสกัด RNA โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ด้วยวิธี PCR

ก่อนทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ RSV ควรทำการตรวจสอบการแสดงออกของ house keeping gene ก่อนซึ่งในการวิจัยนี้ คือ GAPDH เพื่อเป็นการตรวจสอบกระบวนการสกัด RNA ว่ามีประสิทธิภาพดีพอและสามารถสกัดสารพันธุกรรมได้หรือไม่ด้วยวิธี PCR กระบวนการดังกล่าวมีเพื่อป้องกันไม่ให้เกิด false negative หรือผลลบปลอมขึ้น สำหรับปริมาณสาร โพรเมอร์ รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR แสดงอยู่ในตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH

Primer name	Sequence (5' → 3')	Product size
GAPDH_F112 (Forward)	GTG AAG GTC GGA GTC AAC GG	491 bp
GAPDH_R603 (Reverse)	GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC	

ตารางที่ 2: แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร (µl)
Distilled water (DW)	4.5
Perfect TaqPlus Master Mix (5 prime GmbH, Germany)	7.5
10 µM Forward primer	0.25
10 µM Reverse primer	0.25
cDNA template	1

ตารางที่ 3: แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน

GAPDH

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา	
Initial denaturation	94 °C	3 นาที	} ทำซ้ำ 40 รอบ
Denaturation	94 °C	18 วินาที	
Annealing	50 °C	21 วินาที	
Extension	72 °C	1: 30 นาที	
Final extension	72 °C	10 นาที	
Cool down	25 °C	5 นาที	

ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วทำการเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ 100 base pair DNA ladder

5. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ RSV (Primer design)

ในการศึกษานี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ RSV จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ รวมถึงใช้ในการจำแนกกลุ่มของเชื้อออกเป็น RSV-A และ RSV-B โดยจะทำการออกแบบเพื่อให้ครอบคลุมบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีน เนื่องจากบริเวณดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการระบุจีโนไทป์ของเชื้อชนิดนี้อย่างกว้างขวางทั้งในและต่างประเทศ

สำหรับวิธีการออกแบบขั้นแรกนำลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของ G โปรตีนทั้งหมดเท่าที่สามารถหาได้ของทั้ง RSV-A และ RSV-B จากธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) มาทำการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้บริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันของ sequence แต่ละเส้นอยู่ตรงกัน จากนั้นเลือกบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sequence แต่ละเส้นที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดมาทำการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับไพรเมอร์ที่ดีนั้นขนาดของนิวคลีโอไทด์ควรอยู่ที่ประมาณ 17-28 นิวคลีโอไทด์ โดยจะต้องมีปริมาณ GC content ประมาณ 50-60% เพื่อให้การเกาะกันของไพรเมอร์กับ cDNA template มีความมั่นคงมากขึ้น นอกจากนี้บริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ควรเป็น G หรือ C เพื่อที่การสังเคราะห์ DNA สายใหม่เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับค่า Tm หรือค่า melting temperature ของไพรเมอร์แต่ละคู่

(forward-reverse) ควรที่จะเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งหากค่าดังกล่าวไม่เท่ากันก็จะทำให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR ลดลง หรือทำให้ไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนของ DNA บริเวณดังกล่าวได้ โดยค่า T_m ที่เหมาะสมจะอยู่ที่ประมาณ 55-60 °C สำหรับค่า T_m สามารถคำนวณได้จากสมการ

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

การออกแบบไพรเมอร์ในการวิจัยครั้งนี้ไพรเมอร์ดังกล่าวจะต้องไม่มีการจับข้ามระหว่างกลุ่ม (subgroup) หมายความว่าไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ RSV-A ต้องไม่จับกับ RSV-B และในทางกลับกันไพรเมอร์ของ RSV-B ต้องไม่จับกับ RSV-A ซึ่งจากการออกแบบทำให้ได้ไพรเมอร์และตำแหน่งของไพรเมอร์ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4: ตารางแสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ในการศึกษาสำหรับตำแหน่งของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางอ้างอิงจาก reference strain A2 สำหรับ RSV-A และ reference strain 9320 สำหรับ RSV-B

Subgroup	Primer name	Sequence (5'→3')	Position
RSV-A	RSVA_227F1	5'-TACAAGATGCAACAARCCAGATCA-3'	227-250 of G gene
	RSVA_1072R	5'-CTAACTGCACTGCATGTTGATTGA-3'	122-99 of F gene
	RSVA_234F2	5'-TGCAACAARCCAGATCAAGAACAC-3'	234-257 of G gene
RSV-B	RSVB_225F1	5'-AGTTCAAACAATAAAAAACCACACTG-3'	225-250 of G gene
	RSVB_1009R	5'-TGCATTAATAGCAAGAGTTAGGAAG-3'	57-33 of F gene
	RSVB_269F2	5'-ACCTTACTCAAGTCYCACCAGAAA-3'	269-292 of G gene

6. การตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อ RSV ด้วยวิธี semi-nested PCR

นำ cDNA ที่ได้ไปตรวจหาเชื้อ RSV โดยทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปริตีน ของไวรัสด้วยวิธี semi-nested PCR ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 รอบ ในการทำ PCR รอบแรกจะใช้ไพรเมอร์ RSVA_227F1 และ RSVA_1072R สำหรับ RSV-A และใช้ไพรเมอร์ RSVB_225F1 และ RSVB_1009R สำหรับ RSV-B ในการทำ PCR รอบที่ 2 จะเปลี่ยน

เฉพาะ forward primer เท่านั้น โดย RSV-A จะใช้ RSVA_234F2 และ RSV-B จะใช้ RSVB_269F2 รายละเอียดของปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5: แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 ในการตรวจหาเชื้อ RSV-A และ RSV-B

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (µl/tube)	
	1 st PCR	2 nd PCR
Distilled water (DW)	4.5	4.5
Perfect TaqPlus Master Mix (5 prime GmbH, Germany)	7.5	7.5
10 µM Forward primer	0.25	0.25
10 µM Reverse primer	0.25	0.25
cDNA template	2	0.5

ตารางที่ 6: ตารางแสดงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ RSV-A และ RSV-B

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา	
Initial denaturation	94 °C	3 นาที	} ทำซ้ำ 40 รอบ (PCR1) } ทำซ้ำ 35 รอบ (PCR2)
Denaturation	94 °C	18 วินาที	
Annealing	55 °C	21 วินาที	
Extension	72 °C	1.30 นาที	
Final extension	72 °C	10 นาที	
Cool down	25 °C	5 นาที	

7. การตรวจสอบผลการทำ PCR โดยวิธี Agarose gel electrophoresis และการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย Agarose Gel Extract mini kit

หลังจากทำ PCR แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยปริมาณ agarose ในที่นี้จะใช้ 2% โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวแล้วจึงนำ gel ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide จากนั้นจึงทำการตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการ โดยเทียบกับ 100 bp DNA ladder ภายใต้แสง UV ขนาดของ PCR product โดยประมาณคือ 862 bp สำหรับ RSV-A และ 765 bp สำหรับ RSV-B เมื่อพบแถบของ PCR product ที่ต้องการแล้วจึงทำการตัด gel บริเวณนั้นออกมาเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Agarose Gel Extract mini kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เติม buffer PS ลงไปจากนั้นนำไป heat ที่ 50 °C จนกระทั่ง gel ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด
2. ระหว่างรอเวลาให้เตรียม CB2 column ที่จัดไว้ให้จากนั้นเติม buffer BL 500 µl แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ ขั้นตอนนี้ทำเพื่อชะล้าง filter ให้พร้อมสำหรับขั้นตอนต่อไป
3. คูด gel ที่ละลายแล้วลงใน CB2 column จากนั้นจึงนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ที่
4. เติม buffer PW 600 µl นำไป centrifuge เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใน collection tube ที่
5. ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกครั้ง โดยใช้ buffer PW 500 µl จากนั้นเทสารละลายใน collection tube ที่
6. ทำการ centrifuge เพิ่มอีก 2 นาที จากนั้นย้าย CB2 column ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml ใหม่
7. เติม buffer PEB ปริมาณ 50 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไป centrifuge 1 นาที จะได้ PRC product ที่บริสุทธิ์ตามต้องการ

นำ PCR product ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ปริมาณ 5µl มาตรวจอีกครั้งด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่าหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วยังมีแถบของ DNA ที่ต้องการหรือไม่ จากนั้นจึงส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่บริษัท First base laboratories SDN BHD ประเทศมาเลเซีย

เมื่อได้ผลแล้วจึงทำการอ่านผลด้วยโปรแกรม Chromas Lite (version 2.0.1) เพื่อตรวจสอบผลเบื้องต้นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความสัมพันธ์กับกราฟ chromatogram หรือไม่ แล้วจึงทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA analysis)

โดยใช้โปรแกรม

- Chromas Lite (version 2.0.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9) ใช้สำหรับการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิจัยนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 4.0.2) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree
- SeqMan เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการประกอบสาย forward และ reverse ของลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าด้วยกัน
- EditSeq เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการ export นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบแล้วจาก SeqMan

9. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.0.1) จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน

ฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันในขั้นต้นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นของเชื้อ RSV หรือไม่ และอยู่ในกลุ่มใด

- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV-A และ RSV-B ที่ทราบจีโนมไปเรียบร้อยแล้วมาทำการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit (version 7.0.9) เพื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือน หรือต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อจำแนกว่าจีโนมใดบ้างที่สามารถพบในการศึกษานี้และพบมากหรือน้อยเท่าไร
- ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างที่ได้จากการศึกษารั้งนี้กับสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype strain) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน และความต่าง นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบเพื่อตรวจหาตำแหน่งที่เกิดการแทนที่ (substitution) การหายไป (deletion) และการเพิ่มเข้ามา (insertion) รวมไปถึงตำแหน่งของ N glycosylation site ด้วยโปรแกรม BioEdit (version 7.0.9)

10. การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

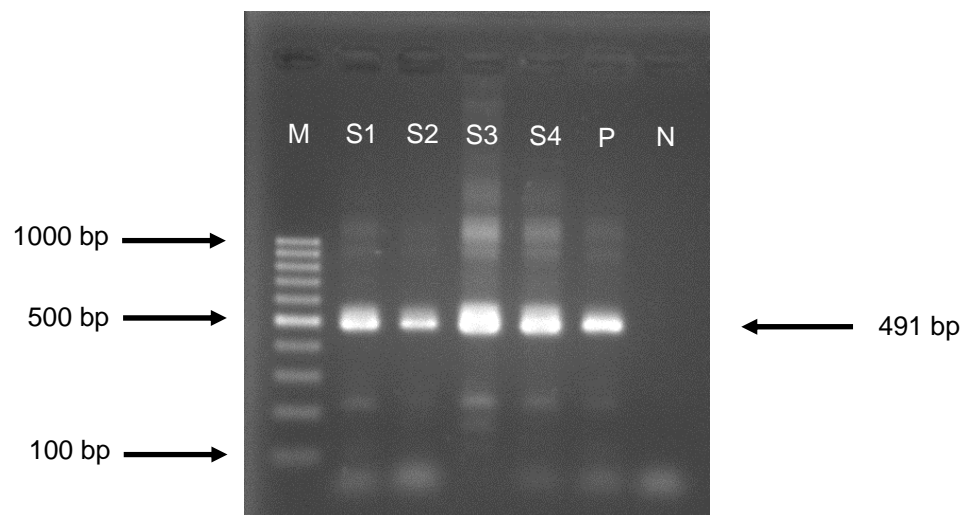
ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้ไปยังฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Sequin (version 12.3) โดยนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างจะได้หมายเลขอ้างอิง (accession number) เพื่อใช้ในการอ้างอิงและสืบค้น คือ KC342349-449 สำหรับ RSV-A และ KC342326-348 สำหรับ RSV-B

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจสอบการสกัด RNA โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ด้วยวิธี PCR

หลังจากทำการสกัด RNA และเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA แล้วจึงทำการตรวจสอบผลการสกัด RNA โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GAPDH_F112 และ GAPDH_R603 จะได้ PCR product ขนาด 491 bp ดังแสดงในภาพที่ 14

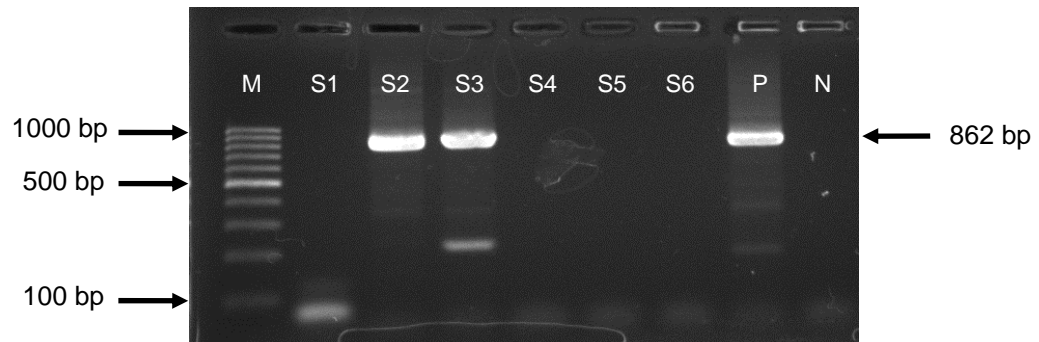


ภาพที่ 14: แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH ด้วยวิธี PCR ขนาดของ PCR product ที่ได้คือ 491 bp โดย M คือ 100 base pair DNA ladder, S1-S4 คือ ตัวอย่างที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ, P คือ positive control และ N คือ negative control

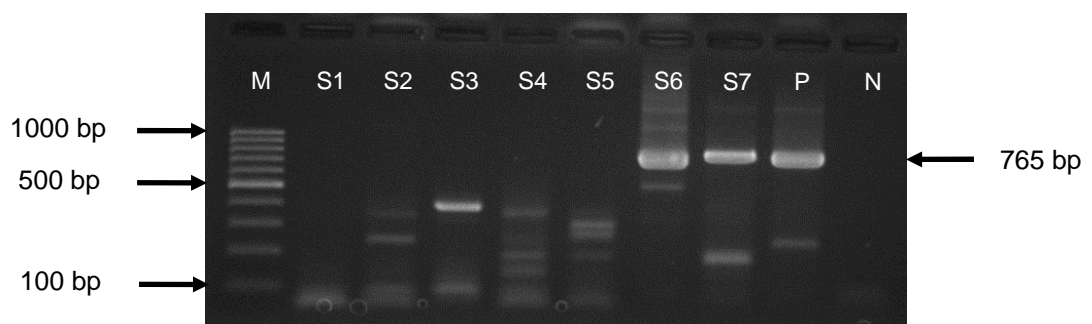
ผลการทำ PCR สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH พบว่าให้ผลบวกกับทุกตัวอย่าง แต่สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบจะต้องทำการสกัด RNA ใหม่ซึ่งเมื่อทำการสกัด RNA และเปลี่ยนเป็น cDNA แล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH แล้วพบว่าให้ผลบวกกับทุกตัวอย่างที่ทำการสกัด RNA ใหม่

2. ผลการตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อ RSV ด้วยวิธี semi-nested PCR

จากการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีน ด้วยวิธี semi-nested PCR เพื่อตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อ RSV จะได้ PCR product ขนาดประมาณ 862 bp สำหรับ RSV-A และ 765 สำหรับ RSV-B ดังแสดงในภาพที่ 15 และภาพที่ 16



ภาพที่ 15: แสดงผลการตรวจหาเชื้อ RSV-A ด้วยวิธี semi-nested PCR ได้ขนาดของ PCR product ที่ประมาณ 862 bp โดย M คือ 100 base pair DNA ladder, S1-S6 คือตัวอย่างที่ 1 ถึง 6 ตามลำดับ ในที่นี้ S1, S4, S5 และ S6 ให้ผลลบต่อเชื้อ RSV-A ขณะที่ S2 และ S3 ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV-A, P คือ positive control และ N คือ negative control

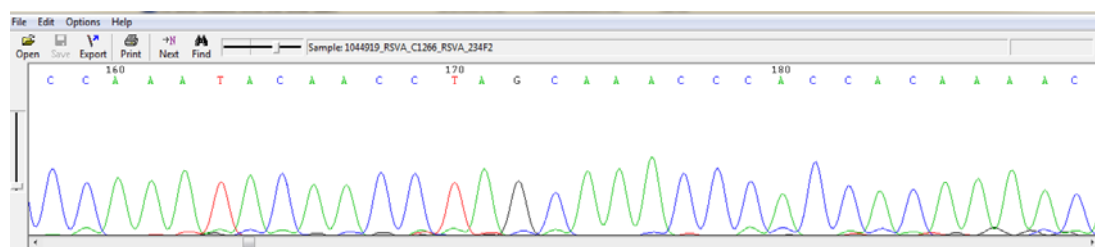


ภาพที่ 16: แสดงผลการตรวจหาเชื้อ RSV-B ด้วยวิธี semi-nested PCR ได้ขนาดของ PCR product ที่ประมาณ 765 bp โดย M คือ 100 base pair DNA ladder, S1-S7 คือตัวอย่างที่ 1 ถึง 7 ตามลำดับ ในที่นี้ S1, S2, S3, S4 และ S5 ให้ผลลบต่อเชื้อ RSV-B ขณะที่ S6 และ S7 ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV-B, P คือ positive control และ N คือ negative control

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลที่ได้จากการทำ PCR พบว่าในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 1,481 ตัวอย่าง (ร.พ.จุฬาลงกรณ์ รวมถึง ร.พ.ในกรุงเทพและปริมณฑล 267 ตัวอย่าง ร.พ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น 1,214 ตัวอย่าง) มี 148 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV คิดเป็น 10% จากตัวอย่างทั้งหมด อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงร้อยละของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV แยกตามโรงพยาบาล พบว่าโรงพยาบาลในกรุงเทพมีผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV คิดเป็น 27.34% และโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่นมีผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV คิดเป็น 6.1% สำหรับอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV นั้น เท่ากับ 2.0 ± 1.7 , 1.7 ± 1.8 , 1.6 ± 1.3 ปี ในปี 2009, 2010 และ 2011 ตามลำดับ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ปี รายละเอียดแสดงในตารางที่ 7 ในตัวอย่างจำนวน 148 ตัวอย่างนี้จำแนกเป็น RSV-A จำนวน 120 ตัวอย่าง คิดเป็น 81.1% และ RSV-B จำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 18.9% อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 101 ตัวอย่าง สำหรับ RSV-A และ 23 ตัวอย่างสำหรับ RSV-B เนื่องจากตัวอย่างที่เหลือมีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

3. ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ผ่านโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษานี้เป็นของ RSV-A และ RSV-B ตามที่คาดการณ์ไว้ ดังแสดงตัวอย่างไว้ในภาพที่ 17 ถึงภาพที่ 19



ภาพที่ 17: แสดงตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ secondary hypervariable region ของ G โปรตีน

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 08-042735, complete genome	1433	1490	100%	0.0	98%	JX015496.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 08-047045, complete genome	1433	1490	97%	0.0	99%	JX015493.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate BE08-5146, complete genome	1427	1484	100%	0.0	98%	JX015499.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate BE08-6850, complete genome	1427	1484	100%	0.0	98%	JX015482.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 08-001411, complete genome	1424	1481	100%	0.0	98%	JX015494.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 08-000507, complete genome	1424	1477	100%	0.0	98%	JX015493.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate RSV607, complete genome	1424	1481	100%	0.0	98%	JX015491.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 07-039193, complete genome	1424	1481	100%	0.0	98%	JX015489.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate RSV572, complete genome	1424	1481	100%	0.0	98%	JX015484.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus strain A/WI/629-Q0198/10, partial genome	1424	1481	100%	0.0	98%	JF920055.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 08-042544, complete genome	1420	1474	97%	0.0	99%	JX015495.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus isolate 07-041785, complete genome	1418	1475	100%	0.0	98%	JX015492.1
<input type="checkbox"/> Human respiratory syncytial virus strain A/WI/629-2/07, complete genome	1418	1479	100%	0.0	98%	JF920046.1

ภาพที่ 18: แสดงตัวอย่างผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV ผ่านโปรแกรม BLAST

Download GenBank Graphics sort by: E value

Human respiratory syncytial virus strain A/WI/629-Q0284/10, complete genome
Sequence ID: [gb|JF920053.1](#) Length: 15099 Number of Matches: 2

Range 1: 4908 to 5748 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1418 bits(1572)	0.0	822/842(98%)	4/842(0%)	Plus/Plus
Query 1	AACCCC--CATACGTTACCCAGA-TCCCCAGCTTGGAAATCAGCCTCTCCAATCTGTCCGG	57		
Sbjct 4908	AACCCCAACATACCTCACCCAGAATCCCAGCTTGGAAATCAGCTTCTCCAATCTGTCCGG	4967		
Query 58	AACTACATCACAAATCCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGCTGAGTcaacccc	117		
Sbjct 4968	AACTACATCACAAATCCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGCTGAGTCAACCCC	5027		
Query 118	acaatccacaacagtcgaagatcaaaaacacaacaacccaataacaacctagcaaac	177		
Sbjct 5028	ACAATCCACAACAGTCAGATCAAAAACACAACAACCCCAATATTACCTAGCAAACT	5087		
Query 178	caccacaaaacaacgccaataaaaaccacaaaacccaacacaaTGATTTTCACITTTGA	237		
Sbjct 5088	CACCACAAAACACGCCAAAATAAACCAAAAACAAACCCCAACATGATTTTCACITTTGA	5147		
Query 238	AGTGTTCAATTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAAATCCAACCTGCTGGGCCATCTG	297		
Sbjct 5148	AGTGTTCAATTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAAATCCAACCTGCTGGGCCATCTG	5207		
Query 298	CAAGAGAATaccaaaacaaaaaacctggaagaaaaccacccaagcccacaaaaaac	357		
Sbjct 5208	CAAGAGAATACCAAAACAAAAAACCCTGGAAGAAAAACCACCAAGCCCACAAAAAAC	5267		
Query 358	aacctcaagacaacaaaaaagatcccaaacctcaaaccaaaaacaaaGGAAGTACT	417		
Sbjct 5268	AACCTCAAGACAACCAAAAAGATCCCAACCTCAAACCAAAAACCAAGGAAGTACT	5327		

ภาพที่ 19: แสดงตัวอย่างผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV ผ่านโปรแกรม BLAST

4. ผลการทำ Phylogenetic tree

หลังจากตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจีโนมแล้วจากธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) เพื่อที่จะได้ทราบว่าในการศึกษานี้พบการระบาดของเชื้อ RSV จีโนมป์ใดบ้าง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่

RSV-A

จีโนมป์ GA1: AF233917, AF233902
 จีโนมป์ GA2: AF233900, AF233915, AF233923
 จีโนมป์ GA3: AF233920, AF233913
 จีโนมป์ GA4: AF065254
 จีโนมป์ GA5: AF233909, AF233916
 จีโนมป์ GA6: AF233901, AF233918
 จีโนมป์ GA7: AF233910, AF233904, AF348804
 จีโนมป์ SAA1: AF348807, AF348808
 จีโนมป์ NA1: JN257703, AB603449, AB603451, AB470478
 จีโนมป์ NA2: AB470479, AB603444, AB603443
 จีโนมป์ ON1: JX627336, JN257693, JN257694, AB761610, AB761609,
 AB754590

RSV-B

จีโนมป์ GB1: AF065250, M73542
 จีโนมป์ GB2: AF065251
 จีโนมป์ GB3: AF233929, AF233933
 จีโนมป์ GB4: AF233928, AF233931
 จีโนมป์ SAB1: AF348826, AF348825
 จีโนมป์ SAB2: AF348821, AF348822

จีโนไทป์ SAB3: AF348813, AB175822

จีโนไทป์ SAB4: JN119987, JN119979

จีโนไทป์ URU1:AY488805, AY488804

จีโนไทป์ URU2:AY333361, M17213

จีโนไทป์ BA1: DQ227364, AY751131, DQ227379

จีโนไทป์ BA2: JQ582844, DQ227377, DQ227389

จีโนไทป์ BA3: DQ227388, DQ227375, DQ227376

จีโนไทป์ BA4: DQ227408, DQ227396, DQ227407

จีโนไทป์ BA5: AB175820, AB175819

จีโนไทป์ BA6: AY751110, AY751117

จีโนไทป์ BA7: DQ227406, HM459864, HM459870, AY751087

จีโนไทป์ BA8: HM459871, HM459873

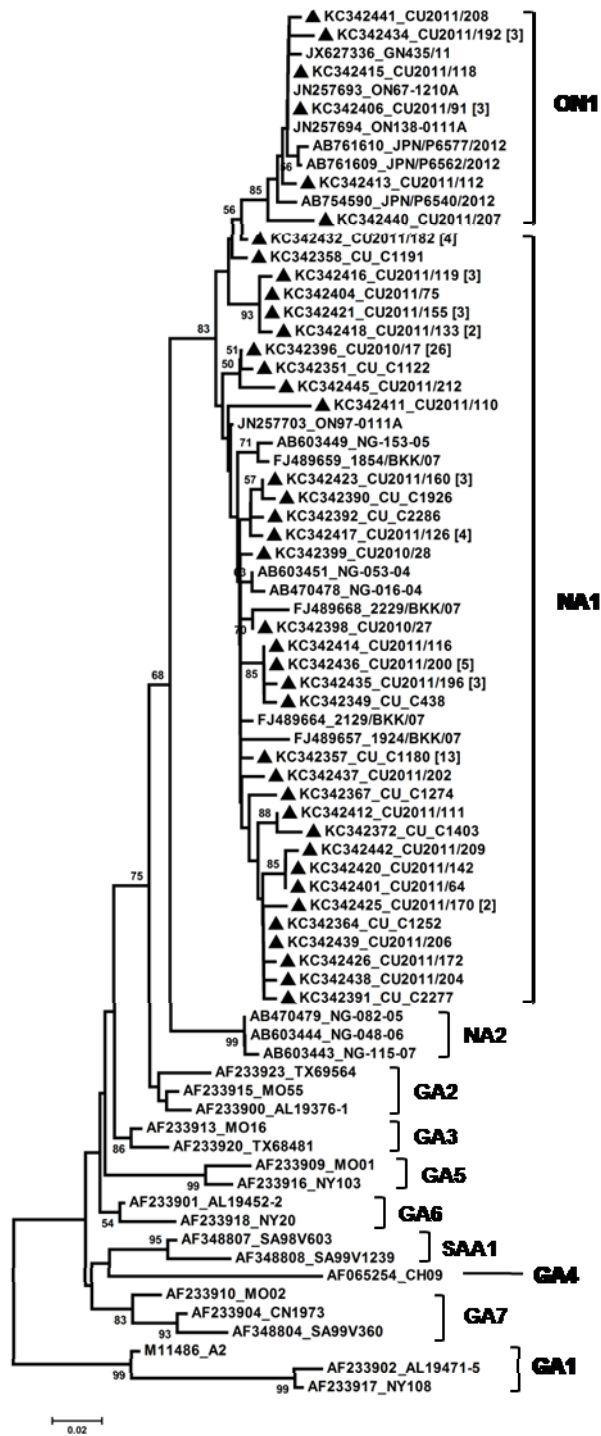
จีโนไทป์ BA9: DQ227395, HM459880, HM459876

จีโนไทป์ BA10: HM459891, HM459884, HM459886

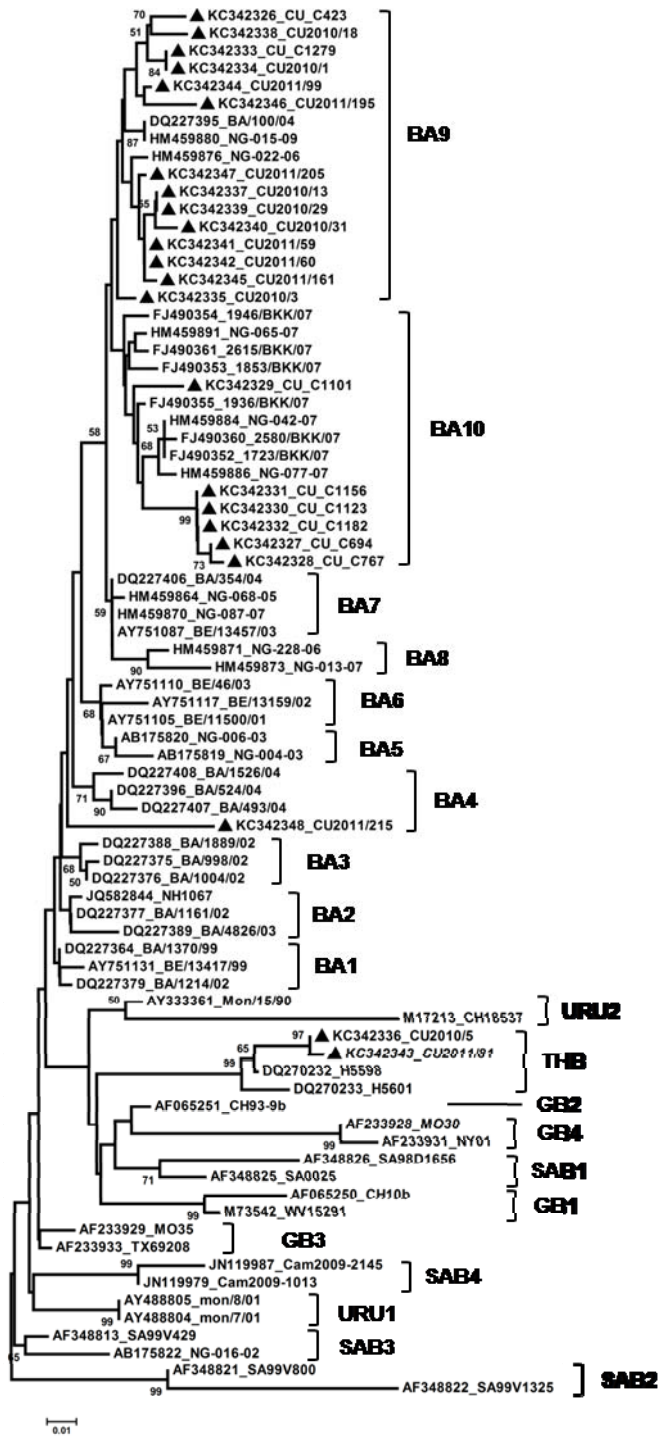
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจีโนไทป์แล้วจะดำเนินการ โดยการใช้ phylogenetic tree โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการจัดเรียง (alignment) ด้วย Cluster W Multiple Alignment ผ่าน โปรแกรม BioEdit จากนั้นนำผลที่ได้มาทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.2 ด้วยวิธี Neighbor-Joining method ซึ่งผลที่ได้แสดงดังในภาพที่ 20 สำหรับ RSV-A และภาพที่ 21 สำหรับ RSV-B

ตารางที่ 7: แสดงผลการพบเชื้อ RSV ในช่วงอายุต่างๆ จาก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลในกรุงเทพและปริมณฑล และ โรงพยาบาลชุมแพ ตั้งแต่ปี 2009 ถึงปี 2011

ปี	จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด	จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผล บวกต่อเชื้อ RSV (%)	อายุเฉลี่ย [mean±SD]	ช่วงอายุของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV (%)		
				≤ 2 Yrs	>2-5 Yrs	>5 Yrs
2009	166	3 (1.8)	2.0 ± 1.7	2 (66.7)	1 (33.3)	0
2010	575	61 (10.6)	1.7 ± 1.8	50 (82.0)	9 (14.7)	2 (3.3)
2011	740	84 (11.4)	1.6 ± 1.3	63 (75.0)	20 (23.8)	0
จำนวนรวม	1481	148 (10.0)	1.7±1.5	115 (77.7)	30 (20.3)	2 (1.3)



ภาพที่ 20: แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ RSV-A โดยตัวเลขข้างหลังชื่อตัวอย่างแสดงจำนวนตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน



ภาพที่ 21: แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของเชื้อ RSV-B

5. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ RSV-A จำนวน 101 ตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจีโนไทป์แล้วด้วย phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกจีโนไทป์ได้ 2 จีโนไทป์ คือ NA1 จำนวน 91 ตัวอย่าง คิดเป็น 90.1% และจีโนไทป์ ON1 จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.9% นอกจากนี้เมื่อทดลองนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนไทป์ GA2 บางส่วนจากการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ [25] มาทำการเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree ในการศึกษา นี้พบว่าจีโนไทป์ดังกล่าวถูกจัดกลุ่มใหม่โดยจัดไปอยู่ในจีโนไทป์ NA1

ข้อมูลจาก phylogenetic tree ได้แสดงค่า bootstrap ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มตัวอย่างเข้าด้วยกันของ NA1 จากการศึกษานี้ไว้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 83% สำหรับความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างในกลุ่มนี้ได้ถูกแสดงด้วยค่า pair-wise nucleotide distance (p -distance) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.000 - 0.064 หรือถ้าคิดเป็นร้อยละก็จะแตกต่างกันตั้งแต่ 0 – 6.4% เท่านั้น สำหรับจีโนไทป์ ON1 เป็นจีโนไทป์ใหม่ที่เพิ่งพบเมื่อไม่นานนี้ ในการศึกษานี้จับกลุ่มกันโดยมีค่า bootstrap สนับสนุนถึง 85% โดยมีความแตกต่างของตัวอย่างในกลุ่มนี้ตั้งแต่ 0 – 2.9% หรือมีค่า p -distance เท่ากับ 0.000 – 0.029 ตัวอย่างตารางที่แสดงค่า p -distance ได้แสดงไว้ในภาพที่ 22

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1. CU C438																										
2. CU C1122	0.033																									
3. CU C1180	0.019	0.024																								
4. CU C1191	0.036	0.020	0.029																							
5. CU C1262	0.024	0.029	0.014	0.034																						
6. CU C1274	0.029	0.033	0.019	0.039	0.014																					
7. CU C1403	0.039	0.044	0.029	0.049	0.019	0.024																				
8. CU C1926	0.029	0.033	0.019	0.019	0.024	0.029	0.039																			
9. CU C2277	0.029	0.034	0.019	0.039	0.005	0.019	0.024	0.029																		
10. CU C2296	0.024	0.029	0.014	0.024	0.019	0.024	0.034	0.014	0.014																	
11. CU2010/72	0.028	0.005	0.019	0.029	0.024	0.029	0.039	0.029	0.029	0.024																
12. CU2010/227	0.019	0.024	0.009	0.029	0.014	0.019	0.029	0.019	0.019	0.014	0.019															
13. CU2010/298	0.019	0.014	0.009	0.029	0.014	0.019	0.029	0.019	0.019	0.014	0.009	0.009														
14. CU2011/64	0.034	0.029	0.024	0.044	0.009	0.024	0.029	0.034	0.014	0.029	0.034	0.024	0.024													
15. CU2011/75	0.043	0.038	0.033	0.019	0.039	0.043	0.054	0.028	0.044	0.033	0.034	0.033	0.049													
16. CU2011/110	0.053	0.050	0.043	0.053	0.046	0.053	0.064	0.053	0.054	0.040	0.053	0.043	0.043	0.050	0.050											
17. CU2011/111	0.029	0.034	0.019	0.039	0.009	0.024	0.009	0.029	0.014	0.024	0.029	0.019	0.019	0.019	0.044	0.054										
18. CU2011/116	0.005	0.028	0.014	0.033	0.019	0.024	0.034	0.024	0.024	0.019	0.024	0.014	0.014	0.029	0.038	0.048	0.024									
19. CU2011/119	0.019	0.043	0.038	0.024	0.044	0.049	0.060	0.033	0.049	0.038	0.038	0.039	0.038	0.054	0.005	0.063	0.019	0.043								
20. CU2011/123	0.024	0.029	0.014	0.024	0.019	0.024	0.034	0.014	0.024	0.009	0.024	0.014	0.014	0.029	0.033	0.030	0.024	0.019	0.030							
21. CU2011/123	0.040	0.043	0.030	0.024	0.044	0.040	0.059	0.033	0.049	0.030	0.030	0.030	0.030	0.054	0.005	0.063	0.049	0.043	0.000	0.030						
22. CU2011/143	0.034	0.029	0.024	0.044	0.009	0.024	0.029	0.034	0.014	0.029	0.034	0.024	0.024	0.000	0.048	0.058	0.019	0.039	0.054	0.029	0.054					
23. CU2011/159	0.043	0.038	0.033	0.019	0.039	0.043	0.054	0.028	0.044	0.033	0.033	0.034	0.033	0.049	0.000	0.058	0.044	0.038	0.005	0.033	0.005	0.049				
24. CU2011/168	0.024	0.029	0.014	0.014	0.019	0.024	0.034	0.005	0.024	0.009	0.024	0.014	0.014	0.029	0.024	0.040	0.024	0.019	0.020	0.009	0.020	0.029	0.024			
25. CU2011/173	0.034	0.039	0.024	0.044	0.009	0.024	0.029	0.034	0.014	0.029	0.034	0.024	0.024	0.019	0.049	0.059	0.019	0.029	0.054	0.029	0.054	0.019	0.049	0.029		
26. CU2011/173	0.029	0.034	0.019	0.038	0.005	0.019	0.024	0.029	0.009	0.024	0.029	0.019	0.019	0.014	0.034	0.053	0.014	0.024	0.038	0.024	0.038	0.014	0.034	0.024	0.014	

ภาพที่ 22: แสดงตัวอย่างตารางแสดงค่า p -distance สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละเส้น

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ RSV-B จำนวน 23 ตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบด้วย phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกจีโนไทป์ได้เป็น 4 จีโนไทป์ คือ BA9 จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็น 60.9%, BA10 จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 26.1%, BA4 จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.3% และจีโนไทป์ใหม่ที่รายงานครั้งแรกในการศึกษานี้ คือ THB (Thailand strain B) จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.7%

จากข้อมูลของ phylogenetic tree จะเห็นว่าค่า bootstrap ที่สนับสนุนการจับกลุ่มกันของ BA4, BA9 และ BA10 นั้นมีค่าต่ำกว่า 50% สำหรับค่า *p*-distance ของ BA9 มีค่าตั้งแต่ 0.000- 0.041 และค่า *p*-distance ของ BA10 มีค่าตั้งแต่ 0.000-0.069 นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนไทป์ BA4 บางส่วนจากการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ [25] มาทำการเปรียบเทียบด้วย phylogenetic tree ในการศึกษานี้พบว่าจีโนไทป์ดังกล่าวถูกจัดกลุ่มใหม่อยู่ในจีโนไทป์ BA10

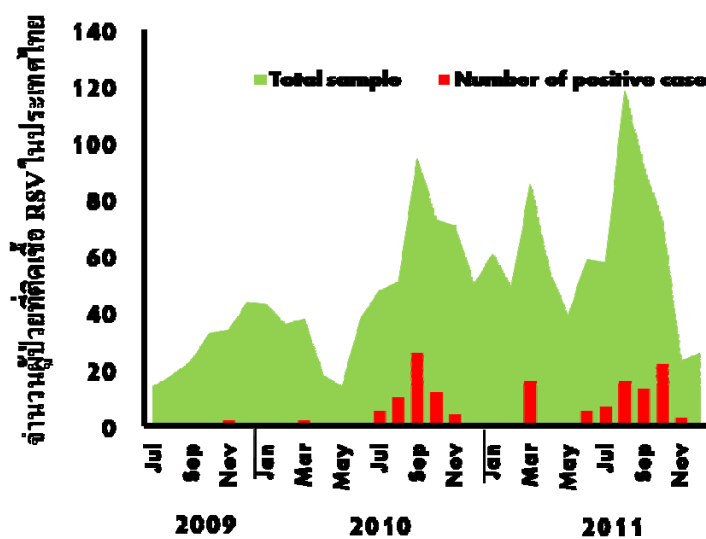
สำหรับจีโนไทป์ THB นั้นเดิมทีพบครั้งแรกที่กรุงปักกิ่ง ประเทศจีนจำนวน 2 ตัวอย่างเท่านั้น (H5598 และ H5601) [104] แต่ในขณะนั้นยังไม่ได้มีการระบุจีโนไทป์ให้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ต่อมาเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST และ phylogenetic tree สำหรับตัวอย่าง CU2010/5 และ CU2011/81 ในการศึกษานี้พบว่ามี ความคล้ายคลึงและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ H5598 และ H5601 จากประเทศจีน และเมื่อนำมาพิจารณาเกณฑ์การเป็นจีโนไทป์ใหม่ตามหลักของ Venter และคณะ ที่กล่าวว่า การจะเป็นจีโนไทป์ใหม่ นั้นต้องมีค่า bootstrap สนับสนุนใน phylogenetic tree ตั้งแต่ 70% ขึ้นไป และสมาชิกในกลุ่ม นั้นต้องมีค่า pair-wise nucleotide distance (*p*-distance) หรือค่าที่แสดงความแตกต่าง น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.07 ซึ่งการศึกษานี้ให้ค่า bootstrap ของกลุ่มนี้เท่ากับ 99% และค่า *p*-distance ของสมาชิก แต่ละตัวมีความต่างกันไม่เกิน 0.07 ดังแสดงในตารางที่ 8 ดังนั้นการศึกษานี้จึงจัดตัวอย่างกลุ่มนี้เป็น จีโนไทป์ใหม่ เมื่อวิเคราะห์ผลต่อมาพบว่าจีโนไทป์ THB นี้มีความคล้ายคลึงกับจีโนไทป์ GB2 (CH93-9b) โดยมีค่า *p*-distance ระหว่าง CU2010/5 และ GB2 (CH93-9b) เท่ากับ 0.077 หรือมีความ คล้ายกันถึง 92.3% และระหว่าง CU2011/81 กับ GB2 เท่ากับ 0.082 หรือมีความคล้ายกัน 91.8%

ตารางที่ 8: แสดงค่า pair-wise nucleotide distance (p -distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไข้ THB

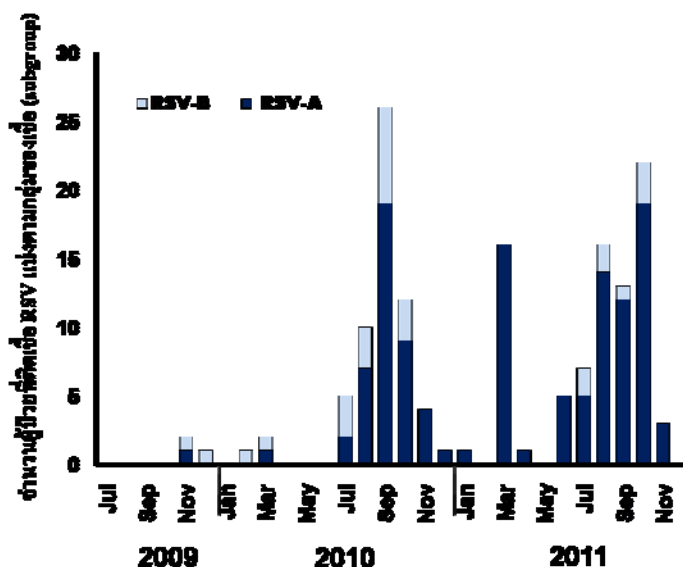
	CU2010/5	CU2011/81	H5598	H5601
CU2010/5				
CU2011/81	0.004			
H5598	0.020	0.024		
H5601	0.037	0.041	0.024	

6. ผลของระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีการตรวจพบเชื้อ RSV ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนปี 2009 ซึ่งต่อมาอัตราการติดเชื้อลดลงจนหายไปจนกระทั่งพบอีกครั้งในเดือนกรกฎาคมปี 2010 และพบเรื่อยมากระทั่งถึงเดือนพฤศจิกายน 2011 โดยเดือนที่ตรวจพบ RSV มากที่สุดคือเดือนกันยายนในปี 2010 และตุลาคมในปี 2011 ที่น่าสนใจคือในเดือนมีนาคมปี 2011 มีการตรวจพบเชื้อ RSV ในจำนวนที่ค่อนข้างสูงต่างๆ ที่เดือนดังกล่าวอยู่ในช่วงหน้าร้อน สำหรับกลุ่ม (subgroup) ที่พบมากในการศึกษานี้ (predominant subgroup) คือ RSV-A ดังแสดงในภาพที่ 23 และภาพที่ 24



ภาพที่ 23: แสดงระบาดวิทยาของเชื้อ RSV ในปี 2009 - 2011



ภาพที่ 24: แสดงระบาดวิทยาของเชื้อ RSV ในปี 2009 – 2011 โดยแบ่งตามกลุ่ม (subgroup) ของเชื้อ

เมื่อวิเคราะห์ถึงระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลพบว่าในปี 2009 จีโนไทป์ NA1 ของ RSV-A และ BA9 ของ RSV-B ถูกพบในจำนวนที่เท่ากัน ต่อมาในปี 2010 จีโนไทป์ที่พบมากที่สุดคือ NA1 (68.9%) รองลงมาคือ BA9 (15.6%), BA10 (13.3%) และ THB (2.2%) ตามลำดับ และในปีที่ทำการศึกษาล่าสุด (ปี 2011) จีโนไทป์ NA1 ยังคงถูกพบในจำนวนที่มากกว่าจีโนไทป์อื่นและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา (76.6%) ส่วนจีโนไทป์ที่พบรองลงมาคือ ON1 (13%), BA9 (7.8%), BA4 และ THB พบในจำนวนที่เท่ากัน (1.3%) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9: แสดงจำนวนจีโนไทป์ของ RSV ตั้งแต่ เดือนกรกฎาคมปี 2009 ถึงเดือน

ธันวาคมปี 2011

จีโนไทป์	2009		2010		2011	
	n ^A /total ^B (%)	n/total (%)	n/total (%)	n/total (%)	n/total (%)	n/total (%)
RSV-A						
NA1	1/2 (50.0)	31/45 (68.9) ^C	59/77 (76.6)			
ON1	0/2 (0.0)	0/45 (0.0)	10/77 (13.0)			
RSV-B						
BA4	0/2 (0.0)	0/45 (0.0)	1/77 (1.3)			
BA9	1/2 (50.0)	7/45 (15.6)	6/77 (7.8)			
BA10	0/2 (0.0)	6/45 (13.3)	0/77 (0.0)			
THB	0/2 (0.0)	1/45 (2.2)	1/77 (1.3)			

A คือ จำนวนจีโนไทป์ของ RSV ที่พบในแต่ละปี

B คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อ RSV และสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในแต่ละปี

C คือ ตัวเลขที่หนาแสดงถึงจีโนไทป์ที่พบมากที่สุดในแต่ละปีที่ศึกษา

7. ผลแสดงลักษณะของกรดอะมิโนและตำแหน่งของ N-glycosylation

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดจากการศึกษานี้มาวิเคราะห์ถึงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณ second hypervariable region โดยการจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า ขนาดของกรดอะมิโนในกลุ่ม RSV-A คือ 298 อะมิโนสำหรับ NA1 และ 322 อะมิโนสำหรับ ON1 โดยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนในกลุ่ม NA1 เป็น 85 – 100% และในกลุ่ม ON1 เป็น 93 – 100%

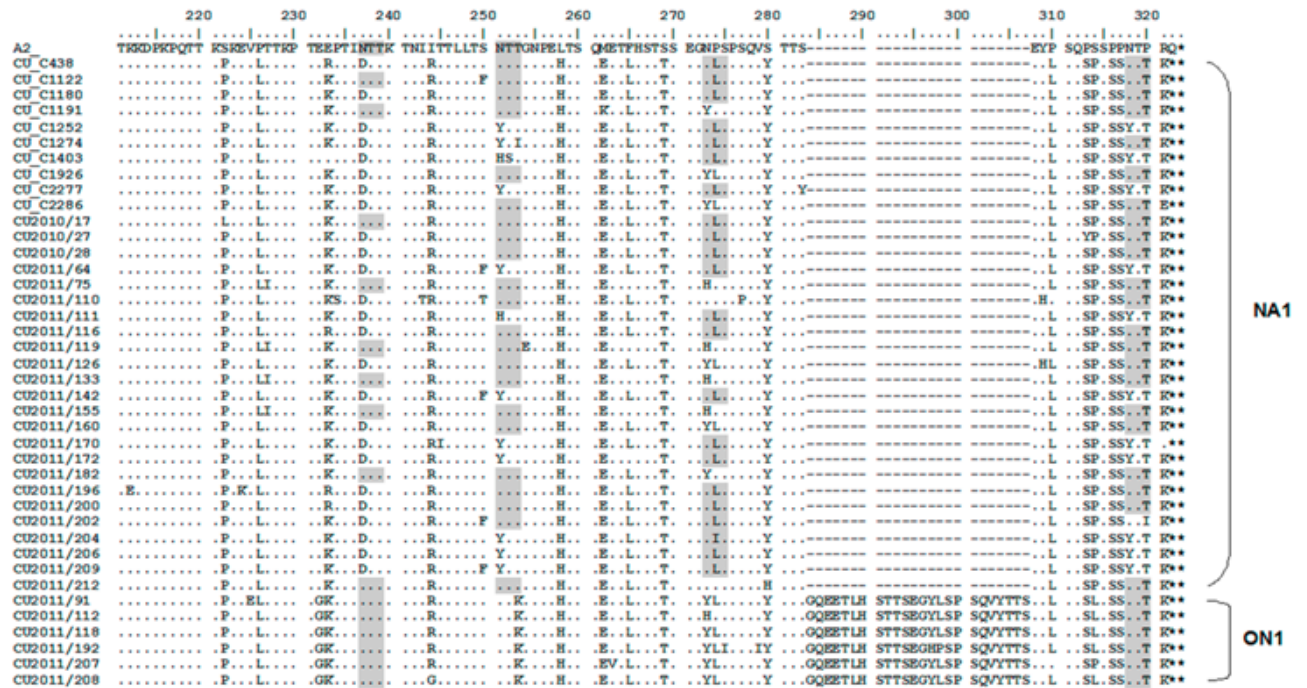
เมื่อวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับลำดับกรดอะมิโนเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype strain) สายพันธุ์ A2 พบว่ามีการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับจีโนไทป์ NA1 และ ON1 ในการศึกษาที่เทียบกับสายพันธุ์ A2 ดังนี้ คือ S222P/L, P226L, E233K/R, I244R/G, L258H,

M262E/K, F265L, S269T, S280Y/H, P286L (310 สำหรับ ON1), P289S/Y (313 สำหรับ ON1), S290P/L (314 สำหรับ ON1), P292S (316 สำหรับ ON1), P293S (317 สำหรับ ON1), P296T/I (320 สำหรับ ON1) และ R297K/E (321 สำหรับ ON1) ในกลุ่มจีโนไทป์ ON1 มีการแทนที่ของกรดอะมิโนที่จำเพาะกับกลุ่มนี้และไม่พบในจีโนไทป์ NA1 ดังนี้คือ E232G, T253K และ S314L

ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปrotein สำหรับ RSV-A จากการศึกษาได้แสดงถึงตำแหน่งของ N-glycosylation ซึ่งมีอยู่ 4 ตำแหน่งหลัก ดังนี้

1. แอสพาราจินตำแหน่งที่ 237 ณ ตำแหน่งนี้มีความเหมือนกันในกลุ่มของ ON1 แต่พบในกลุ่ม NA1 จำนวนเล็กน้อย
2. แอสพาราจินตำแหน่งที่ 251 ตำแหน่งนี้พบเฉพาะในกลุ่ม NA1 เป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่พบในกลุ่ม ON1
3. แอสพาราจินตำแหน่งที่ 273 ตำแหน่งนี้พบเฉพาะในกลุ่ม NA1 เป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่พบในกลุ่ม ON1 เช่นเดียวกับตำแหน่ง 251
4. แอสพาราจินตำแหน่งที่ 294 ตำแหน่งนี้พบในกลุ่ม ON1 ทั้งหมด และพบส่วนใหญ่ในกลุ่ม NA1

รายละเอียดเกี่ยวกับการแทนที่ของกรดอะมิโนและตำแหน่ง N-glycosylation ของ RSV-A จากการศึกษาได้แสดงในภาพที่ 25 นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของจีโนไทป์ ON1 จากการศึกษาเกี่ยวกับลำดับกรดอะมิโน ON1 ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้จากแคนาดา ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และแอฟริกาใต้ พบว่าไม่ค่อยมีความแตกต่างกันยกเว้น ON1 จากแอฟริกาใต้ที่พบการแทนที่ของ E308K และไม่พบใน ON1 จากประเทศอื่นรวมถึงของประเทศไทยเอง (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 25: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของ RSV-A เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype) สายพันธุ์ A2 โดยจุดไข่ปลาแสดงถึงลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับตัวอย่างตัวแรกซึ่งในที่นี้คือสายพันธุ์ต้นแบบ A2 และบริเวณที่ระบายสีเทาคือตำแหน่งของ N-glycosylation

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320		
ON67-1210A	KGDFKPKQTT	KPKQVLTTRK	TGKPTINTTK	TNIRTTLLTS	NTKGNPEHTS	QRETLHSTTS	EGYLSPSQVY	TTSQQEETLH	STTSEGYLSP	SQVYTTSEYL	SQSLSSSNTT	K*	Canada
ON138-0111AP..	*	
JPN/P6562/2012V.....	*	Japan
JPN/P6577/2012V.P.....	*	
JPN/P6587/2012	*	
JPN/P6540/2012P.....HP..	.A.....	*	South Korea
RSVA/GN435/11	*	
RXH/ON1/001R.....	*	South Africa
RXH/ON1/002	K.	*	
RXH/ON1/003	K.	*	
RXH/ON1/004	K.	*	
RXH/ON1/005	K.	*	
RXH/ON1/006	K.	*	
RXH/ON1/007	K.	*	
RXH/ON1/008	K.	*	
CU2011/91E.....	*	Thailand
CU2011/112	HP.....	*	
CU2011/118	*	
CU2011/192I..I..HP..	*	
CU2011/207V.....	P..P..	*	
CU2011/208G.....	*	

ภาพที่ 26: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของ RSV-A จีโนไทป์ ON1 จากการศึกษาในและจากการศึกษาในประเทศแคนาดา ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และแอฟริกาใต้ เส้นสีดำใต้กรดอะมิโนแสดงบริเวณที่มีการจำลองตัวเองของกรดอะมิโนและกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อ ON1 จากแอฟริกาใต้

ต่อมาเมื่อวิเคราะห์ถึงขนาดของกรดอะมิโนในกลุ่ม RSV-B พบว่ามีขนาด 296 อะมิโนสำหรับ THB และ 313 อะมิโนสำหรับจีโนไทป์ BA ยกเว้นตัวอย่าง CU2011/205 มีขนาดกรดอะมิโนเท่ากับ 320 อะมิโน โดยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนในกลุ่มจีโนไทป์ BA9 เป็น 92 – 100% จีโนไทป์ BA10 เป็น 90 – 100% และในจีโนไทป์ THB เป็น 99%

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ second hypervariable region ของ G โพรตีนของ RSV-B ในการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype) สายพันธุ์ CH18537 (เปรียบเทียบกับจีโนไทป์ที่ไม่ใช่ BA) และสายพันธุ์ BA4128/99B (สำหรับจีโนไทป์ BA) พบว่าใน BA ทุกจีโนไทป์มีการแทนที่ S247P เมื่อพิจารณาถึงการแทนที่ของกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์แล้ว พบว่า ในจีโนไทป์ BA9 มีการแทนที่ V271A ในจีโนไทป์ BA10 มีการแทนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์นี้ 3 ตำแหน่งคือ K213R, E226D และ E292G สำหรับ BA4 ในการศึกษาพบเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะพิจารณาถึงการแทนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์นี้ในการศึกษาได้ สำหรับในกลุ่มจีโนไทป์ที่ไม่ใช่ BA ในการศึกษานี้มีเพียงจีโนไทป์ THB เท่านั้น และเมื่อพิจารณาถึงการแทนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ THB พบว่ามีอยู่ 7 ตำแหน่งคือ R214I, T239I, R242K, V251M, K258N, E272D และ T295V

ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ second hypervariable region ของ G โพรตีนของ RSV-B จากการศึกษาได้แสดงถึงตำแหน่งของ N-glycosylation ไว้ 3 ตำแหน่งหลักดังนี้

1. แอสพาราจีนตำแหน่งที่ 258 ตำแหน่งนี้พบเฉพาะในกลุ่มของ THB เท่านั้น
2. แอสพาราจีนตำแหน่งที่ 296 หรือ 276 (สำหรับ THB) ตำแหน่งนี้พบทั้งใน THB และ BA ทุกจีโนไทป์
3. แอสพาราจีนตำแหน่งที่ 310 หรือ 290 (สำหรับ THB) ตำแหน่งนี้พบใน THB, BA9 และ BA10 ทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบใน BA4

สำหรับตำแหน่ง N-glycosylation ตำแหน่ง 230 และตำแหน่ง 253 นั้นถูกพบเพียงแค่ตัวอย่าง H5598 ของ THB และ CU2011/195 ของ BA9 ตามลำดับ รายละเอียดเกี่ยวกับการแทนที่ของกรดอะมิโนและตำแหน่ง N-glycosylation ของ RSV-B ได้แสดงไว้ในภาพที่ 27 นอกจากนี้เมื่อลองทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ THB กับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นตัวแทนของจีโน

ไทป์ทั้งหมดที่มีการค้นพบ พบว่ากรดอะมิโนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ THB มีความคล้ายคลึงกันกับผล
ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ รายละเอียดแสดงในภาพที่ 28

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	
CH18537	TNKRDPKTPA	KMPKKEIITN	PAKPKTLKTT	ERDTSISQST	VLDITPKY-	-----	-----	T	IQQQSLHSTT	SENTPSSTQI	PTASEPSTLN	PN*RT*SHA*
H5598	...I.....	.T.E..TT..	ST.....I.	.K..T...M..	T..NH-	-----	-----		FD...N...TS.	STQ.V*...*	
H5601	...I.....	.T.....TT..	.T.....I.	.K..T...M..	TK.NH-	-----	-----	Y.....	FD...N...TS.	STQEV*...*	} THB
CU2010/5	...IV.....	.T.E..AT..	.T.N...I.	.K..T...M..	T..NH-	-----	-----		FD...N...T	...F...S.	STQ.V*...*	
CU2011/81	...IV.....	.T.G..AT..	.T.N...I.	.K..T...M..	T..NH-	-----	-----		FD...N...T	...F...S.	STQ.V*...*	
BA4128/99BKL.	.TL...TTI.	.T...P...	...T...	T.S.HT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKH.		P...N...TS.	STQ.L*.Y.*	
CU2011/215PL.	.N.I...T...	FRI.....	TP...L...	TAS.HT	ERDTSTPQST	VLDTTTSKH.	R...Y...	P...N...TS.	S*.L*.Y.*	} BA4
CU C423L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	SEHT	ERDTSTPQSI	APDTTTSKH.	Y.....	L...N...T	...K...S.	ST*.LQ.Y.*	
CU C1279L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDTTTSKH.	T...Y...	L...NF...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2010/1L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDTTTSKH.	T...Y...	L...NF...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2010/3L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	GRDTSTSQSI	ALDTTTSKH.	Y.....	P...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2010/13L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDSTTSKH.	T...Y...	...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2010/18L.	.T..I.TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDTTTSKH.	Y.....	L...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	} BA9
CU2010/29L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDSTTSKH.	T...Y...	...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2010/31L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDSTTSKH.	T...P...	...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2011/59L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSF	ALDTTTSKH.	T...Y...	P...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2011/60L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSF	ALDTTTSKH.	T...Y...	P...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2011/99L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTPQSI	ALDTTTSKH.	Y.....	P...N...T	...D...S.	ST*.LQ.Y.*	
CU2011/161L.	.T...T.I.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSF	ALDTTTSKH.	T...Y...	P...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU2011/195L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...N...	T.S.NT	ERDTSTSQST	ALDTTTSKH.	T...Y...	P...N...T	...D...S.	ST*.LQ.Y.*	
CU2011/205L.	.T...TTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQSI	ALDTTTSKH.	T...Y...	P...N...TS.	STQ.LQ.Y.*	
CU C694	..R.....L.	.T...DTTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKH.		FG...N...TS.	TT*.LQ.Y.*	} BA10
CU C767	..R.....L.	.T...DTTI.	.T...P...	TP...A...	T.S.HT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKH.		FG...N...TS.	TT*.LQ.Y.*	
CU C1101	..R.....L.	.T...TTI.	.T...P...	K...TP...	T.S.HT	EGDTSTQSI	VLDATSEH.	V.....	FG...N...T	...K...S.	ST*.LQ.Y.*	
CU C1123	..R.....L.	.T...DTTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKH.		FG...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU C1156	..R.....L.	.T...DTTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKH.		FG...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	
CU C1182	..R.....L.	.T...DTTI.	.T...P...	TP...T...	S.HT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKH.		FG...N...TS.	ST*.LQ.Y.*	

ภาพที่ 27: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของ RSV-B เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในการศึกษานี้กับสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype) สายพันธุ์ CH18537 (เปรียบเทียบกับจีโนมในปีที่ 'ไมไร' BA) และสายพันธุ์ BA4128/99B (เปรียบเทียบกับจีโนมในปี BA) โดยจุดไข่ปลาแสดงถึงลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับตัวอย่างตัวแรกซึ่งในที่นี้คือ CH18537 และบริเวณที่ระบายสีเทาคือตำแหน่งของ N-glycosylation

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	
BA/1370/99_BA-I	THGRDPKTLA	KTLLKKE--TT	INPT--KKPTP	KTTERDTSTG	QSTVLDITTS	KHTERDTSTG	QSTVLDITTS	KHTIQOQSLH	STTPENTPHS	TQTPTASEPS	TGNSSTQKLS	YA*
BA/1214/02_BA-I				A								*
BA/1161/02_BA-II		P		P			P					*
BA/4826/03_BA-II		P		T.L	IP							*
BA/1889/02_BA-III	S			P			I				N	*
BA/1004/02_BA-III				P	F		I				N	*
BA/1526/04_BA-IV				L	P		I		P			*
BA/524/04_BA-IV				L	P	T	I		Y			*
NG-006-03_BA-V			Q	P			I					Q
NG-004-03_BA-V			Q	P			FI		T			Q
BE/46/03_BA-VI				P	N		P					Q
BE/11500/01_BA-VI				P			P					Q
NG-068-05_BA-VII		P		P			I		Y			Q
NG-087-07_BA-VII		P		P			I		Y			Q
NG-228-06_BA-VIII		P.G		P	L		I		Y			Q
NG-013-07_BA-VIII		P.G		G.Q	P		I		Y			Q
NG-015-09_BA-IX		P		P		L	FIA		Y	F		Q
NG-022-06_BA-IX		P					IA					Q
NG-065-07_BA-X		P		P	N		PI		Y	G		Q
NG-042-07_BA-X		P.D		P			I		I.G			Q
WV15291_GB1		P	T	T	L	T	L	E				NTQ
CH10b_GB1		A.P	T	T	L	E						NTQ
CH93-5b_GB2		P	T	L	P	P	N					A*
HD35_GB3		L									L	*
TX69208_GB3			T									*
HD30_GB4		S	A.R	TD	E	R	D		V			GA*
NY01_GB4		S	A.R	TD	E	L	R		V	L		GA*
SA0025_SAB1		P		T	L	L	I		TL		F	EA*
SA98D1656_SAB1		P	M.N	T	N	L	S		I	L	F	T*
SA99V7800_SAB2			T	E	G		A	E	V	N	F	P*
SA99V1325_SAB2	RG	R	A	G	T	ER	G	G	A	E	V	P*
SA99V429_SAB3			T				A	G		N		Q
NG-016-02_SAB3		P		T	G	P	A	G		P		Q
Cam2009-2145_SAB4			T			K				R	Y	I
Cam2009-1013_SAB4			T				E					F
mon/8/01_URU1		P	KE	T	GS		E		F			R*
mon/7/01_URU1		P	KE	T	GS		E		F			R*
Mon/15/90_URU2			N	T	L	P				I		T*
CH18537_URU2		P	MP	II	T	A	L		S	S	I	L
H5598	I	P	PE	T	S	L	I	K				I
H5601	I	P	PE	T	S	L	I	K				I
CU2010/5	I	P	PE	T	S	L	I	K				I
CU2011/81	I	P	PG	AA	T	N	L	I	K			I

ภาพที่ 28: แสดงผลการจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของจีโนไทป์ THB กับตัวแทนของทุกจีโนไทป์ที่มี การค้นพบ กรอบสี่เหลี่ยมแสดงกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ THB และบริเวณที่ระบายสีเทาคือตำแหน่งของ N-glycosylation

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อ RSV ในประเทศไทยก่อนหน้านี้นักศึกษาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โดยสามารถแยกเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ RSV-A และ RSV-B [21, 22] ต่อมาเมื่อมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามามีใช้ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ RSV ในประเทศไทยพบว่านอกจากจะพบเชื้อทั้งสองกลุ่มระบาดร่วมกันแล้ว แต่ละกลุ่มยังสามารถจัดจำแนกได้เป็นจีโนไทป์ที่หลากหลายอีกด้วย [25] อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวทำในระยะเวลาสั้นๆ และใช้จำนวนตัวอย่างในการศึกษาค่อนข้างน้อยทำให้ยังขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับรูปแบบการระบาดและจีโนไทป์ที่พบในแต่ละปี ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อให้ความกระจ่างชัดเกี่ยวกับปัญหาดังกล่าวข้างต้น

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาดังกล่าวถึงความชุก จีโนไทป์ รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนไทป์ที่พบ ซึ่งการศึกษานี้ได้นำข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ second hypervariable region ของ G โพรตีน มาทำการศึกษาเนื่องจากบริเวณดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อชนิดนี้เป็นหลัก [15, 16, 54-56, 59-63] นอกจากนี้บริเวณดังกล่าวยังเป็น strain specific epitope [51] ดังนั้นข้อมูลทางพันธุกรรมจากบริเวณนี้อาจมีประโยชน์ต่อการนำไปผลิตวัคซีนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ของเชื้อ RSV ที่พบมากในแต่ละประเทศหรือภูมิภาค สำหรับชนิดของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ nasopharyngeal aspiration, nasal swab และ throat swab อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่มีคุณภาพและเหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ RSV คือ nasopharyngeal aspiration [75, 76] แต่เนื่องจากชนิดของตัวอย่างดังกล่าวมีวิธีการเก็บที่ค่อนข้างลำบากและอาจก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ตัวผู้ป่วย รวมถึงผู้ปกครองของผู้ป่วยบางรายอาจไม่ยินยอมให้มีการเก็บตัวอย่างโดยวิธีดังกล่าว จากปัญหาต่างๆ เหล่านี้อาจส่งผลให้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อยเกินไปดังนั้นจึงได้นำตัวอย่างสารคัดหลั่งชนิดอื่นเข้ามามีใช้ในการศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งในที่นี้ได้ใช้ตัวอย่างที่เป็น throat swab จากโรงพยาบาลชุมชนแพเนื่องมาจากตัวอย่างจากโรงพยาบาลดังกล่าวมีการเก็บอย่างต่อเนื่อง สม่ำเสมอ เป็นระบบ และมีจำนวนมากซึ่งอาจช่วยให้การศึกษานี้มีคุณค่าและความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

ผลการศึกษาพบว่า จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 1,481 คน มีผู้ป่วยจำนวน 148 คน ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ RSV คิดเป็น 10% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ในช่วงปี 2003-2007 โดยการศึกษาดังกล่าวมีค่าความชุกเท่ากับ 8.9% อย่างไรก็ตามค่าความชุกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างจากที่พบในประเทศอื่นๆ ค่อนข้างมาก เช่น ในประเทศญี่ปุ่น (37.1%) [105] หรือเวียดนาม (23%) [106] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากการศึกษาในญี่ปุ่นหรือเวียดนามใช้ตัวอย่างสารคัดหลั่งจากบริเวณ nasopharyngeal เช่น nasopharyngeal aspiration ทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อค่อนข้างสูง ในขณะที่การศึกษานี้มีการใช้ throat swab ซึ่งเป็นไปได้ว่าโอกาสที่ตรวจพบเชื้อ RSV จะลดต่ำลงและส่งผลกระทบต่อความชุกที่ได้ ซึ่งเมื่อทดลองแยกพิจารณาตามชนิดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ความชุกของตัวอย่างที่ชนิด nasopharyngeal aspiration จากโรงพยาบาลในกรุงเทพฯ มีค่ามากกว่าความชุกจากตัวอย่างที่เป็น throat swab จากโรงพยาบาลชุมชนแพะ จังหวัดขอนแก่น ทั้งๆ ที่ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในกรุงเทพฯ มีจำนวนน้อยกว่าโรงพยาบาลชุมแพมาก จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีความสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานข้างต้น ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าตัวอย่างชนิด throat swab ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับความชุกของเชื้อ RSV

นอกจากความชุกของการพบเชื้อ RSV แล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ปี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [23, 25] สาเหตุที่พบเจอการติดเชื้อของเด็กในช่วงอายุนี้อาจเนื่องมาจากเด็กในช่วงอายุนี้นี้เป็นเด็กทารกแรกคลอดซึ่งไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ RSV ทำให้เด็กกลุ่มนี้ติดเชื้อได้ง่ายมากกว่าเด็กโตหรือผู้ใหญ่ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อชนิดนี้จากการติดเชื้อครั้งแรกอยู่แล้ว [75] นอกจากนี้เมื่อนำผลการตรวจ Influenza virus ของผู้ป่วยบางรายมาพิจารณา พบว่า ผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อ Influenza มีจำนวนน้อยมาก สันนิษฐานได้ว่าผู้ป่วยที่สามารถตรวจพบเชื้อ RSV กับ Influenza virus อยู่คนละช่วงอายุกัน

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยเชื้อ RSV ระบาดมากในช่วงหน้าฝนตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนพฤศจิกายน โดยเดือนที่พบการระบาดของเชื้อมากที่สุดคือเดือนกันยายนหรือเดือนตุลาคม ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ [21, 22] นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกับประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ประเทศเวียดนาม หรือกัมพูชาด้วยเช่นกัน [59, 106] สิ่งที่น่าสนใจคือในเดือนมีนาคม ปี 2011 นั้นพบอัตราการระบาดของเชื้อค่อนข้าง

สูงซึ่งใกล้เคียงกับเดือนสิงหาคมในปีเดียวกัน ทั้งที่เดือนดังกล่าวอยู่ในช่วงฤดูร้อน ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเนื่องมาจากความกดอากาศสูงที่เคลื่อนที่จากประเทศจีนส่งผลให้มีฝนตกมากและอุณหภูมิค่อนข้างต่ำทำให้เชื้อเจริญได้ค่อนข้างดี [107]

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ RSV-A นั้นมีอัตราการระบาดมากกว่าเชื้อ RSV-B โดยสามารถจัดจำแนกออกได้เป็นจีโนไทป์ NA1 และ ON1 โดยผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี 2007 ซึ่งขณะนั้นพบจีโนไทป์ GA2 และ GA5 [25] อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GA2 จากการศึกษาก่อนหน้านี้มาลองสร้าง phylogenetic tree พบว่าจีโนไทป์ GA2 ดังกล่าวถูกจัดกลุ่มใหม่ โดยถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับจีโนไทป์ NA1 ดังนั้นเป็นไปได้ว่าจีโนไทป์ NA1 นั้นอาจระบาดอยู่ในประเทศไทยมาตั้งแต่ปี 2007 จนถึงปัจจุบันนี้ สำหรับสาเหตุที่เกิดการจัดกลุ่มใหม่ของจีโนไทป์นั้นเนื่องมาจากจีโนไทป์ NA1 ไม่ได้ถูกรวมใน phylogenetic tree ของการศึกษาก่อนหน้านี้ สำหรับจีโนไทป์ ON1 ที่พบในการศึกษานี้เป็นจีโนไทป์ใหม่ที่เพิ่งถูกค้นพบไม่นานนี้ที่ประเทศแคนาดาในช่วงปี 2010-2011 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนไทป์นี้ในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีนมีความคล้ายคลึงกับจีโนไทป์ NA1 นอกจากนี้ลักษณะเด่นของจีโนไทป์นี้คือมีการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์เข้าไปถึง 72 bp ในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีนซึ่งถือเป็นการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมครั้งใหญ่ที่เกิดขึ้นกับ RSV-A หลังจากที่เคยเกิดขึ้นกับจีโนไทป์ BA ของ RSV-B มาแล้วในปี 1999 [56, 61] อย่างไรก็ตามยังไม่อาจทราบได้แน่ชัดว่าเมื่อเกิดกระบวนการ duplication หรือ insertion ของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนมากแล้ว antibody ยังคงสามารถทำปฏิกิริยากับ epitope ในบริเวณนี้ได้หรือไม่ ซึ่งหากมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประเด็นดังกล่าวไว้นี้อาจจะทำให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจีโนไทป์ ON1 มากขึ้นก็เป็นได้ ปัจจุบันมีการพบจีโนไทป์ ON1 เพียง 5 ประเทศ จาก 3 ทวีปเท่านั้น คือ ประเทศแคนาดา จากทวีปอเมริกาเหนือ แอฟริกาใต้ จากทวีปแอฟริกา ประเทศญี่ปุ่น ประเทศเกาหลีใต้ และประเทศไทย จากทวีปเอเชีย [56-58]

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของจีโนไทป์ NA1 และ ON1 จากการศึกษาเดียวกับ RSV-A สายพันธุ์ต้นแบบ strain A2 พบว่า จีโนไทป์ NA1 มีขนาดของกรดอะมิโน 298 อะมิโน ขณะที่ strain A2 มีขนาด 299 อะมิโน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากในกลุ่มจีโนไทป์ NA1 เกิดการ mutation จากกรดอะมิโนกลูตามีน (Q) ณ ตำแหน่ง 298 ไปเป็น stop codon สำหรับจีโนไทป์ ON1

มีขนาดของกรดอะมิโนถึง 322 เมื่อเทียบกับ strain A2 เนื่องมาจากมีการเพิ่มเข้ามาของนิวคลีโอไทด์ถึง 72 bp นั้นเอง นอกจากนี้การแทนที่ของกรดอะมิโนและตำแหน่งของ N-glycosylation ของจีโนไทป์ NA1 และ ON1 ที่เกิดขึ้นในการศึกษานี้ยังมีความคล้ายคลึงกับการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นและแคนาดาอีกด้วย [55, 56] และเมื่อเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ ON1 ในการศึกษานี้กับประเทศอื่นๆ พบว่าไม่ได้มีความแตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกรดอะมิโนไลซีน (K) ที่ตำแหน่ง 308 ที่พบเฉพาะตัวอย่างจากประเทศแอฟริกาได้เท่านั้น จนถึงปัจจุบันนี้ก็ยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่าจีโนไทป์ ON1 นั้นเคลื่อนย้ายจากอเมริกาเหนือมายังแอฟริกาหรือเอเชียได้อย่างไร แต่ในอนาคตหากมีการศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของจีโนไทป์นี้ในหลายประเทศก็อาจจะช่วยทำให้เกิดความกระจ่างต่อคำถามดังกล่าวก็เป็นได้

การศึกษาเกี่ยวกับจีโนไทป์ที่ระบาดในปี 2007 ของ RSV-B พบว่ามีเพียงจีโนไทป์ BA4 เท่านั้นที่ระบาดในช่วงระยะเวลาดังกล่าว [25] จีโนไทป์ BA หรือ Buenos Aires strain พบครั้งแรกในปี 1999 ลักษณะเด่นของจีโนไทป์นี้ คือ มีการเพิ่มเข้ามาของนิวคลีโอไทด์ถึง 60 bp ในบริเวณ second hypervariable region ของ G โปรตีน [61, 62] อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังคงมีการพบจีโนไทป์ BA4 อยู่ แต่พบเพียงแค่ตัวอย่างเดียวเท่านั้นในปี 2011 นอกจากนี้ BA4 แล้วในการศึกษานี้ยังพบ BA จีโนไทป์ใหม่ที่เพิ่งถูกค้นพบเมื่อไม่นานนี้ที่ประเทศญี่ปุ่น คือ BA9 และ BA10 อีกด้วย อย่างไรก็ตามค่า bootstrap ที่สนับสนุนการจัดกลุ่มกันของ BA9 และ BA10 มีค่าต่ำมาก สาเหตุอาจเนื่องมาจากเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดกลุ่มของจีโนไทป์ BA7-BA10 ซึ่งเป็นจีโนไทป์ใหม่ของการศึกษาก่อนหน้านี้สามารถรวมกลุ่มอยู่ด้วยกันได้โดยไม่จำเป็นต้องมีค่า bootstrap ที่สูง [63] จากเหตุผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีความสอดคล้องกันกับการศึกษานี้ โดยจีโนไทป์ BA9 และ BA10 จัดกลุ่มกันโดยมีค่า bootstrap ไม่สูงเช่นกัน อย่างไรก็ตามเกณฑ์การจัดกลุ่มเป็นจีโนไทป์ดังกล่าว [63] มีความแตกต่างจากเกณฑ์ที่ใช้โดย Venter [16] ดังนั้นจึงควรมีการจัดประชุมเพื่อหารือถึงเกณฑ์ในการจัดจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อ RSV เพื่อให้การศึกษาถึงสายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อได้ทดลองนำจีโนไทป์ BA4 จากการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้มาลองสร้าง phylogenetic tree พบว่าจีโนไทป์ดังกล่าวถูกจัดกลุ่มใหม่ โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับจีโนไทป์ BA10 ดังนั้นเป็นไปได้ว่าจีโนไทป์ BA10 นั้นอาจจะเริ่มระบาดอยู่ในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2007 ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับที่พบจีโนไทป์นี้ในประเทศญี่ปุ่น [63]

สำหรับสาเหตุที่เกิดการจัดกลุ่มใหม่ของจีโนไทป์นั้นเนื่องจากว่า BA จีโนไทป์ใหม่ (BA7-BA10) ไม่ได้ถูกรวมเข้าไปใน phylogenetic tree ของการศึกษาก่อนหน้านี้ [25] สิ่งที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งในการศึกษานี้คือการพบจีโนไทป์ใหม่ Thailand B strain หรือ THB (CU2010/5 และ CU2011/81) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ strain H5598 และ H5601 ที่พบในประเทศจีนในช่วงปี 2000-2004 [104] เมื่อตรวจสอบโดย BLAST analysis แต่ตัวอย่างดังกล่าวยังไม่ได้มีการระบุจีโนไทป์ในการศึกษานี้ ทั้ง strains CU2010/5, CU2011/81, H5598, และ H5601 ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันเป็นจีโนไทป์ใหม่ เนื่องจากมีค่า bootstrap และค่า *p*-distance ตรงตามเกณฑ์การเป็นจีโนไทป์ใหม่ของ Venter และคณะซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวยังคงถูกใช้อยู่จนถึงปัจจุบันนี้ [16] อย่างไรก็ตามการศึกษาต่อยอด เช่น การทำ whole genome ของ CU2010/5 และ CU2011/81 อาจจะช่วยสนับสนุนการค้นพบในครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของจีโนไทป์ THB กับสายพันธุ์ต้นแบบ strain CH18537 พบว่าจีโนไทป์ THB มีขนาดของกรดอะมิโนเท่ากับ 296 อะมิโน ในขณะที่สายพันธุ์ต้นแบบมีขนาด 293 อะมิโน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเกิดการ mutation ที่กรดอะมิโน ณ ตำแหน่ง 293 ของจีโนไทป์ THB จาก stop codon ไปเป็นกรดอะมิโนกลูตามีน (Q) ทำให้ขนาดอะมิโนยาวกว่าสายพันธุ์ต้นแบบเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ THB อยู่ถึง 7 ตัว คือ Ile²¹⁴, Ile²³⁹, Lys²⁴², Met²⁵¹, Asn²⁵⁸, Asp²⁷² และ Val²⁹⁵ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างในการศึกษานี้ และลำดับกรดอะมิโนของจีโนไทป์ทั้งหมด ในส่วนของจำนวนและตำแหน่งของ N-glycosylation ของจีโนไทป์ THB นั้นมีความเหมือนกันกับจีโนไทป์ GB2 (strain CH93-9b) ประกอบกับจีโนไทป์ THB นี้มีพันธุกรรมหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับจีโนไทป์ GB2 อีก จึงสันนิษฐานได้ว่าจีโนไทป์ THB น่าจะมีวิวัฒนาการมาจากจีโนไทป์ GB2

สำหรับจีโนไทป์ BA ทั้งหมดในการศึกษานี้ยกเว้นตัวอย่าง CU2011/205 มีความยาวของกรดอะมิโน 313 อะมิโน ขณะที่สายพันธุ์ต้นแบบ BA4128/99B มีความยาวกว่าเล็กน้อยคือ 316 อะมิโน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเกิด mutation ของกรดอะมิโนกลูตามีนกลายเป็น stop codon ที่ตำแหน่ง 313 ของจีโนไทป์ BA ของการศึกษานี้ ในทางตรงกันข้ามตัวอย่าง CU2011/205 ซึ่งจัดอยู่ในจีโนไทป์ BA9 มีขนาดของกรดอะมิโนมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ ในจีโนไทป์เดียวกันและสายพันธุ์ต้นแบบเล็กน้อยเนื่องจากมี mutation ในตำแหน่งที่ต่างจากสายพันธุ์ต้นแบบและตัวอย่างอื่นๆ ในกลุ่ม BA จีโนไทป์ สำหรับกรดอะมิโนที่จำเพาะและตำแหน่งของ N-glycosylation ของจีโนไทป์ BA9 และ

BA10 ในการศึกษาที่มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศญี่ปุ่น [63] และเวียดนาม [59] ยกเว้นกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 213 ของจีโนม BA10 มีการแทนที่จากไลซีน (K) ไปเป็นอะจินีน (R) ซึ่งไม่พบในประเทศญี่ปุ่นหรือเวียดนาม

โดยสรุปแล้วการศึกษานี้ได้รายงานถึงระบาดวิทยาของเชื้อ RSV และการพบจีโนมใหม่ของ RSV-A คือ ON1 รวมถึงจีโนมใหม่ของ RSV-B คือ THB นอกจากนี้ยังได้รายงานเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของจีโนมต่างๆ ที่พบในการศึกษานี้โดยหวังว่าความรู้เหล่านี้จะช่วยให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อ RSV ในประเทศไทยได้ดีขึ้น นอกจากนี้ปัจจุบันยังไม่มียารักษาผู้ป่วยหรือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีพอในการป้องกันการติดเชื้อ RSV ดังนั้นข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ RSV เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการศึกษาครั้งนี้ อาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนไวรัสและวัคซีน เช่น DNA วัคซีน สำหรับเชื้อชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

- [1] Karron, R. A. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. In S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, and P. A. Offit (eds.), Vacines, 5th edn., pp. 1283-1293. Philadelphia: Saunders-Elsevier. 2008.
- [2] Anderson, L. J., Parker, R. A., and Strikas, R. L. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract death of infants and young children. The Journal of Infectious diseases 161 (April 1990): 640-646.
- [3] Kapikian, A. Z., Bell, J. A., Mastrota, F. M., Johnson, K. M., Huebner, R. J., and Chanock, R. M. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. American Journal of Hygiene 74 (November 1961): 234-248.
- [4] Sterner, G., Wolontis, S., Bloth, B., and de Hevesy, G. Respiratory syncytial virus: An outbreak of acute respiratory illnesses in a home for infants. Acta Paediatrica Scandinavica 55 (May 1966): 273-279.
- [5] Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L., and Kasel, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. American Journal of Diseases of Children 140 (June 1986): 543-546.
- [6] Englund, J. A., Anderson, L. J., and Rhame, F. S. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. Journal of Clinical Microbiology 29 (January 1991): 115-119.
- [7] Mazzulli, T., Peret, T. C., McGeer, A., Cann, D., MacDonald, K. S., Chuar, R., Erdman, D. D., Anderson, L. J. Molecular characterization of a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus on an adult leukemia/lymphoma ward. The Journal of Infectious Diseases 180 (November 1999): 1686-1689.
- [8] Dowell, S. F., Anderson, L. J., Gary, H. E., Erdman, D. D., Plouffe, J. F., File, T. M., Marston, B. J., and Breiman, R. F. Respiratory syncytial virus is an important cause of

- community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. The Journal of Infectious Diseases 174 (September 1996): 456-462.
- [9] Han, L. L., Alexander, J. P., and Anderson, L. J. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. The Journal of Infectious Diseases 179 (January 1999): 25-30.
- [10] Falsey, A. R. Respiratory syncytial virus infection in older persons. Vaccine 16 (November 1998): 1775-1778.
- [11] Chang, J. Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine. BMB Reports 44 (April 2011): 232-237.
- [12] Anderson, L. J., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernie, B. F., Stone, Y., and McIntosh, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. The Journal of Infectious Diseases 151 (April 1985): 626-633.
- [13] Mufson, M. A., Örvell, C., Rafnar, B., and Norrby, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. The Journal of General Virology 66 (October 1985): 2111-2124.
- [14] Cristina, J., López, J. A., Albo, C., García-Barreno, B., García, J., Melero, J. A., and Portela, A. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. Virology 174 (January 1990): 126-134.
- [15] Peret, T. C., Hall, C. B., Schnabel, K. C., Golub, J. A., and Anderson, L. J. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. The Journal of General Virology 79 (September 1998): 2221-2229.
- [16] Venter, M., Madhi, S. A., Tiemessen, C. T. and Schoub, B. D. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: Identification of new subgroup A and B genotypes. The Journal of General Virology 82 (September 2001): 2117-2124.

- [17] Cane, P. A., and Pringle, C. R. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. Journal of Virology 69 (May 1995): 2918-2925.
- [18] Melero, J. A., Garcia-Barreno, B., Martinez, I., Pringle, C. R., and Cane, P. A. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. The Journal of General Virology 78 (October 1997): 2411-2418.
- [19] McCullers, J. A., Saito, T., and Iverson, A. R. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. Journal of Virology 78 (December 2004): 12817-12828.
- [20] Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W. M., and Palese, P. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. Virology 163 (March 1988): 112-122.
- [21] Siritantikorn, S., Puthavathana, P., Suwanjutha, S., Chantarojanasiri, T., Sunakorn, P., Ratanadilok Na Phuket, T., Nawanopparatsakul, S., Teeyapaiboonsilpa, P., Taveepvoradej, S., Pengmesri, J., and Pongpate, S. Acute viral lower respiratory infections in children in a rural community in Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand 85 (November 2002): 1167-1175.
- [22] Suwanjutha, S., Sunakorn, P., Chantarojanasiri, T., Siritantikorn, S., Nawanopparatkul, S., Rattanadilok Na Bhuket, T., Teeyapaiboonsilpa, P., Preutthipan, A., Sareebutr, W., and Puthavathana, P. Respiratory syncytial virus-associated lower respiratory tract infection in under-5-year-old children in a rural community of central Thailand, a population-based study. Journal of the Medical Association of Thailand 85 (November 2002): 1111-1119.
- [23] Fry, A. M., Chittaganpitch, M., Baggett, H. C., Peret, T. C., Dare, R. K., Sawatwong, P., Thamthitiwat, S., Areerat, P., Sanasuttipun, W., Fischer, J., Maloney, S. A., Erdman, D.

- D., and Olsen, S. J. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. PLoS One 5 (November 2010): e15098.
- [24] Samransamruajkit, R., Lekhanont, P., Sritippayawan, S., Prapphal, N., Deelodejanawong, J., Bhattarakosol, P., and Poovorawan, Y. The occurrence and clinical presentations of RSV subtype in acute bronchiolitis and viral pneumonia among hospitalized infants and young children. 11th Asian congress of Pediatrics (2003): 178-179.
- [25] Boonyasuppayakorn, S., Kowitdamrong, E., and Bhattarakosol, P. Molecular and demographic analysis of respiratory syncytial virus infection in patients admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand, 2007. Influenza and Other Respiratory Viruses 4 (September 2010): 313-323.
- [26] Morris, J. A., Blount, R. E. Jr., and Savage, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 92 (July 1956): 544-549.
- [27] Chanock, R. M., and Finberg, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. American Journal of Hygiene 66 (November 1957): 291-300.
- [28] Chanock, R. M., Kim, H. W., Vargosko, A. J., Deleva, A., Johnson, K. M., Cumming, C., and Parrott, R. H. Respiratory syncytial virus I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia and minor respiratory disease in children. The Journal of the American Medical Association 176 (May 1961): 647-653.
- [29] Chanock, R. M., Roizman, B., and Myers, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolate properties and characterization. American Journal of Hygiene 66 (November 1957): 281-290.
- [30] Afke Hélène Brandenburg. Respiratory syncytial virus infections in infants determinants of clinical severity. Doctoral dissertation, Department of Virology, Erasmus medical center, Erasmus University Rotterdam, 2000.

- [31] Wilmut, I., Katzir, E., and Rozenblatt, S. Syncytia-multinuclear cell, response to the expression of measles virus genes. [Online]. 2011. Available from: <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/rozenblatt/fig1.html>. [2013, February 15]
- [32] Collin, P. L., and Crowe, J. E. Paramyxovirus. In D. M. Knipe, and P. M. Howley, (eds.), Field's Virology, 5th edn., pp. 1601-1636. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins. 2007.
- [33] Hacking, D., and Hull, J. Respiratory syncytial virus-viral biology and the host response. The Journal of Infection 45 (July 2002):18-24.
- [34] Collins, P. L., and Graham, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. Journal of Virology 82 (March 2008): 2040-2055.
- [35] Collins, P. L., and Melero, J. A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. Virus Research 162 (December 2011): 80-99.
- [36] Bamford, C. So how does Respiratory Syncytial Virus infect your lungs? [Online]. 2012. Available from : <http://ruleofsix.fieldofscience.com/2012/04/respiratory-syncytial-virus-infection.html> [2013, March 3]
- [37] Huang, Y. T., Collins, P. L., and Wertz, G. W. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. Virus Research 2 (March 1985): 157-173.
- [38] Krempl, C., Murphy, B. R., and Collins, P. L. Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. Journal of Virology 76 (December 2002): 11931-11942.
- [39] Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124 (February 2006): 783-801.

- [40] Liu, P., Jamaluddin, M., Li, K., Garofalo, R. P., Casola, A., and Brasier, A. R. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. Journal of virology 81 (February 2007): 1401-1411.
- [41] Dupuy, L. C., Dobson, S., Bitko, V., and Barik, S. Casein Kinase 2-Mediated Phosphorylation of Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein P Is Essential for the Transcription Elongation Activity of the Viral Polymerase; Phosphorylation by Casein Kinase 1 Occurs Mainly at Ser²¹⁵ and Is without Effect. Journal of Virology 73 (October 1999): 8384-8392.
- [42] Teng, M. N., and Collins, P. L. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. Journal of Virology 72 (July 1998): 5707-5716.
- [43] Fearn, R., and Collins, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. Journal of Virology 73 (July 1999): 5852-5864.
- [44] Bermingham, A., and Collins, P. L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (September 1999): 11259-11264.
- [45] Liuzzi, M., Mason, S. W., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R. S., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y., Lagacé, L., Massariol, M. J., Dô, F., Whitehead, P., Lamarre, L., Scouten, E., Bordeleau, J., Landry, S., Rancourt, J., Fazal, G., and Simoneau, B. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. Journal of Virology 79 (October 2005): 13105-13115.

- [46] Brown, G., Aitken, J., Rixon, H. W., Sugrue, R. J. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells. The Journal of General Virology 83 (March 2002): 611-621.
- [47] Murata, Y. Respiratory syncytial virus vaccine development. Clinics in Laboratory Medicine 29 (December 2009): 725-739.
- [48] Johnson, P. R., Spriggs, M. K., Olmsted, R. A., and Collins, P. L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (August 1987): 5625-5629.
- [49] Cane, P. A., Matthews, D. A., and Pringle, C. R. Identification of variable domains of attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. The Journal of General Virology 72 (September 1991): 2091-2096.
- [50] Wertz, G. W., Collins, P. L., Huang, Y., Gruber, C., Levine, S., and Ball, L. A. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82 (June 1985): 4075-4079.
- [51] Cane, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. Reviews in Medical Virology 11 (March-April 2001): 103-116.
- [52] Coates, H. V., Alling, D. W., and Chanock, R. M. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. American Journal of Epidemiology 83 (March 1966): 299-313.
- [53] Hendry, R. M., Talis, A. L., Godfrey, E., Anderson, L. J., Fernie, B. F., and McIntosh, K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. The Journal of Infectious Diseases 153 (February 1986): 291-297.

- [54] Peret, T. C., Hall, C. B., Hammond, G. W., Piedra, P. A., Storch, G. A., Sullender, W. M., Tsou, C., and Anderson, L. J. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. The Journal of Infectious diseases 181 (June 2000): 1891-1896.
- [55] Shobugawa, Y., Saito, R., Sano, Y., Zaraket, H., Suzuki, Y., Kumaki, A., Dapat, I., Oguma, T., Yamaguchi, M., and Suzuki, H. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. Journal of Clinical Microbiology 47 (August 2009): 2475-2482.
- [56] Eshaghi, A., Duwuri, V. R., Lai, R., Nadarajah, J. T., Li, A., Patel, S. N., Low, D. E., and Gubbay, J. B. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. PLoS One 7 (March 2012): e32807.
- [57] Lee, W. J., Kim, Y. J., Kim, D. W., Lee, H. S., Lee, H. Y., and Kim, K. Complete genome sequence of human respiratory syncytial virus genotype A with a 72-nucleotide duplication in the attachment protein G gene. Journal of Virology 86 (December 2012): 13810-13811.
- [58] Valley-Omar, Z., Muloiwa, R., Hu, N. C., Eley, B., and Hsiao, N. Y. Novel respiratory syncytial virus subtype ON1 among children, Cape Town, South Africa, 2012. Emerging Infectious Diseases 19 (April 2013). DOI: 10.3201/eid1904.121465.
- [59] Arnott, A., Vong, S., Mardy, S., Chu, S., Naughtin, M., Sovann, L., Buecher, C., Beauté, J., Rith, S., Borand, L., Asgari, N., Frutos, R., Guillard, B., Touch, S., Deubel, V., and Buchy, P. A study of the genetic variability of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Cambodia reveals the existence of a new HRSV group B genotype. Journal of Clinical Microbiology 49 (October 2011): 3504-3513.
- [60] Blanc, A., Delfraro, A., Frabasile, S., and Arbiza, J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. Archives of Virology 150 (March 2005): 603-609.

- [61] Trento, A., Galiano, M., Videla, C., Carballal, G., García-Barreno, B., Merlero, J. A., and Palomo, C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. The Journal of General Virology 84 (November 2003): 3115-3120.
- [62] Trento, A., Viegas, M., Galiano, M., Videla, C., Caballal, G., Mistchenko, A. C., and Melero, J. A. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. Journal of Virology 80 (January 2006): 975-984.
- [63] Dapat, I. C., Shobugawa, Y., Sano, Y., Saito, R., Sasaki, A., Suzuki, Y., Kumaki, A., Zaraket, H., Dapat, C., Oguma, T., Yamaguchi, M., and Suzuki, H. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. Journal of Clinical Microbiology 48 (September 2010): 3423-3427.
- [64] Tristram, D. A., and Welliver, R. C. Respiratory syncytial virus. In S. S. Long, L. K. Pickering, and C. G. Prober (eds.), Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 2nd ed, pp 213-218. New York: Churchill Livingstone, 2003.
- [65] Hall, C. B., and McCharty, C. A. Respiratory syncytial virus. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (eds.), Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 5th ed. pp 1782-1801. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000.
- [66] Eiland, L. S. Respiratory syncytial virus: diagnosis, treatment and prevention. The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics 14 (April 2009): 75-85.
- [67] Kats, A. Anatomy of respiratory system [Online]. 2012. Available from: <http://fau.pearlashes.com/anatomy/Chapter%2036/Chapter%2036.htm> [2013, March 22]
- [68] Walsh, W. J. Can cystic fibrosis cause chronic bronchitis ? [Online]. 2013. Available from: <https://www.healthtap.com/#topics/bronchitis-upper-airway-infection-chronic-bronchitis> [2013, March 23]

- [69] American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. Pediatrics 118 (October 2006): 1774-1793.
- [70] Hall, C. B., Weinberg, G. A., Iwane, M. K., Blumkin, A. K., Edwards, K. M., Staat, M. A., Auinger, P., Griffin, M. R., Poehling, K. A., Erdman, D., Grijalva, C. G., Zhu, Y., and Szilagyi, P. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. The New England journal of medicine 360 (February 2009): 588-598.
- [71] Stein, R. T., Sherrill, D., Morgan, W. J., Holberg, C. J., Halonen, M., Taussing, L. M., Wright, A. L., and Martinez, F. D. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. Lancet 354 (August 1999): 541-545.
- [72] AllRefer Health. Pictures and Images [Online]. 2010. Available from : <http://health.allrefer.com/pictures-images/nasal-flaring.html> [2013, March 11]
- [73] Checchia, P. Identification and management of severe respiratory syncytial virus. American Journal of Health-System Pharmacy 65 (December 2008): 7-12.
- [74] Weisman, L. Populations at risk for developing respiratory syncytial virus and risk factors for respiratory syncytial virus severity: infants with predisposing conditions. The Pediatric Infectious Disease Journal 22 (February 2003): 33-37.
- [75] Kraupp, T. P., and Aberle, J. H. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. The Open Microbiology Journal 5 (December 2011): 128-134.
- [76] Heikkinen, T., Marttila, J., Salmi, A. A., and Ruuskanen, O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. Journal of Clinical Microbiology 40 (November 2002): 4337-4339.
- [77] Abu-Diab, A., Azzeh, M., Ghneim, R., Ghneim, R., Zoughbi, M., Turkuman, S., Rishmawi, N., Issa, A. E., Siriani, I., Dauodi, R., Kattan, R., and Hindiveh, M. Y. Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common

- respiratory viruses in samples from children. Journal of Clinical Microbiology 46 (July 2008): 2414-2417.
- [78] Sencare. Nasopharyngeal Flocked Swab [Online]. 2012. Available from :
http://www.sencare.com.tw/en_US/product/info.html?id=64478165B85868115F899B90DFFBD3BB [2013, March 11]
- [79] Johnston, S. L., and Siegel, C. S. Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. Journal of Clinical Microbiology 28 (November 1990): 2394-2397.
- [80] Smith, M. C., Creutz, C., and Huang, Y. T. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by shell vial technique. Journal of Clinical Microbiology 29 (March 1991): 463-465.
- [81] Pedneault, L., Robillard, L., and Turgeon, J. P. Validation of respiratory syncytial virus enzyme immunoassay and shell vial assay results. Journal of Clinical Microbiology 32 (November 1994): 2861-2864.
- [82] Ohm-Smith, M. J., Nassos, P. S., and Haller, B. L. Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus. Journal of Clinical Microbiology 42 (July 2004): 2996-2999.
- [83] Gregson, D., Lloyd, T., Buchan, S., and Church, D. Comparison of the RSV respi-strip with direct fluorescent-antigen detection for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in pediatric patients. Journal of Clinical Microbiology 43 (November 2005): 5782-5783.
- [84] Jonathan, N. Diagnostic utility of BINAX NOW RSV--an evaluation of the diagnostic performance of BINAX NOW RSV in comparison with cell culture and direct immunofluorescence. Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials 5 (June 2006):

- [85] Borek, A. P., Clemens, S. H., Gaskins, V. K., Aird, D. Z., and Valsamakis, A. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture. Journal of Clinical Microbiology 44 (March 2006): 1105-1107.
- [86] Englund, J. A., Piedra, P. A., Jewell, A., Patel, K., Baxter, B. B., and Whimbey, E. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. Journal of Clinical Microbiology 34 (July 1996): 1649-1653.
- [87] Texas Department of State Health Services. Enzyme Immunoassays (EIA) [Online]. 2010. Available from : http://www.dshs.state.tx.us/lab/serology_eia.shtm [2013, March 11]
- [88] Ieven, M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. Journal of Clinical Virology 40 (December 2007): 259-276.
- [89] Mahony, J. B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. Clinical Microbiology Reviews 21 (October 2008): 716-747.
- [90] Kehl, S. C., and Kumar, S. Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. Clinics in Laboratory Medicine 29 (December 2009): 661-671.
- [91] Kawasaki, E. S. Amplification of RNA. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (eds.), PCR protocols: a guide to methods and application, pp. 21-27. California: Academic Press, 1990.
- [92] Mullis, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262 (April 1990): 56-65.
- [93] St. Rosemary Educational Institution. PCR: Uses, Steps, Purpose [Online]. 2013. Available from : <http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/> [2013, March 11]
- [94] Freymuth, F., Eugene, G., Vabret, A., Petitjean, J., Gennetay, E., Brouard, J., Duhamel, J. F., and Guillois, B. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and

- hybridization with a DNA enzyme immunoassay. Journal of Clinical Microbiology 33 (December 1995): 3352-3355.
- [95] Tang, Y. W., Heimgartner, P. J., Tollefson, S. J., Berg, T. J., Rys, P. N., Li, H., Smith, T. F., Persing, D. H., and Wright, P. F. A colorimetric microtiter plate PCR system detects respiratory syncytial virus in nasal aspirates and discriminates subtypes A and B. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 34 (August 1999): 333-337.
- [96] Pavlova, S., Hadzhiolova, T., Abadjieva, P., and Kotseva, R. Application of RT-PCR for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections in Bulgaria, 2006-7 and 2007-8. Euro Surveillance 14 (June 2009): 1-5.
- [97] Hu, A., Colella, M., Tam, J. S., Rappaport, R., and Cheng, S. M. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology 41 (January 2003): 149-154.
- [98] Heid, C. A., Steven, J., Livak, K. J., Williams, P. M. Real time quantitative PCR. Genome research 6 (October 1996): 986-994.
- [99] Weisman, L. E. Motavizumab, a second-generation humanized mAb for the prevention of respiratory syncytial virus infection in high-risk populations. Current Opinion in Molecular Therapeutics 11 (April 2009): 208-218.
- [100] Meissner, H. C., and Long, S. S. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. Pediatrics 112 (December 2003): 1447-1452.
- [101] Product Information. Synagis (palivizumab) Gaithersburg, MD: MedImmune, October 2007.
- [102] Samransamruajkit, R., Hiranrat, T., Chieochansin, T., Sritippayawan, S., Deerojanawong, J., Prapphal, N., and Poovorawan, Y. Prevalence, clinical presentations and complications among hospitalized children with influenza pneumonia. Japanese Journal of Infectious diseases 61 (November 2008): 446-449.

- [103] Care group healthcare system. Nasopharyngeal aspiration vacuum-assisted method
[Online]. 2010. Available from:
http://portal.nebh.org/departments/pathology/lab_manual/PLM_specimen_nasoph.htm
[2013 , March 25]
- [104] Deng, J., Zhu, R., Quian, Y., Zhao, L., and Wang, F. Sequence analysis of G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subtype B strains isolated from children with acute respiratory infections in Beijing, China in years 2000-2004. Chinese Journal of Microbiology and Immunology 26 (January 2006): 1-5.
- [105] Sato, M., Saito, R., Sakai, T., Sano, Y., Nishikawa, M., Sasaki, A., Shobugawa, Y., Gejyo, F., and Suzuki, H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. Journal of Clinical Microbiology 43 (January 2005): 36-40.
- [106] Yoshida, L. M., Suzuki, M., Yamamoto, T., Nguyen, H. A., Nguyen, C. D., Nguyen, A. T., Oishi, K., Vu, T. D., Le, T. H., Le, M. Q., Yanai, H., Kilgore, P. E., Dang, D. A., and Ariyoshi, K. Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central vietnamese children. The pediatric Infectious Disease Journal 29 (January 2010): 75-77.
- [107] Climatological center. Annual weather summary of Thailand in 2011 [Online]. 2011.
Available from: [http://www.tmd.go.th/ programs% 5Cuploads% 5CyearlySummary% 5CAnnual 2011_up.pdf](http://www.tmd.go.th/programs%5Cuploads%5CyearlySummary%5CAnnual%202011_up.pdf) [2013, February 16]

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม phosphate buffered saline (PBS)

ตวง phosphate buffer saline สำเร็จรูปชนิดผงจำนวน 9.88 g จากนั้นเติมน้ำกลั่น (distilled water)จนมีปริมาตร 1,000 ml แล้วจึงนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ โดยการ autoclave

2. การเตรียม viral transport medium (VTM) สำหรับ 500 ml

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

เมื่อเตรียมสารต่างๆ ได้ตามปริมาณที่ต้องการแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตร 500 ml จากนั้นจึงนำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 µm ก่อนนำไปใช้

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัด RNA

- DEPC เป็นน้ำที่ไม่มีเอนไซม์ RNase เตรียมได้โดยเติม 0.1% DEPC ในน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave
- 95% Ethanol เตรียมโดยตวง absolute ethanol มา 95 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml
- Wash buffer สำหรับพร้อมใช้งาน เตรียมโดยเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ml ลงใน wash buffer ที่เตรียมมาให้ จากนั้นผสมให้เข้ากัน

4. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

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

■ Tris-base	54	g
■ Boric acid	27.5	g
■ 0.5 M EDTA	20	ml

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

2. การเตรียม 1x Tris borate buffer (1x TBE) ปริมาตร 1,000 ml เตรียมโดยดวง 5x TBE ปริมาตร 200 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 800 ml แล้วผสมให้เข้ากัน
3. การเตรียม 2% โดยมวลต่อปริมาตร (w/v) agarose gel เตรียมโดยดวงผง agarose ปริมาตร 4 g นำมาละลายใน 1x TBE buffer ปริมาตร 200 ml จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วจึงนำไปเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose จะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อละลายแล้วปล่อยให้เย็นลงครึ่งหนึ่งก่อนนำไปใช้
4. การเตรียม 10% ethidium bromide เตรียมโดยละลาย ethidium bromide 30 μ l ในน้ำกลั่น 300 ml

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV-A

Sample code	Age	Collection date	Genotype	Accession number
CU_C438	4 ปี	25-พ.ย.-09	NA1	KC342349
CU_C1109	2 ปี	1-ก.ย.-10	NA1	KC342350
CU_C1122	2 เดือน	1-ก.ย.-10	NA1	KC342351
CU_C1129	7 เดือน	1-ก.ย.-10	NA1	KC342352
CU_C1141	1 ปี	7-ก.ย.-10	NA1	KC342353
CU_C1158	1 ปี	7-ก.ย.-10	NA1	KC342354
CU_C1166	1 ปี	7-ก.ย.-10	NA1	KC342355
CU_C1170	3 ปี	15-ก.ย.-10	NA1	KC342356
CU_C1180	9 เดือน	15-ก.ย.-10	NA1	KC342357
CU_C1191	10 เดือน	15-ก.ย.-10	NA1	KC342358
CU_C1193	2 ปี	15-ก.ย.-10	NA1	KC342359
CU_C1199	6 เดือน	15-ก.ย.-10	NA1	KC342360
CU_C1204	3 ปี	21-ก.ย.-10	NA1	KC342361
CU_C1210	1 ปี	21-ก.ย.-10	NA1	KC342362
CU_C1227	1 ปี	28-ก.ย.-10	NA1	KC342363
CU_C1252	3 ปี	5-ต.ค.-10	NA1	KC342364
CU_C1258	2 ปี	5-ต.ค.-10	NA1	KC342365
CU_C1266	10 เดือน	5-ต.ค.-10	NA1	KC342366
CU_C1274	2 ปี	13-ต.ค.-10	NA1	KC342367
CU_C1284	1 ปี	13-ต.ค.-10	NA1	KC342368
CU_C1295	1 ปี	13-ต.ค.-10	NA1	KC342369
CU_C1338	1 ปี	28-ต.ค.-10	NA1	KC342370
CU_C1378	3 ปี	9-พ.ย.-10	NA1	KC342371
CU_C1403	7 เดือน	16-พ.ย.-10	NA1	KC342372
CU_C1486	5 เดือน	23-ธ.ค.-10	NA1	KC342373
CU_C1710	3 ปี	9-มี.ค.-11	NA1	KC342374
CU_C1712	2 ปี	9-มี.ค.-11	NA1	KC342375

Sample code	Age	Collection date	Genotype	Accession number
CU_C1713	1 ปี	9-มี.ค.-11	NA1	KC342376
CU_C1714	7 เดือน	9-มี.ค.-11	NA1	KC342377
CU_C1715	3 เดือน	9-มี.ค.-11	NA1	KC342378
CU_C1719	4 ปี	9-มี.ค.-11	NA1	KC342379
CU_C1720	3 ปี	9-มี.ค.-11	NA1	KC342380
CU_C1723	4 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342381
CU_C1724	5 เดือน	15-มี.ค.-11	NA1	KC342382
CU_C1725	1 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342383
CU_C1726	3 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342384
CU_C1727	2 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342385
CU_C1728	2 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342386
CU_C1729	3 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342387
CU_C1730	2 ปี	15-มี.ค.-11	NA1	KC342388
CU_C1909	2 เดือน	8-มี.ย.-11	NA1	KC342389
CU_C1926	5 ปี	8-มี.ย.-11	NA1	KC342390
CU_C2277	3 ปี	11-ต.ค.-11	NA1	KC342391
CU_C2286	1 ปี	20-ต.ค.-11	NA1	KC342392
CU_C2290	11 เดือน	20-ต.ค.-11	NA1	KC342393
CU2010/2	1 ปี	22-ก.ค.-10	NA1	KC342394
CU2010/7	12 ปี	28-ก.ค.-10	NA1	KC342395
CU2010/17	6 ปี	9-ส.ค.-10	NA1	KC342396
CU2010/21	5 ปี	11-ส.ค.-10	NA1	KC342397
CU2010/27	1 ปี	27-ส.ค.-10	NA1	KC342398
CU2010/28	8 เดือน	27-ส.ค.-10	NA1	KC342399
CU2010/30	2 เดือน	13-ก.ย.-10	NA1	KC342400
CU2011/64	2 เดือน	20-ก.ค.-11	NA1	KC342401
CU2011/67	1 ปี	21-ก.ค.-11	NA1	KC342402

Sample code	Age	Collection date	Genotype	Accession number
CU2011/69	5 ปี	25-ก.ค.-11	NA1	KC342403
CU2011/75	3 ปี	29-ก.ค.-11	NA1	KC342404
CU2011/89	10 เดือน	8-ส.ค.-11	NA1	KC342405
CU2011/91	2 ปี	11-ส.ค.-11	ON1	KC342406
CU2011/92	3 เดือน	11-ส.ค.-11	NA1	KC342407
CU2011/94	3 เดือน	11-ส.ค.-11	NA1	KC342408
CU2011/95	1 ปี	11-ส.ค.-11	NA1	KC342409
CU2011/107	16 วัน	17-ส.ค.-11	NA1	KC342410
CU2011/110	2 ปี	18-ส.ค.-11	NA1	KC342411
CU2011/111	3 เดือน	22-ส.ค.-11	NA1	KC342412
CU2011/112	4 เดือน	22-ส.ค.-11	ON1	KC342413
CU2011/116	1 ปี	22-ส.ค.-11	NA1	KC342414
CU2011/118	3 ปี	23-ส.ค.-11	ON1	KC342415
CU2011/119	1 เดือน	24-ส.ค.-11	NA1	KC342416
CU2011/126	1 ปี	29-ส.ค.-11	NA1	KC342417
CU2011/133	1 ปี	31-ส.ค.-11	NA1	KC342418
CU2011/140	3 ปี	5-ก.ย.-11	ON1	KC342419
CU2011/142	10 เดือน	6-ก.ย.-11	NA1	KC342420
CU2011/155	9 เดือน	14-ก.ย.-11	NA1	KC342421
CU2011/158	1 ปี	14-ก.ย.-11	NA1	KC342422
CU2011/160	1 ปี	14-ก.ย.-11	NA1	KC342423
CU2011/166	2 ปี	21-ก.ย.-11	NA1	KC342424
CU2011/170	2 ปี	23-ก.ย.-11	NA1	KC342425
CU2011/172	1 ปี	23-ก.ย.-11	NA1	KC342426
CU2011/174	2 ปี	26-ก.ย.-11	NA1	KC342427
CU2011/176	5 ปี	26-ก.ย.-11	NA1	KC342428
CU2011/178	2 ปี	26-ก.ย.-11	NA1	KC342429

Sample code	Age	Collection date	Genotype	Accession number
CU2011/179	2 ปี	27-ก.ย.-11	NA1	KC342430
CU2011/181	1 เดือน	3-ต.ค.-11	ON1	KC342431
CU2011/182	1 ปี	3-ต.ค.-11	NA1	KC342432
CU2011/187	1 ปี	4-ต.ค.-11	NA1	KC342433
CU2011/192	2 เดือน	7-ต.ค.-11	ON1	KC342434
CU2011/196	2 ปี	7-ต.ค.-11	NA1	KC342435
CU2011/200	2 ปี	13-ต.ค.-11	NA1	KC342436
CU2011/202	7 เดือน	13-ต.ค.-11	NA1	KC342437
CU2011/204	2 ปี	18-ต.ค.-11	NA1	KC342438
CU2011/206	1 ปี	20-ต.ค.-11	NA1	KC342439
CU2011/207	1 ปี	20-ต.ค.-11	ON1	KC342440
CU2011/208	2 ปี	20-ต.ค.-11	ON1	KC342441
CU2011/209	3 เดือน	20-ต.ค.-11	NA1	KC342442
CU2011/210	2 เดือน	20-ต.ค.-11	NA1	KC342443
CU2011/211	7 เดือน	21-ต.ค.-11	ON1	KC342444
CU2011/212	1 ปี	21-ต.ค.-11	NA1	KC342445
CU2011/216	1 ปี	26-ต.ค.-11	ON1	KC342446
CU2011/226	9 เดือน	9-พ.ย.-11	NA1	KC342447
CU2011/230	4 ปี	14-พ.ย.-11	NA1	KC342448
CU2011/232	3 ปี	17-พ.ย.-11	NA1	KC342449

ตารางแสดงรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RSV-B

Sample code	Age	Collection date	Genotype	Accession number
CU_C423	1 ปี	18-พ.ย.-09	BA9	KC342326
CU_C694	1 ปี	24-ก.พ.-10	BA10	KC342327
CU_C767	6 เดือน	24-มี.ค.-10	BA10	KC342328
CU_C1101	1 ปี	25-ส.ค.-10	BA10	KC342329
CU_C1123	3 ปี	1-ก.ย.-10	BA10	KC342330
CU_C1156	1 ปี	7-ก.ย.-10	BA10	KC342331
CU_C1182	1 ปี	15-ก.ย.-10	BA10	KC342332
CU_C1279	8 เดือน	13-ต.ค.-10	BA9	KC342333
CU2010/1	9 เดือน	22-ก.ค.-10	BA9	KC342334
CU2010/3	2 ปี	23-ก.ค.-10	BA9	KC342335
CU2010/5	2 ปี	28-ก.ค.-10	THB	KC342336
CU2010/13	1 ปี	3-ส.ค.-10	BA9	KC342337
CU2010/18	22 วัน	9-ส.ค.-10	BA9	KC342338
CU2010/29	1 ปี	13-ก.ย.-10	BA9	KC342339
CU2010/31	3 เดือน	19-ต.ค.-10	BA9	KC342340
CU2011/59	1 ปี	15-ก.ค.-11	BA9	KC342341
CU2011/60	3 ปี	15-ก.ค.-11	BA9	KC342342
CU2011/81	2 ปี	4-ส.ค.-11	THB	KC342343
CU2011/99	4 เดือน	15-ส.ค.-11	BA9	KC342344
CU2011/161	4 เดือน	16-ก.ย.-11	BA9	KC342345
CU2011/195	6 เดือน	7-ต.ค.-11	BA9	KC342346
CU2011/205	1 ปี	18-ต.ค.-11	BA9	KC342347
CU2011/215	1 เดือน	26-ต.ค.-11	BA4	KC342348

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร Archives of Virology โดยมีชื่อหัวข้อเรื่องคือ Molecular Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus, 2009-2011: Emergence of Subtype ON1 and Subgroup B Genotype in Thailand.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล วิชชวิษ อักษรกิตติ์ เพศ ชาย

อายุ 27 ปี เกิด 21 กุมภาพันธ์ 2529

สถานที่เกิด โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ที่อยู่ 69 ถนนประชาธาชัยบุรี ซอยประชาธาชัยบุรี 7 แขวงห้วยขวาง เขตห้วยขวาง จังหวัด

กรุงเทพมหานคร 10310

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2551
ระดับปริญญาโท	เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร วิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2553

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

ได้ส่งผลงานเพื่อพิจารณาการตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง: Molecular Characterization of Human

Respiratory Syncytial Virus, 2009-2011: Emergence of Subtype ON1 and Subgroup B Genotype in Thailand.