

ระบาดวิทยาและการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ Human Rhinovirus
ในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง



นางสาวปิยดา หลินศวนนท์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE AND GENOME CHARACTERIZATION OF HUMAN RHINOVIRUS IN THAI
PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION.



Miss Piyada Linsuwanon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ระบาดวิทยาและการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ
Human Rhinovirus ในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อระบบ
ทางเดินหายใจส่วนล่าง

โดย

นางสาวปิยดา หลินศุวนนท์

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

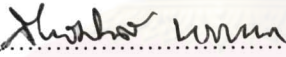
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


อาจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราคูสัย)

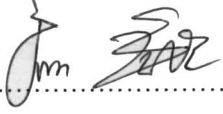
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)


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


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


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภัตต์ สำราญสำรวงกิจ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพร ชินชัย)

ปิยดา หลินศุวรรณท์ : ระบาดวิทยาและการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของ Human Rhinovirus ในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง. (PREVALENCE AND GENOME CHARACTERIZATION OF HUMAN RHINOVIRUS IN THAI PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อาจารย์ ดร. สัญชัย พยุภกร, 120 หน้า.

เชื้อโรโนไวรัสเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่พบได้ทั่วไป และเป็นเชื้อที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์มาก สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ HRV-A, HRV-B และ HRV-C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ และมีรายงานว่า การติดเชื้อ HRV-C ในระบบทางเดินหายใจอาจทำให้อาการของโรคมีความรุนแรงมากขึ้น และพัฒนาเป็นโรคเรื้อรังได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV ในประเทศไทย และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงชีวโมเลกุลของ HRV แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน ผลการศึกษาที่ได้พบว่าจากจำนวนตัวอย่าง NP suction ทั้งสิ้น 289 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 286 ราย ตรวจพบเชื้อโรโนไวรัส 87 ตัวอย่าง มีค่าความชุกเท่ากับ 30% และพบว่า 5 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 2 ราย มีการติดเชื้อ HRV ซ้ำซ้อน ร่วมกับเชื้อชนิดอื่น โดยจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด พบว่า HRV-C เป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดมากในประเทศไทย คิดเป็น 58% ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ติดไวรัสสายพันธุ์นี้แสดงอาการหลอดลมตีบ มากกว่าอาการอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นอาการเริ่มแรกของโรคหืด ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลในส่วน coding sequence ของ HRV พบว่า CU211 เป็น strain ที่พบ recombination ภายในส่วน structural gene และผลการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับ polyprotein ของ CU072 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างจาก strain อื่นๆ มาก สามารถสรุปได้ว่า CU072 จัดเป็น strain ใหม่ในสายพันธุ์ HRV-C และการเกิด recombination เป็นกระบวนการสำคัญต่อวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต..... ปิยดา หลินศุวรรณท์.....
ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... อ. ยง ภู่วรวรรณ.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... อ. ส. พยุภกร.....

5174791430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : Rhinovirus / Prevalence/ Lower Respiratory Tract Disease/ Genome Characterization

PIYADA LINSUWANON : PREVALENCE AND GENOME CHARACTERIZATION OF HUMAN RHINOVIRUS IN THAI PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION. THESIS ADVISOR : PROF YONG POOVORAWAN, M.D., THESIS CO-ADVISOR : SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D., 120 pp.

Human rhinovirus (HRV) is one of the most common agents causing ARTI. HRV are divided by molecular analysis into 3 species (A, B and recently C). Several studies showed the association between HRV and asthma exacerbation. However, the epidemiology of the novel identified HRV-C amongst Asian pediatric patients with ARTI and its ability to trigger asthma exacerbation has been limited. Based on amplification of VP4/2 by semi-nested PCR, 87 of 289 samples obtained from 286 hospitalized pediatric patients during 2006 and 2007 were positive for HRV indicating an annual prevalence of 30%. Most of all HRV positive specimens were belonged to HRV-C (58%) and showed seasonality pattern in fall and winter in Thailand ($p < 0.05$). Wheezing or asthma exacerbation was the most common clinical presentation. Co-infection between HRV and RSV had higher risk of wheezing and asthma than single infection. Comparative analysis of the complete coding sequence of the field strains suggested that CU211 showed apparent additional recombination event in structural region. Moreover, different in overall polyprotein defined CU072 as a novel HRV-C strain. This study clarifies the diversity and explains the recombination events could represent a driving force for the HRV evolution in their natural environment.

Field of Study : Medical Science

Academic Year : 2009

Student's Signature Piyada Linsuwanon

Advisor's Signature Yong Poovorawan

Co-Advisor's Signature Sunchai Payungporn

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการเข้าศึกษาระดับมหาบัณฑิต ในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัยเพียบพร้อม ได้ชี้แนะแนวความคิดของการเป็นนักวิจัยที่ดี พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาอันมีประโยชน์ และคุณค่ายิ่งต่องานวิจัยนี้มาโดยตลอด ตลอดจนให้ความกรุณา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สัตยชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ประสพวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญา มหาบัณฑิตในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยา คลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ ซึ่งมีค่า และประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก อีกทั้งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน รวมทั้ง แพทย์ประจำบ้าน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือเก็บรวบรวมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เหน็ดเหนื่อยเพื่อให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรัก และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฐ
สารบัญแผนภาพ.....	ฑ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
- คำถามงานวิจัย.....	2
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
- สมมติฐานของการวิจัย.....	3
- ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
- ขอบเขตของการวิจัย.....	5
- ข้อจำกัดของการวิจัย.....	6
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
- วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
- ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
- แนวคิดและทฤษฎี.....	8
- ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค PCR.....	10

- การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ DNA	11
- ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำ PCR.....	12
- เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
- อนุกรมวิธานของเชื้อ Human Rhinovirus.....	15
- ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Human Rhinovirus.....	15
- วงชีวิตของเชื้อ Human Rhinovirus.....	23
- ความแตกต่างของเชื้อ Human Rhinovirus และ Human Enterovirus.....	26
- การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Human Rhinovirus.....	28
- พยาธิกำเนิดและภูมิคุ้มกัน.....	31
- ลักษณะอาการทางคลินิกและการรักษา.....	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	40
- รูปแบบการวิจัย.....	40
- ประชากรศึกษา.....	40
- การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.....	41
- เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	42
- สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	43
- วิธีดำเนินการวิจัย.....	45
- การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	55
- การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	55
- การวิเคราะห์ข้อมูล.....	57
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	59
ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาระบาดวิทยาและการจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุล ของเชื้อ Human Rhinovirus ในประเทศไทย.....	59
- เทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ HRV ด้วยวิธี Semi-nested PCR.....	59
- การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของยีน VP4 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis	62

- การระบาดของเชื้อ Human Rhinovirus และความสัมพันธ์กับฤดูกาล.....	64
- อาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ Human Rhinovirus ในทางเดินหายใจ....	65
ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาข้อมูล coding sequence ของเชื้อ Human Rhinovirus....	71
- การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ Human Rhinovirus ด้วยวิธี Phylogenetic analysis.....	71
- ลักษณะทั่วไปของ complete coding sequence ของเชื้อ Human Rhinovirus	74
- ผลการวิเคราะห์ค่า %GC content.....	78
- ผลการวิเคราะห์ conserved motif และ functional domain ใน polyprotein ของเชื้อ Human Rhinovirus.....	80
- ผลการทำนาย conserved motif และ functional domain บนโปรตีน VP1.....	81
- ลักษณะทั่วไปของโปรตีน VP1.....	81
- ชนิดของ Receptor ที่ไวรัสใช้ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....	87
- ผลการทำนายการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส.....	90
- ผลการวิเคราะห์โอกาสในการเกิด Recombination ของ Human Rhinovirus...	93
- ผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการของเชื้อ CU072 เปรียบเทียบกับ N4 โดยพิจารณาผลการเปลี่ยนแปลงในโปรตีนส่วนต่างๆ.....	93
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	99
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก.....	113
ภาคผนวก ก.....	114
ภาคผนวก ข.....	116
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	120

สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Rhinovirus เปรียบเทียบกับ Enterovirus.....	26
2	สรุปชนิดของยาด้านเชื้อไวรัส HRV.....	39
3	ปริมาณของสารต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ PCR.....	47
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีน GAPDH และสารพันธุกรรมของเชื้อ HRV (5'UTR/ VP2).....	47
5	สภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR ของ GAPDH และ semi-nested PCR.....	48
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DNA sequencing ของ HRV-A	53
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DNA sequencing ของ HRV-C	53
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DNA sequencing ของ HRV-B	54
9	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR.....	54
10	สรุปผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Human Rhinovirus ในกลุ่มประชากรศึกษา.....	66
11	ลักษณะอาการทางคลินิกที่ตรวจพบในผู้ป่วยติดเชื้อ HRV.....	67
12	ผลการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วย 2 รายที่พบว่าติดเชื้อ HRV ซ้ำซ้อน.....	69
13	ลักษณะทั่วไปของ coding sequence และขนาด viral protein ของเชื้อ HRV...	75
14	ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณตัดจำเพาะระหว่างโปรตีนแต่ละชนิด.....	77
15	ผลการวิเคราะห์ค่า %amino acid sequence identity ของ CU072.....	78
16	ลักษณะทั่วไปของ conserve motif ของ HRV-A และ B เทียบกับ HRV-C.....	86
17	ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญบนโปรตีน capsid VP1 และส่วนปลาย C ของโปรตีน capsid VP3 ของ HRV แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งใช้ในการจับกับ ICAM-I receptor...	88
18	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนใน drug binding pocket ทั้ง 25 residue ของเชื้อ HRV-A และ B.....	92
19	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CU072-Jul06 และ N4 ในส่วน viral protein.....	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนของการทำ PCR.....	10
2	หลักการในการทำ Nested PCR และ Semi-nested PCR.....	15
3	จีโนมของ HRV ซึ่งมี 1 ORF ขนาบด้วย 5'UTR และ 3'UTR.....	16
4	โครงสร้างทุติยภูมิของ IRES ทั้งสองชนิดของ picornavirus.....	17
5	ลักษณะโปรตีน capsid ของ HRV-QPM (EF186077)	19
6	การจัดเรียงตัวของโปรตีน capsid VP1-3 บนผิวหน้าของอนุภาคไวรัส HRV.....	20
7	ตัวอย่างยาด้านไวรัสที่มีฤทธิ์ต่อโปรตีน capsid.....	21
8	การเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของเชื้อ HRV.....	23
9	กระบวนการ translation และ co-translational cleavage ของ HRV.....	24
10	กระบวนการ replication ของเชื้อ HRV ในเซลล์เจ้าบ้าน.....	25
11	ผลการทำ immunohistochemistry เพื่อศึกษา cytopathic effect ในเซลล์ แต่ละชนิดซึ่งติดเชื้อ HRV.....	27
12	ภาพจำลองโครงสร้างของ ICAM-1receptor.....	28
13	จำลองกระบวนการ decapsidation ของเชื้อไวรัส HRV กลุ่มหลัก.....	29
14	ภาพจำลองโครงสร้างของ VLDL receptor.....	29
15	การตอบสนองของเซลล์เยื่อต่อการติดเชื้อ HRV.....	33
16	การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HRV.....	36
17	ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR.....	48
18	ผลการวิเคราะห์หาความไวของวิธี semi-nested PCR.....	61
19	ตัวอย่างผลการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหาเชื้อ HRV ด้วย วิธี semi-nested PCR.....	61
20	Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ HRV.....	63
21	Phylogenetic tree ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ HRV ซ้ำซ้อนทั้ง 5 ตัวอย่าง.....	68

22	phylogenetic analysis เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV โดยใช้ข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ polyprotein.....	73
23	ผลการเปรียบเทียบค่า %sequence identity ของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ จากการแปลรหัสพันธุกรรมของเชื้อ HRV ในการศึกษาวิจัยนี้.....	75
24	ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย %GC content ของ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์และ HEV....	79
25	ผลการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีน 3B.....	81
26	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนซึ่งได้จากการแปลรหัสยีน VP1.....	83
27	ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณส่วนปลาย N ของโปรตีน capsid VP3 และ capsid VP1 ที่สำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคไวรัส HRV กับ ICAM-1.....	89
28	ผลการทำ Bootstrap plot เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ CU072-Jul06 และ CU211-Sep06 กับ serotype อื่น.....	96
29	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ viral protein ของ เชื้อ HRV ในตัวอย่างที่ทำการศึกษา.....	97

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อ HRV ต่อฤดูกาลในช่วงระยะเวลาที่ ทำการศึกษา.....	64



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
1	ขอบเขตของการวิจัย.....	5
2	การตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อ HRV.....	37



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
aa	Amino Acid
Ab	Antibody
ANOVA	Analysis of Variance Program
ARTI	Acute Respiratory Tract Infection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base Pair
CAP3	DNA Sequence Assembly Program
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethidium Bromide
HAdV	Human Adenovirus
HBoV	Human Bocavirus
HEV	Human Enterovirus
hMPV	Human Metapneumovirus
HPIV	Human Parainfluenza Virus
HRV	Human Rhinovirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus
IFAV	Influenza Virus Type A
IFBV	Influenza Virus Type B
IL	Interleukin

คำย่อ	ความหมาย
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Milliliter (10^{-3} L)
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
μ l	Microliter (10^{-6} L)
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NP suction	Nasopharyngeal Suction
nt	Nucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
P -value (<i>p</i>)	Probability Value
RAD	Reactive Airway Disease
RDP	Recombination Detection Program
RNA	Ribonucleic Acid
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
Sequin	DNA Sequence Submission and Update Tool
SimPlot	Similarity Plot
T _m	Melting Temperature
TNF	Tumor Necrosis Factor
UTR	Untranslated Region
VP	Viral Capsid Protein

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจ (acute respiratory tract infection) นับเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยรวมถึงการเสียชีวิตในเด็กเล็ก โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ผลของการติดเชื้ออาจทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการทั้งอย่างเฉียบพลัน และอาจพัฒนาเป็นโรคเรื้อรังได้ ทำให้ต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยเหล่านี้เป็นจำนวนมาก และส่งผลกระทบต่อการพัฒนาทั้งทางด้านสังคม สาธารณสุข รวมทั้งด้านอื่นๆ ด้วย

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ มีสาเหตุจากจุลชีพหลายชนิด แต่ที่ พบได้บ่อยมักมีสาเหตุ มาจาก การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เชื้อไวรัสที่ ก่อโรค ในระบบทางเดินหายใจ (respiratory virus) มีอยู่ประมาณ 200 ชนิด ส่วนมากมักเป็นเชื้อที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ทำให้เชื้อเหล่านี้มีอัตราการกลายพันธุ์สูง (high mutation rate) ได้แก่ respiratory syncytial virus (RSV)^[1], human parainfluenza virus (HPIV)^[2], influenza virus type A (IFVA)^[2], influenza virus type B (IFVB)^[2], human metapneumovirus (hMPV)^[3], human adenovirus (HAdV)^[4], coronavirus^[5] และ human enterovirus (HEV)^[6] เป็นต้น และพบว่ากว่าร้อยละ 50 ของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ มีสาเหตุจากการติดเชื้อ human rhinovirus (HRV)^[6] แต่อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสแต่ละชนิดนั้น ทำให้เกิดอาการได้หลายรูปแบบแตกต่างกัน หรือลักษณะอาการแบบหนึ่งอาจเกิดได้จากการติดเชื้อไวรัสหลายชนิดร่วมกัน

Human Rhinovirus (HRV) เป็นเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ โดยมีบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญ ทั้งในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้มีอาการของโรค ไม่รุนแรง ไปจนถึงมีการพัฒนาเป็นโรค ระบบทางเดินหายใจเรื้อรังได้ ทั้งนี้ขึ้นกับบริเวณที่ติดเชื้อและปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย การติดเชื้อ HRV เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยได้ในผู้ป่วยทุกช่วงอายุ แต่พบ อุบัติการณ์ค่อนข้างสูง ในเด็กปฐมวัย และมักพบร่วมกับการติดเชื้อไวรัสทางเดินหายใจชนิดอื่น ส่งผลให้เกิดอาการที่รุนแรงขึ้น อีกทั้งมีลักษณะที่แตกต่างกันไป ดังนั้นการพิจารณาลักษณะอาการของผู้ป่วยเพียงอย่างเดียว จึง ไม่สามารถระบุอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ HRV หรือเชื้อชนิดอื่นๆ อย่างแท้จริงได้

การรักษาการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ในปัจจุบันใช้ยาต้านไวรัสซึ่งออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสในตระกูล *Picornaviridae* ยาที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ยา pleconaril ซึ่งสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ^[7-8] แต่เดิมเชื้อ HRV ถูกจัดจำแนกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ A (HRV-A) และสายพันธุ์ (HRV-B) โดยพบว่า HRV-A มักจะไม่ต้านทานต่อยา pleconaril ในขณะที่ HRV-B บาง serotype กลับต้านทานต่อยาชนิดนี้^[9] ได้แก่ serotype 4, 5, 42, 84, 93, 97 และ 99 ต่อมาในปี 2006 ได้มีการรายงานการค้นพบเชื้อ HRV สายพันธุ์ใหม่คือ HRV-C^[5,10-12] ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกันระหว่าง HRV-A และ HRV-B นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับอนุชีวโมเลกุลของจีโนมของไวรัสพบว่า เชื้อ HRV-C น่าจะมีแนวโน้มต้านทานต่อยา pleconaril ด้วย แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ (species) หรือชนิด (strain) ของไวรัสมีผลต่อการตอบสนองต่อยา และการวางแผนการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชนิดนี้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส HRV ในกลุ่มตัวอย่างของประชากรเด็กไทย ด้วยวิธี semi-nested PCR และนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HRV มาถอดรหัสสารพันธุกรรม เพื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง อีกทั้งศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุล รวมถึงสามารถนำข้อมูลที่ได้รับมาทำนายแนวโน้มการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ต่อไป

คำถามงานวิจัย

1. ระบาดวิทยาของเชื้อ HRV มีค่าเท่าใด มีความสัมพันธ์กับฤดูกาลหรือไม่
2. สายพันธุ์ของเชื้อ HRV ที่ระบาดในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ใด มีความใกล้เคียงกับที่ระบาดในต่างประเทศหรือไม่ และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างไร
3. อาการของผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ HRV นั้น มีลักษณะอาการอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส HRV ในกลุ่มผู้ป่วยเด็กไทยที่มีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. จำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัส HRV ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย วิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างระดับโมเลกุลระหว่างสายพันธุ์ของ HRV ที่ได้ และนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากประเทศต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI
3. วิเคราะห์ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัส HRV เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจต่อไป

สมมติฐานของการวิจัย

1. ถ้าพบการติดเชื้อไวรัส HRV ในกลุ่มตัวอย่างแล้ว จะสามารถศึกษาระบาดวิทยา อัตราการก่อโรคที่เกิดขึ้นได้
2. ถ้าสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน VP4/ VP2 ได้แล้ว จะสามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV และถ้าสามารถหาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ได้แล้ว จะสามารถทำนายแนวโน้มในการต้านทานต่อยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อชนิดนี้ได้
3. ถ้าหากพบการติดเชื้อไวรัส HRV ในผู้ป่วยโดยไม่มีอาการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วยแล้ว จะสามารถทำนายลักษณะอาการที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อโดยตรงได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนการรักษาต่อไป

ข้อตกลงเบื้องต้น : ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Species คือ สายพันธุ์ของเชื้อ HRV ซึ่งจำแนกโดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี serology test (antigen-antibody specific test) ไวรัสแต่ละชนิดที่ถูกจำแนกว่ามีความแตกต่างกันจะถูกแบ่งออกเป็น serotype สำหรับเชื้อ HRV ประกอบด้วยไวรัส 100 serotype แต่ในปัจจุบันนิยมใช้การถอดรหัสพันธุกรรมของยีนสร้างโปรตีน capsid เช่น VP4, VP4/VP2 หรือ VP1 แล้วนำข้อมูลไป

ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับให้ผลที่น่าเชื่อถือ และสะดวกกว่าวิธี serology test

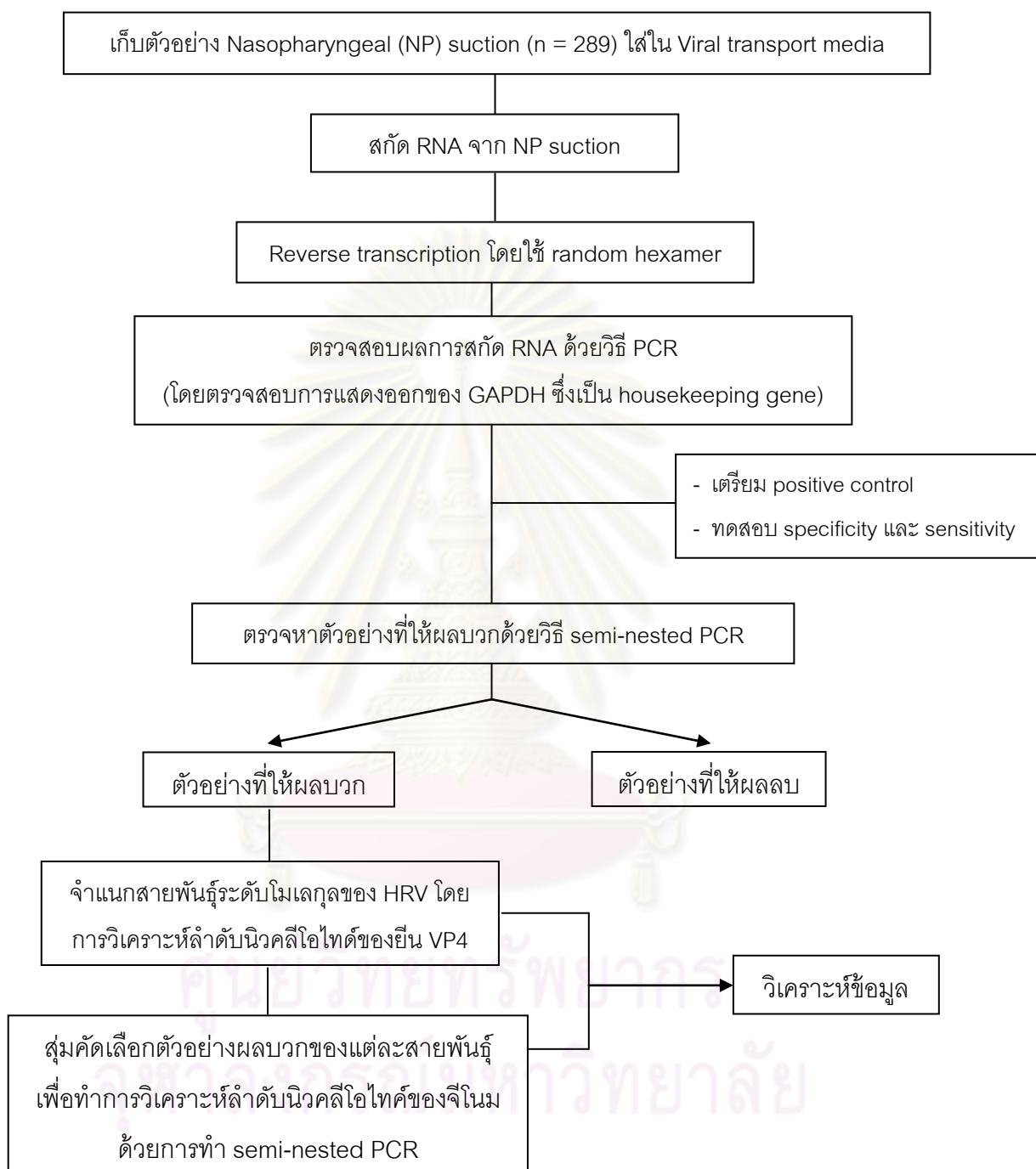
Strain คือ HRV ซึ่งจัดอยู่ใน species เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์หรือมีลำดับกรดอะมิโนในบางตำแหน่งบนจีโนมต่างกัน ส่งผลให้การทำ phylogenetic analysis แสดงรูปแบบการจัดกลุ่มย่อยที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตต่าง strain แต่เป็น species เดียวกันนั้น กำหนดให้มีค่า %nucleotide identity ตั้งแต่ 80% ขึ้นไป

Phylogenetic analysis คือ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต ตามลำดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ชนิดนั้นๆ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการขึ้นด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ phylogenetic relation ข้อมูลที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์สามารถเลือกใช้ได้หลายระดับ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา เช่น ใช้ข้อมูลที่มีความแตกต่างกันมาก เมื่อต้องการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างตระกูล (family) กัน, ใช้ข้อมูลที่มีความหลากหลายปานกลาง ในการจำแนกข้อมูลของสิ่งมีชีวิตระหว่างสายพันธุ์ (genus, species) หรือใช้ข้อมูลที่มีความหลากหลายน้อยเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์เดียวกัน เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับข้อมูลอ้างอิงของการวิเคราะห์ ซึ่งผู้ใช้โปรแกรมสามารถกำหนดได้

Semi-nested PCR คือ เทคนิคการทำ PCR ที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค nested PCR โดยใช้จำนวนคู่ไพรเมอร์น้อยกว่า แต่ยังคงให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ และให้ค่าความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ที่สูงกว่าการใช้เทคนิค PCR ธรรมดา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบเขตของการวิจัย



แผนภาพที่ 1 ขอบเขตของการวิจัย

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. เนื่องจากสารตัวอย่างมีปริมาณจำกัดจึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำ หรือไม่สามารถทำการทดลองเพิ่มเติมในบางส่วนของงานที่ต้องการศึกษาได้
2. เนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ จึงไม่มีการเก็บตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกลุ่มคนปกติ หรือกลุ่มคนที่ติดเชื้อไวรัส HRV และแสดงอาการของโรคไม่รุนแรง (normal healthy control) เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบผลความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบระบาดวิทยาและอัตราการก่อโรคของเชื้อ HRV ในประเทศไทย
2. ได้ทราบถึงข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HRV-C ซึ่งเป็นสายพันธุ์อุบัติใหม่และมีข้อมูลที่รายงานในฐานข้อมูลอย่างจำกัด
3. ทำให้สามารถทำนายแนวโน้มการติดต่อยาด้านไวรัสที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการวางแผนป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ต่อไปได้
4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้กับการศึกษาโรคไวรัสอุบัติใหม่ที่อาจจะเกิดขึ้นต่อไปในอนาคต
5. สามารถนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติ หรือตีพิมพ์ผลงานในวารสารที่เกี่ยวข้องกับด้านไวรัสวิทยา หรือโรคอุบัติใหม่ เช่น Virus Research, Journal of Infection หรือ Emerging Infectious Diseases
6. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะถูกเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทำการเก็บตัวอย่าง Nasopharyngeal (NP) suction จากผู้ป่วยใส่ลงใน viral transport media และเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C
2. สกัด RNA จากตัวอย่าง NP suction ด้วยวิธี guanidium-isothiocyanate
3. การศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส HRV ในประเทศไทย

- 3.1 ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HRV ในส่วนยื่นควบคุมการสร้าง viral capsid VP4 ด้วยวิธี semi-nested PCR
- 3.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ และเตรียม positive control ด้วยวิธี cloning
- 3.3 คำนวณค่าความไว (sensitivity) ของการตรวจวิเคราะห์
- 3.4 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยื่น VP4 ด้วยวิธี direct DNA sequencing
- 3.5 จัดจำแนกสายพันธุ์โดยการนำ phylogenetic tree และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้
4. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ HRV ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่าง
 - 4.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์
 - 4.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ semi-nested PCR เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. คำนวณระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส HRV จากตัวอย่าง NP suction ในกลุ่มประชากรศึกษาตั้งแต่ปี 2006-2007 เพื่อศึกษาอัตราการก่อโรค วิเคราะห์ลักษณะอาการและความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสกับการเกิดก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในส่วนยื่น VP4 ของเชื้อ HRV สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน เพื่อวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศกับในต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทำนายแนวโน้มการระบาดของเชื้อไวรัส HRV ได้
3. วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ จีโนมของเชื้อไวรัส HRV ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล
4. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในส่วน VP1 เพื่อทำนายชนิดของ receptor ที่ HRV ใช้ในการจับกับเซลล์เจ้าบ้าน โดยมุ่งเน้นที่ เชื้อไวรัส HRV-C ซึ่งเป็นสายพันธุ์อุบัติใหม่ พร้อมทั้งทำนายแนวโน้มของ การตอบสนองต่อยาต้านไวรัส (antiviral drug susceptibility) ที่ศึกษาอยู่ในปัจจุบัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

Human Rhinovirus (HRV) เป็นเชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ จากรายงานการศึกษาระบาดวิทยาในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก พบว่าอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในผู้ป่วยเด็กเล็กมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 40-50 ของโรคติดเชื้อในระบบหายใจทั้งหมด และมีแนวโน้มของอุบัติการณ์เพิ่มสูงขึ้นทุกปี เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายผ่านทางอากาศในอากาศที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ หรือจากการสัมผัสสารคัดหลั่งของผู้ติดเชื้อโดยตรง จากการศึกษาบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ HRV พบว่า ciliated columnar epithelial cell ในเยื่อบุทางเดินหายใจ ได้แก่ โพรซจุมุกและโพรซไซนัส เป็นบริเวณที่เป้าหมายของเชื้อไวรัส เนื่องจากมี receptor จำเพาะต่อเชื้อ HRV อยู่บนผิวเซลล์ เชื้อ HRV สามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract) นับตั้งแต่โพรซจุมุก (nasal cavity), คอหอย (pharynx) ไปจนถึงกล่องเสียง (larynx) และทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory tract) ตั้งแต่หลอดลม (trachea), หลอดลมใหญ่ (bronchus), หลอดลมฝอย (bronchiole), ปอด (lung) และถุงลม (alveoli) เมื่อเซลล์เยื่อบุติดเชื้อไวรัส จะส่งผลให้เซลล์ตายและหลุดลอกออกมา ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเจ็บคอ และมีอาการอักเสบร่วมด้วย ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HRV แสดงลักษณะอาการได้หลากหลาย และมีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไปขึ้นกับบริเวณที่ติดเชื้อ โรคที่ตรวจพบมีตั้งแต่โรคที่มีความรุนแรงไม่มาก ร่างกายสามารถกำจัดเชื้อเองได้ เช่น ไข้หวัดธรรมดา (common cold)^[13] ตลอดจนโรคที่มีความรุนแรงปานกลางจนถึงเรื้อรัง เช่น ไซนัสอักเสบ (sinusitis)^[14], หูชั้นกลางอักเสบ (acute otitis media)^[15], ปอดบวม (pneumonia)^[16], หลอดลมอักเสบ (bronchiolitis)^[13], หายใจขัดและมีเสียงวี๊ด (wheezing)^[17-18] และหอบหืด (asthma)^[19-21] เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งในระบบทางเดินหายใจ มัก มีโอกาสตรวจพบการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย โดยเชื้อไวรัสที่ มีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HRV ได้แก่ RSV, IFAV, IFBV หรือ HPIV เป็นต้น ซึ่งอาจจะส่งผลให้อาการของโรคมีความรุนแรงมากขึ้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจวิเคราะห์หาสาเหตุของการติดเชื้อ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดนั้นๆ อีกทั้งเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาอุบัติการณ์ของโรคทางเดินหายใจที่มีสาเหตุ

จากการติดเชื้อไวรัส และเพื่อ ศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดที่มีการระบาดในแต่ละภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก

การตรวจวินิจฉัยและการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV ในตัวอย่างที่เก็บได้จากผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจ นั้นสามารถทำได้หลายวิธี แต่เดิม การจัดจำแนกสายพันธุ์ ใช้วิธีทาง serology โดยนำตัวอย่าง nasopharyngeal suction หรือ nasal swab มาสกัดไวรัสและทำการ inoculate ลงในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ (bronchial epithelial cell line) ตรวจหาการติดเชื้อของ HRV เบื้องต้น โดยพิจารณาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ (cytopathic effect : CPE) จากนั้นจึงทำการจำแนกชนิดของ HRV ด้วยการทำ neutralization reaction ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยความจำเพาะของ antibody ที่ได้มาจาก homologous antiserum ต่อ antigen บนอนุภาคไวรัส ผลจากการจำแนกด้วยวิธีการนี้ทำให้สามารถแบ่ง HRV ได้เป็น 100 serotype เรียงตามลำดับจาก serotype 1-100

ในปัจจุบันวิธีที่ห้องปฏิบัติการทั่วไปนิยมใช้ คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยตรงด้วยเทคนิค polymerase chain reaction หรือ PCR โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายปริมาณยีนดังกล่าว ในสิ่งส่งตรวจ ด้วยการเลียนแบบกระบวนการ DNA replication ของเซลล์ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ต้นแบบได้เป็นจำนวนมากกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยใช้ระยะเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ก็สามารถตรวจสอบสาร DNA ที่สนใจได้ ทำให้ทราบผลการตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิม (cell culture) อีกทั้งเทคนิค PCR ยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะ และมีความไวสูง ผลที่ได้จากการตรวจ จสอบด้วยวิธีนี้จึงมีความน่าเชื่อถือมาก เทคนิค PCR จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านการตรวจวินิจฉัยโรค , การตรวจหาเชื้อก่อโรค ในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา และการศึกษาวิจัยในสาขาอื่นๆ อีกมากมาย

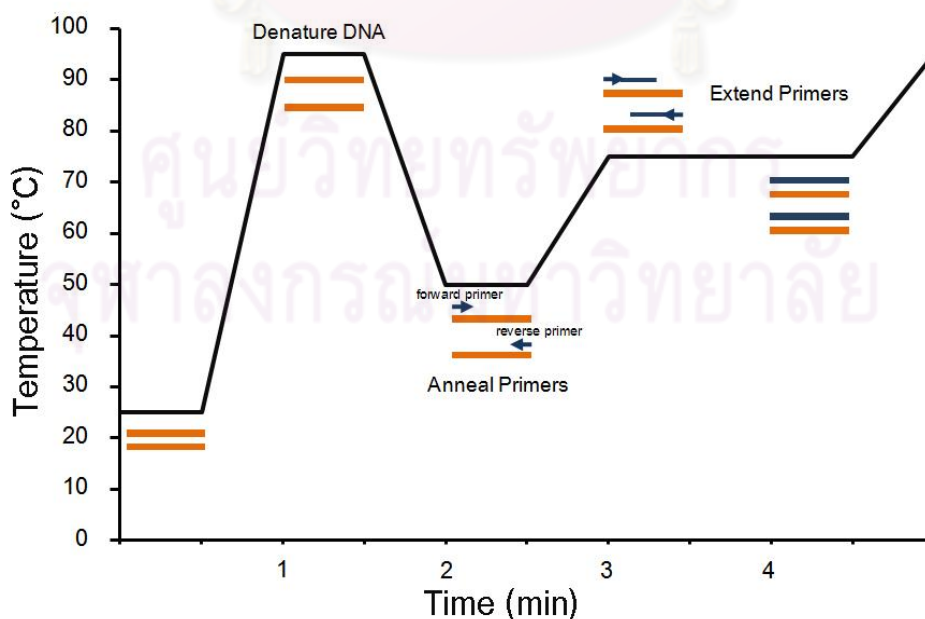
เทคนิค PCR ถูกพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1983 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Kary Mullis และคณะ ภายใต้การควบคุมของ บริษัท Cetus Corporation แต่เดิมการทำ *In vitro* enzymatic gene amplification นั้นถูกจำกัดด้วยประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase แต่เมื่อ Kary Mullis สามารถสกัดแยกเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จาก *Thermus Aquaticuse* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบบริเวณบ่อน้ำพุร้อน ได้ นับแต่นั้นมาเทคนิค PCR จึงได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็วและได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเด่น คือ ทนความร้อน

สูงได้ดี (thermostable DNA polymerase) และไม่สูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอนการแยกสาย DNA ต้นแบบ (denaturation)

จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยความจำเพาะนี้ ผู้ปฏิบัติการสามารถควบคุมได้ด้วยการออกแบบ นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (primer) ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมที่ต้องการตรวจวิเคราะห์

ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค PCR

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่จำลองหลักการทำงานให้คล้ายกระบวนการ replication ของเซลล์ โดยอาศัย DNA ต้นแบบ (DNA template) และการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อช่วยต่อขยาย DNA สายที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ให้ยาวออกไป โดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สม (complementary) กับสาย DNA ต้นแบบ ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณ DNA ประกอบด้วย DNA template, deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด, thermostable DNA polymerase, oligonucleotide primer อย่างน้อยหนึ่งคู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณสารพันธุกรรมจะเพิ่มขึ้นได้ต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องกันหลายๆ รอบ ซึ่งในแต่ละรอบของการทำ PCR ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 1 ขั้นตอนของการทำ PCR

ขั้นตอนที่ 1 : Denaturation เป็นขั้นตอนของการแยกสาย DNA ต้นแบบซึ่งเป็นสายคู่ ออกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95°C ถ้าหากในขั้นตอนนี้เอนไซม์ที่ใช้สามารถทนความร้อนสูงได้ การทำปฏิกิริยา PCR ก็จะสามารถดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง

ขั้นตอนที่ 2 : Primer annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าจับกับ DNA ต้นแบบสายเดี่ยวในบริเวณเบสคู่สม ซึ่งจะต้องปรับลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 45-60°C โดยอุณหภูมิที่เลือกใช้นั้น ต้องพิจารณาจาก ลักษณะของไพรเมอร์ ที่ออกแบบร่วมกับ อุณหภูมิ ที่ต่ำเกินไปจะส่งผลให้ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่เข้าจับบนสาย DNA ลดลง แต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้ไพรเมอร์จับบนสาย DNA ได้ยากขึ้น

ขั้นตอนที่ 3 : Primer extension เป็นขั้นตอนของการขยายสาย DNA สายที่สร้างขึ้นใหม่ โดยการต่อนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ แล้วจึงมีการขยายสาย DNA สายใหม่ในทิศทางจากปลาย 5' ไป 3' โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ซึ่งปกติในขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิประมาณ 70-75°C

เทคนิค PCR สามารถเพิ่มปริมาณสาร DNA ได้มากในระยะเวลาเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาในแต่ละรอบจะมี DNA สายคู่เพิ่มขึ้นจากเดิมสองเท่า หรือคิดเป็น อัตราทวีคูณเท่ากับ 2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบ (cycle) ของการทำ PCR ดังนั้นถ้าหากทำปฏิกิริยา 20 รอบ ปริมาณสาร DNA จะเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2^{20} เท่าหรือมีประมาณล้านเท่าเมื่อเทียบกับปริมาณตั้งต้น

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ DNA

oligonucleotide primer คือ นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สายสั้น โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 18-22 bp และเป็นสิ่งที่กำหนดความจำเพาะของการทำ PCR ในการออกแบบ primer นั้นมักจะอ้างอิงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ เช่น เมื่อต้องการตรวจเชื้อไวรัสในสิ่งส่งตรวจ การออกแบบ primer จะอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสชนิดที่สนใจ ซึ่งอาจมีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) หรือใช้ข้อมูลที่ใกล้เคียงมากที่สุด เพื่อให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะสูง โดยทั่วไปมักออกแบบ primer จากบริเวณในจีโนมของไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกันภายในไวรัสชนิดนั้นๆ ซึ่ง อาจมีความจำเพาะสูงกับ ไวรัสภายใน species, genotype หรือภายในตระกูลเดียวกันแตกต่างกันไป เพื่อที่จะแยกไวรัสที่สนใจออกจากเชื้อชนิดอื่นๆ ที่ปะปนอยู่ในสิ่งส่งตรวจ แต่อย่างไรก็ตามการเลือกบริเวณ ต่างๆ ในจีโนม

เพื่อออกแบบไพรเมอร์นั้น อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงาน หลักการทั่วไปของการออกแบบไพรเมอร์มีดังต่อไปนี้

1. ความยาวของไพรเมอร์ควรมีขนาดประมาณ 18-22 bp ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
2. ไพรเมอร์ควรมีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย (target sequence) บนสาย DNA ต้นแบบ โดยเฉพาะด้านปลาย 3' ของ primer ควรมีลักษณะเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบ และลำดับนิวคลีโอไทด์ควรมีความจำเพาะ เพียงแหล่งเดียวบน DNA ต้นแบบด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงการเพิ่มปริมาณของ DNA ส่วนที่ไม่ต้องการ (non-specific product)
3. ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกลายของเบสอย่างสม่ำเสมอ และหลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์บนไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกันเอง (primer dimer)
4. ค่า GC content ที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 50-60% และไม่ควรถูกเลือกไพรเมอร์ที่มีค่า GC content สูงเกินไป
5. ค่า Tm (melting temperature (°C)) ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ควรมีค่าใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75°C ปัจจัยที่มีผลต่อค่า Tm คือ ส่วนประกอบของเบสแต่ละชนิดและความยาวของไพรเมอร์ สำหรับไพรเมอร์ที่มีความยาวน้อยกว่า 14 นิวคลีโอไทด์ สามารถคำนวณค่า Tm ได้จากสูตรที่ 1 สำหรับไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่า การคำนวณค่า Tm ควรเลือกใช้สูตรที่ 2

$$\text{สูตรที่ 1 : } T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$$

$$\text{สูตรที่ 2 : } T_m = 64.9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \times ((G+C) - 16.4)/N$$

เมื่อกำหนดให้ A, T, C, G แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดในไพรเมอร์

N แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำ PCR

Thermostable DNA polymerase

คุณสมบัติที่ดีของเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ต้องสามารถทนความร้อนสูงที่ใช้ในขั้นตอน denaturation ได้ โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยทั่วไปควรเร่งปฏิกิริยาสร้างสาย DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 70-85°C และควรมี enzymatic activity น้อยเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิต่ำ เอนไซม์ที่นิยมใช้ทั่วไปในการทำ PCR ได้แก่

Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 94 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ที่ขาดคุณสมบัติ 3'-5' exonuclease activity หรือ proofreading activity โดยมี error rate ประมาณ $1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-5}$ error/ bp มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ 72°C และพบว่าที่อุณหภูมิ 37°C ประสิทธิภาพของเอนไซม์จะลดเหลือเพียง 10% ของค่า enzymatic activity ทั้งหมด ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการทำ PCR อยู่ที่ 1.0-2.5 unit ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นปลายทู่ (blunt-end product)

Pfu DNA polymerase แยกได้จากแบคทีเรีย *Pyrococcus furiosus* จัดเป็นเอนไซม์ที่มี proofreading activity และให้สาย DNA สังเคราะห์ที่มี error rate ประมาณ 1.5×10^{-6} error/ bp ต่ำที่สุดในกลุ่มของเอนไซม์ thermophilic DNA polymerase

Vent หรือ *Tli* DNA polymerase แยกได้จากแบคทีเรีย *Thermococcus litoralis* คุณสมบัติเด่นของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ ทนความร้อนสูงได้ดี โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 95°C มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ประมาณ 7 ชั่วโมงและมี proofreading activity

การเลือกใช้เอนไซม์แต่ละชนิดขึ้นกับวัตถุประสงค์ของผู้ปฏิบัติการ และค่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ นั้น ควรพิจารณาจากปริมาณและลักษณะของ DNA ต้นแบบ, ไพรมเมอร์รวมถึงสารประกอบอื่นๆ ร่วมด้วย การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่น้อยเกินไปก็อาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อย แต่ ถ้าหากใช้มากเกินไป ก็อาจทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการปะปนมา (non-specific product) ได้ ด้วยประโยชน์ของการตรวจวิเคราะห์สาร ซึ่งได้ผลอย่างรวดเร็วและแม่นยำ ทำให้เทคนิค PCR ถูกพัฒนาอย่าง ขึ้นต่อเนื่อง และมีการนำหลักการ พื้นฐานของ PCR มาประยุกต์ใช้ เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีความสะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น เช่น

Reverse transcription (RT)-PCR

เป็นเทคนิคประยุกต์ระหว่างการทำ PCR พื้นฐานและกระบวนการ reverse transcription ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม RNA โดยตรงได้ในการทำ RT-PCR เพียงขั้นตอนเดียว โดยไม่จำเป็นต้องทำ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA ก่อน เทคนิคนี้จึงทำให้ประหยัดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ผล โดยเฉพาะการตรวจการติดเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ซึ่งเทคนิคนี้ยังคงความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ไว้เช่นเดิม จึงเป็นวิธีที่นิยมมากในห้องปฏิบัติการทั่วไป

Multiplex PCR

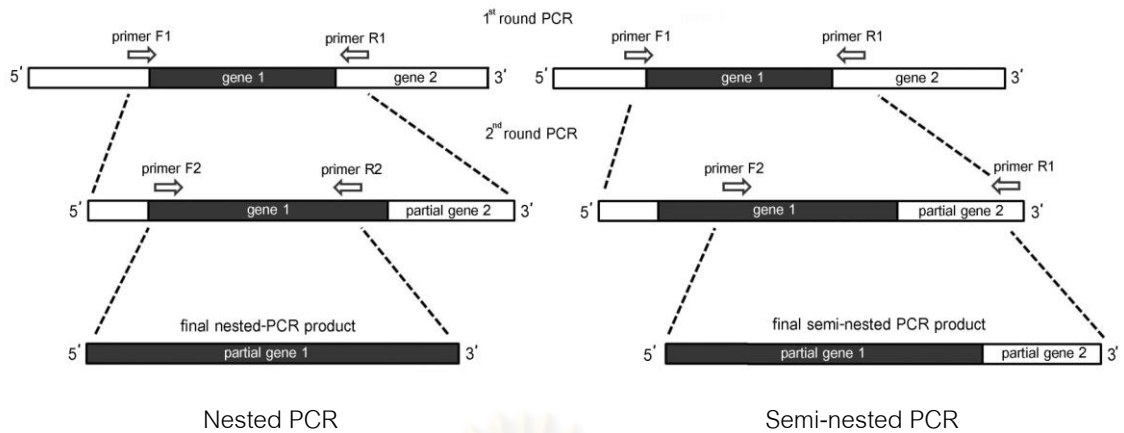
เทคนิค PCR นี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารหลายชนิดในการทำ PCR เพียงขั้นตอนเดียว และแยกวิเคราะห์สารโดยดูจากขนาดของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน จุดเด่นของเทคนิค multiplex PCR คือ การอาศัยความจำเพาะของ ไพรเมอร์ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น ในการตรวจแยกไวรัสก่อโรคที่ทางเดินหายใจ ผู้ปฏิบัติการสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด และผสมเข้าด้วยกันเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์พร้อมๆ กันได้ในการทำ PCR เพียงครั้งเดียว โดยข้อควรระวัง คือ ไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ออกแบบจะต้องไม่จับกันเกิดเป็น primer dimer ประโยชน์ของวิธีนี้จึงช่วยให้ประหยัดเวลาการตรวจวิเคราะห์ได้มากกว่าการทำปฏิกิริยา PCR ที่จำเพาะเจาะจงต่อไวรัสแต่ละชนิดแยกกัน

Nested PCR

Nested PCR คือ เทคนิคการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณที่ต้องการ คู่ไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR แรกออกเป็น 2 คู่ไพรเมอร์ โดยคู่แรก (F1, R1) เพื่อคัดเลือกยีนบริเวณที่สนใจ จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ มาใช้เป็น DNA template สำหรับการทำ PCR รอบที่สอง และใช้ ไพรเมอร์คู่ที่สอง (F2, R2) ซึ่งสามารถคัดเลือกยีนบริเวณเดิมโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มค่า specificity และ sensitivity ของการตรวจวิเคราะห์ให้สูงกว่าเทคนิค PCR ทั่วไป เทคนิคนี้มีค่า sensitivity เฉลี่ย $1 - 1 \times 10^{-2}$ copies/ μ l

Semi-nested PCR

Semi-nested PCR คือ เทคนิคการทำ PCR ที่ประยุกต์จาก nested PCR โดยใช้จำนวนไพรเมอร์น้อยกว่าการทำ nested PCR โดยใช้การทำ PCR เพื่อคัดเลือกยีนที่ต้องการก่อนในการทำ PCR ครั้งแรก จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำ PCR รอบที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์ใหม่ร่วมกับไพรเมอร์เดิม การเลือกใช้ ไพรเมอร์สามารถเลือกใช้ได้ทั้งสองทิศทาง โดยอาจออกแบบ ไพรเมอร์ใหม่ในทิศทาง 5'-3' (forward primer) หรือ 3'-5' (reverse primer) ก็ได้ ขึ้นกับความเหมาะสมของบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ หรือตามวัตถุประสงค์ของผู้วิจัย โดยเทคนิค semi-nested PCR ยังคงให้ค่า specificity และ sensitivity ที่คล้ายกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค nested-PCR



ภาพที่ 2 หลักการในการทำ Nested PCR และ Semi-nested PCR

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

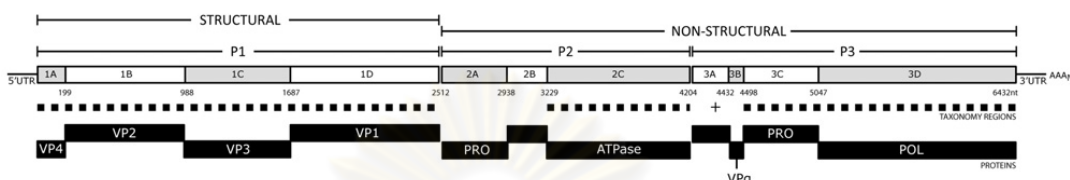
อนุกรมวิธานของเชื้อ Human Rhinovirus

เชื้อ Human Rhinovirus (HRV) จัดอยู่ในตระกูล *Picornaviridae* ซึ่งเป็นตระกูลที่ประกอบด้วยไวรัสมากมาย ก่อโรคสำคัญ หลายชนิดทั้ง ในคนและสัตว์ ไวรัสในตระกูล *Picornaviridae* จำแนกออกเป็น 8 genus ได้แก่ *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Erbovirus* และ *Teschovirus* โดย HRV เป็นกลุ่มไวรัสขนาดใหญ่ประมาณ 100 serotype จัดเป็นสมาชิกหนึ่งใน genus *Enterovirus* แต่เดิมเชื้อ HRV ถูกเรียกว่า coryzavirus, ECHO 28-rhinovirus-coryzavirus (ERCs), murivirus หรือ enterovirus like virus เนื่องจากมีลักษณะทั่วไปคล้ายเชื้อ enterovirus โดยเชื้อ HRV ถูกเพาะเลี้ยงได้ครั้งแรกในปี 1953 จากการศึกษารายงานของ Andrewes และคณะ โดยการนำตัวอย่างน้ำล้างจมูกของผู้ป่วยโรคไข้หวัดมาเพาะเชื้อไวรัส ในเซลล์ primary human embryonic lung เชื้อไวรัสที่แยกสกัดได้นี้ถูกตั้งชื่อว่า Rhinovirus strain D.C. ต่อมาผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV พบว่า strain D.C คือ serotype 9

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Human Rhinovirus

ลักษณะทั่วไปของไวรัสในตระกูล *Picornaviridae* คือ อนุภาคไวรัสมีขนาดเล็กประมาณ 25-30 nm มีสารพันธุกรรมเป็น RNA เส้นตรงสายเดี่ยว ที่มีขั้วเป็นบวก (positive single stranded RNA) จีโนมมีขนาดโดยเฉลี่ย 7.2 kb บรรจุอยู่ภายในโปรตีน capsid ซึ่งมีสมมาตรแบบ

icosahedral asymmetry ลักษณะจีโนมของ picornavirus พบว่ายีนมีการจัดเรียงตัวอย่างต่อเนื่องเป็นเพียง 1 open reading frame (ORF) ซึ่งจะถูกละรหัสเป็นโปรตีนสายยาว (polyprotein) 1 สาย ขนาดโมเลกุลเฉลี่ย 220 kDa ก่อนที่จะถูกตัดออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อย 11 ชนิดต่อไป จีโนมของไวรัสแบ่งออกเป็น 5 ส่วนหลักดังภาพ



ภาพที่ 3 จีโนมของ HRV ซึ่งมี 1 ORF ขนาดด้วย 5'UTR และ 3'UTR²²

ส่วนที่ 1 : 5'-Untranslated region (5'-UTR)

เป็นส่วนต้นของจีโนมมีขนาด 600 nt ในบริเวณนี้พบการจัดโครงสร้างของ RNA เป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) 2 โครงสร้างหลัก

(1) 5' Terminal clover leaf like motif หรือ *oriL*

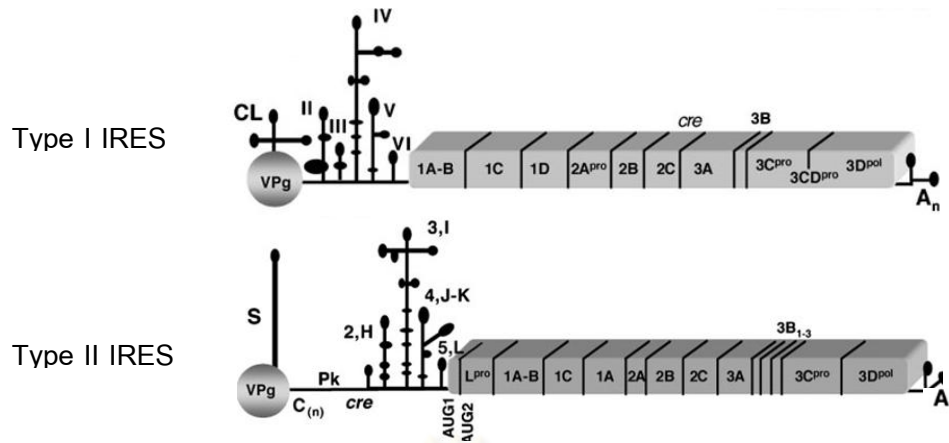
oriL มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการ replication โดยไปยับยั้งกระบวนการ translation เพื่อนำ viral RNA มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการจำลอง antisense RNA โดยพบว่าโครงสร้างนี้เป็นส่วนสำคัญที่ถูกจดจำได้ด้วย poly(C) binding protein-2 (PCBP2) ซึ่งจัดเป็น cellular factor ที่สำคัญของกระบวนการ replication

(2) Internal Ribosome Entry Site (IRES)

เป็นโครงสร้าง RNA ทุติยภูมิที่ ribosome หรือ initiation complex ของเซลล์เจ้าบ้านเข้ามาจับและเริ่มต้นหา start codon บนจีโนมของไวรัส เพื่อควบคุมกระบวนการ translation ของจีโนมไวรัสต่อไป โครงสร้าง IRES ของ picornavirus แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามรูปแบบของโครงสร้าง ซึ่งไวรัสแต่ละชนิดก็จะใช้ IRES ที่ต่างชนิดกันไป^[23] ได้แก่

Type I-IRES : picornavirus ที่มี IRES โครงสร้างแบบ type I คือ Enterovirus และ Rhinovirus

Type II-IRES : picornavirus ที่มี IRES โครงสร้างแบบ type II คือ Cardiovirus ลำ Apthovirus



ภาพที่ 4 โครงสร้างทุติยภูมิของ IRES ทั้งสองชนิดของ picornavirus

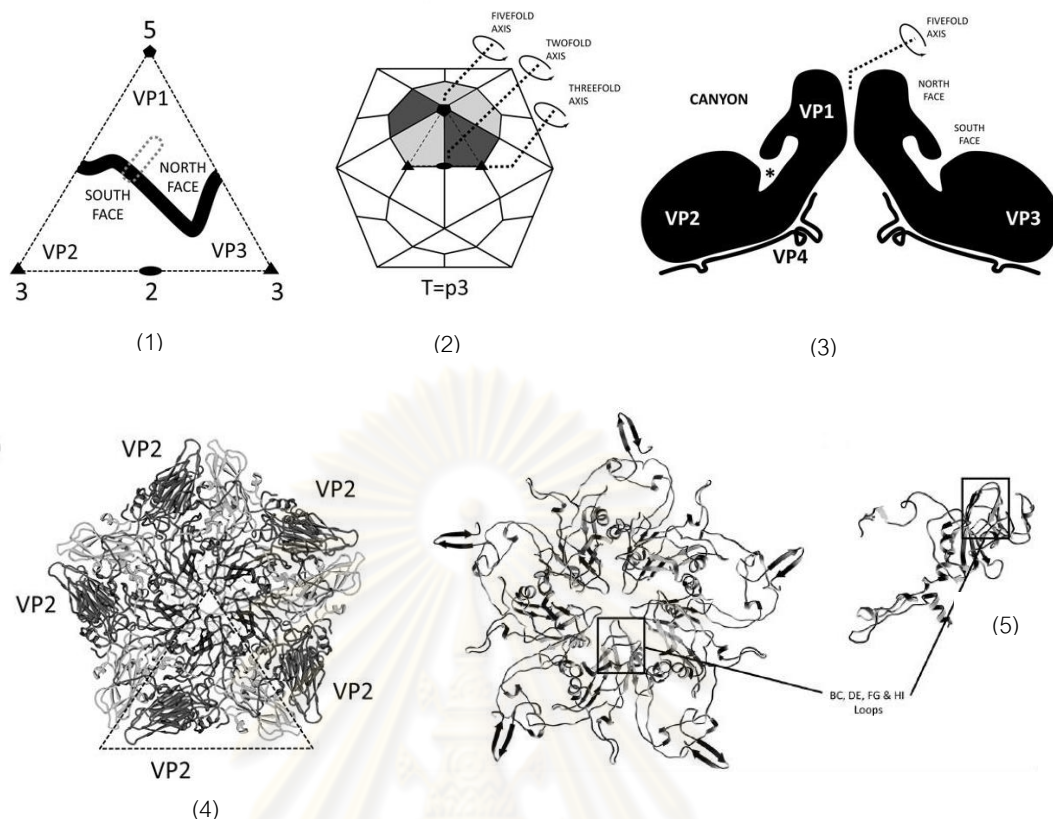
ตามปกติจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านจะมี mRNA ที่ผ่านกระบวนการเติม 5'-cap (5'-capping) และ 3'-poly(A) (polyadenylation) ที่ส่วนปลายทั้งสองข้างของ mRNA ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านจะควบคุมกระบวนการ translation ผ่านทางการจดจำระหว่าง initiation complex และ 5'-cap ซึ่งอยู่บริเวณส่วนปลาย 5' ของ mRNA หรือเรียกว่ากระบวนการ 5'-cap dependent pathway เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะการตายแบบ apoptosis หรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น เซลล์ติดเชื้อไวรัส ในกรณีของการติดเชื้อ picornavirus ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายบวกคล้ายกับ mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ไวรัสสามารถควบคุมกระบวนการ translation โดยใช้ประโยชน์จากสารต่างๆ ที่มีอยู่แล้วในเซลล์เพื่อการเพิ่มปริมาณของไวรัสได้ โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างลักษณะของสาย RNA ของไวรัสและ mRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจาก RNA ของไวรัสไม่มี 5'-cap ที่ส่วนปลายของจีโนม จึงอาศัยความแตกต่างนี้ควบคุมกระบวนการ translation ของเซลล์ให้ทำงานแตกต่างไปจากสภาพปกติ โดยจะมีการเหนี่ยวนำ initiation complex ให้เข้ามาจับบนโครงสร้าง IRES ซึ่งอยู่ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนมไวรัส แทนการจดจำ 5'-cap บนสาย mRNA กระบวนการ translation ของเซลล์เจ้าบ้านจึงถูกขัดขวางและองค์ประกอบต่างๆ อาทิเช่น ribosome หรือ eukaryotic initiation factor (eIF) จะถูกนำมาใช้เพื่อการถอดรหัสสารพันธุกรรมของไวรัสแทนกระบวนการ translation ของเซลล์เจ้าบ้านที่เปลี่ยนแปลงไปหลังติดเชื้อไวรัสนี้ เรียกว่ากระบวนการ 5'-cap independent pathway หรือ IRES dependent pathway จึงอาจกล่าวได้ว่ากระบวนการ translation รูปแบบนี้เป็นกระบวนการที่มีอยู่แล้วในเซลล์แต่จะถูกนำมาใช้ ต่อเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ^[24-25]

ส่วนที่ 2 : Structural region (P1)

จีโนมส่วนนี้มีขนาดเฉลี่ย 2,500 nt ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน capsid ทั้ง 4 ชนิด คือ VP4 (200 nt), VP2 (800 nt), VP3 (700 nt) และ VP1 (800 nt) ตามลำดับ ซึ่งระบุตัวเลขตามขนาดของยีนและโปรตีน capsid ที่ได้ ส่วนผิวด้านนอกของโปรตีน capsid เกิดขึ้นจากการประกอบกันของโปรตีน VP1-VP3 ประกอบกันเป็นหน่วยย่อย (protomer) มีลักษณะคล้ายสามเหลี่ยมด้านเท่า โดยมี VP4 เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่สุดอยู่ภายในโปรตีน capsid จากนั้นโปรตีนหน่วยย่อยทั้ง 20 protomer จึงประกอบเข้าด้วยกันเป็นโครงสร้าง icosahedral capsid

โปรตีน capsid ส่วนที่มีความสำคัญ คือ ส่วนโปรตีน VP1 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักมีบทบาทต่อการกำหนด antigenicity ของไวรัส เนื่องจากไวรัส HRV จะอาศัยลำดับกรดอะมิโนของ VP1 ร่วมกับ VP3 ในการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายร่อง (canyon) บน icosahedral capsid โดยบริเวณ canyon นี้จะถูกจดจำได้ด้วย neutralizing antibody (Ab) ของเจ้าบ้าน ซึ่งมีความจำเพาะต่ออนุภาคของไวรัส เนื่องจากถูก กำหนดโดยขนาดของ canyon ที่สามารถจับได้อย่างพอดีกับส่วน Fab ของ Ab ที่มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 3.5 nm ส่งผลให้โครงสร้าง canyon เป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรค่อนข้างมาก (highly conserve)^[22]

นอกจากนี้ ภายใน canyon ยังมีโครงสร้างสำคัญ ต่อไวรัสอีกโครงสร้างหนึ่ง คือ drug binding pocket มีลักษณะคล้ายกระเปาะ อยู่ลึกลงมาจากส่วน canyon ประมาณ 2.5 nm โครงสร้างนี้เป็นส่วนที่ไวรัส HRV กลุ่มหลัก (n=88) ใช้ในการจับกับ major receptor (ICAM-1) ของเซลล์เจ้าบ้าน และยังเป็นบริเวณที่นิยมใช้ออกแบบยาเพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส HRV ด้วย โดยทั่วไป การออกแบบยาต้านไวรัสมักมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งกระบวนการ replication ของไวรัสได้รวดเร็ว และควบคุมการเพิ่มขึ้นของอนุภาคไวรัสได้อย่างได้ผล ในกลุ่มของยาสำหรับต้านการติดเชื้อ picornavirus นั้น นิยมออกแบบยาให้สามารถขัดขวางกระบวนการ decapsidation หรือ cell attachment ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของกระบวนการ replication เนื่องจากจะสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการยับยั้งในขั้นตอนอื่นๆ และส่วนสำคัญบนอนุภาคไวรัสที่ได้รับความสนใจนำมาเป็นต้นแบบสำหรับการออกแบบยาต้านไวรัส ได้แก่ โปรตีน capsid VP1



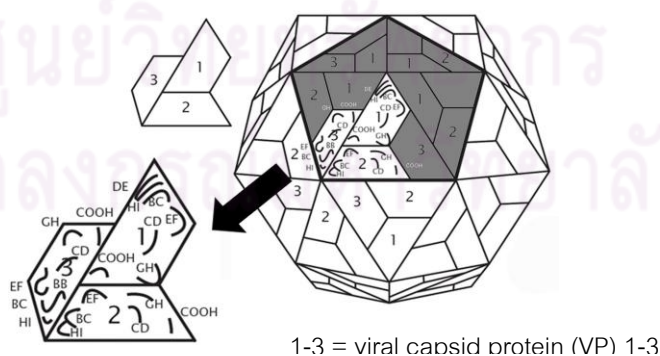
ภาพที่ 5 ลักษณะโปรตีน capsid ของ HRV-QPM (EF186077) ^[22]

- (1) asymmetry unit ของโปรตีน capsid โดยส่วนผิวหน้าของ canyon แทนด้วยเส้นหนา, ผิวหน้าของ binding pocket แทนด้วยเส้นประรูปวงรี และแกนสมมาตร คือ 2, 3, 5-fold axis แทนด้วยรูปวงรี สามเหลี่ยมและห้าเหลี่ยมที่บิตามลำดับ
- (2) โครงสร้างของโปรตีน icosahedral capsid มีขนาดประมาณ 30 nm
- (3) ภาพตัดขวางของคู่ protomer แสดงบริเวณร่องบนผิวของอนุภาคไวรัส (canyon) และส่วน drug binding pocket (*)
- (4) ภาพด้านบนของโครงสร้างแบบ ribbon ของ viral pentamer ซึ่งแสดงการจัดเรียงตัวของ capsid protomer ทั้ง 5 หน่วยย่อย โดยใช้ asymmetric unit และส่วน VP2 เป็นตัวอ้างอิง สำหรับการแบ่งส่วนย่อยบนโปรตีน capsid
- (5) ภาพด้านข้างของโปรตีน VP1 โดยแสดงบริเวณ loop สำคัญบนผิวของโปรตีน ได้แก่ BC, DE, FG, HI loop และบริเวณที่ล้อมรอบด้วยกรอบสี่เหลี่ยม คือ antigenic site ของไวรัส

โครงสร้างของโปรตีน capsid VP1รวมทั้งโปรตีน capsid VP2 และ VP3 ซึ่งถือได้ว่าเป็นโปรตีนผิวนอกของ icosahedral capsid มีลักษณะสำคัญร่วมกัน คือ เป็นโครงสร้าง 8 stranded-anti-parallel β -barrel^[26] หรือประกอบขึ้นจากโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็น loop จำนวน 7 loop ได้แก่ BC, CD, DE, EF, FG, GH และ HI loop ซึ่งเชื่อมระหว่างกันด้วยโปรตีน β -stand ได้แก่ β B, β C, β D, β E, β F, β G, β H และ β I stand เรียงสลับกัน และส่วนปลาย N และ C ทั้งสองข้างของโปรตีน มีลักษณะเป็นโปรตีนที่ต่อขยายเพิ่มขึ้นจาก β -stand หรือเรียกว่า β -barrel domain การจัดเรียงตัวของโปรตีนต่างๆ มีลักษณะดังต่อไปนี้

β -barrel/ β B - BC - β C - CD - β D - DE - β E - EF - β F - FG - β G - GH - β H - HI - β I/ β -barrel

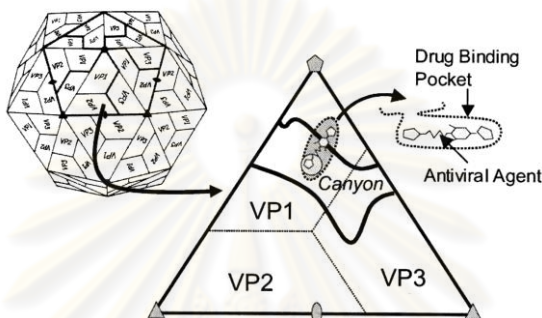
ส่วน BC loop, DE loop และ HI loop นั้นเป็น loop ที่จัดเรียงตัวในส่วนผิวหน้าของโปรตีน capsid (surface loop) และเชื่อกันว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกำหนด antigenic epitope บนอนุภาคไวรัส รวมถึงการกำหนด receptor specificity ของไวรัสด้วย ใน HRV กลุ่มที่ใช้ ICAM-1 เป็น receptor จะแสดงลักษณะของกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 ที่แตกต่างจากไวรัสกลุ่มที่ใช้ LDL-R เป็น receptor ทำให้นักวิจัยสามารถใช้ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (amino acid alignment) ของโปรตีน VP1 เพื่อทำนายชนิดของ receptor ที่ไวรัสใช้ได้ ตัวอย่างเช่น ลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่งใน HI loop ของไวรัสกลุ่มที่ใช้ LDL-R เช่น lysine มีลักษณะจำเพาะและพบได้ในไวรัส HRV ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ LDL-R ร่วมกัน และมีรายงานว่าน่าจะมีความสำคัญต่อการจับกับโปรตีน LDL-R family^[27]



ภาพที่ 6 การจัดเรียงตัวของโปรตีน capsid VP1-3 บนผิวหน้าของอนุภาคไวรัส HRV

นอกจากนี้โปรตีน capsid VP1 ยังเป็นบริเวณสำคัญที่ใช้สำหรับการออกแบบยาต้านไวรัส ในปัจจุบันนี้ยาต้านไวรัสกลุ่ม picornavirus นั้น ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่ออนุภาคไวรัส

แตกต่างกันไป ทั้งขีดขวางในชั้นตอนของ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสหรือในชั้นการสังเคราะห์โปรตีน แต่ทั่วไปนิยมออกแบบยาต้านไวรัสเพื่อขัดขวางการรุกรานของไวรัสต่อเซลล์เจ้าบ้าน โดยออกแบบยาให้มีฤทธิ์ต่อโปรตีน capsid (capsid function inhibitor) เช่น ยับยั้งกระบวนการ virus adsorption, cell entry หรือ decapsidation ทำให้ควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น ยา pirodavir^[28] และ pleconaril เป็นยาที่ใช้สำหรับการรักษาการติดเชื้อ HEV และ HRV



ภาพที่ 7 ตัวอย่างยาต้านไวรัสที่มีฤทธิ์ต่อโปรตีน capsid

โดยโมเลกุลของยาเข้าแทนที่ใน drug binding pocket ในบริเวณ canyon ของโปรตีน VP1^[29]

ส่วนที่ 3 และ 4 : Nonstructural region (P2 และ P3)

non-structural gene ถูกแบ่งออก 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ส่วน P2 มีขนาด 1,700 nt ประกอบด้วยยีน 2A (400 nt), 2B (300 nt) และ 2C (1,000 nt) ตามลำดับ และส่วน P3 มีขนาด 2,200 nt ประกอบด้วยยีน 3A (200 nt), 3B (100 nt), 3C (500 nt) และ 3D (1,400 nt) ตามลำดับ โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสของทั้งสองส่วนนี้ เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ replication, co-translational cleavage และ protein maturation จึงกล่าวได้ว่าจีโนมในส่วนนี้มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสเป็นอย่างมาก

โปรตีนสำคัญซึ่งได้จากการถอดรหัสของ non-structural gene มีหลายชนิด ได้แก่

เอนไซม์ 2A (2A protease, 2A^{pro})

มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ proteases ทำหน้าที่ตัดโปรตีนสายยาวให้กลายเป็นโปรตีนหน่วยย่อยที่อยู่ในรูปพร้อมใช้งาน และทำหน้าที่ย่อย eukaryotic initiation factor eIF4G เพื่อขัดขวางกระบวนการ translation ของเซลล์เจ้าบ้าน

โปรตีน 3B (VPg)

ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างโปรตีน capsid กับส่วนปลาย 5'UTR ของ genome และทำหน้าที่เป็นโปรตีนไพรเมอร์ให้กับเอนไซม์ 3D^{pol} ซึ่งใช้สำหรับกระบวนการ RNA polymerization อีกด้วย

เอนไซม์ 3C (3C proteases, 3C^{pro})

เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการ co-translational cleavage เกือบทั้งหมดของไวรัส

เอนไซม์ RNA polymerase (RdRp หรือ 3D^{pol})

มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งไม่พบในเซลล์เข้าบ้าน ไวรัสจึงจำเป็นต้องสร้างขึ้นมา มีบทบาทสำคัญสำหรับกระบวนการ replication ของไวรัส

โปรตีนหลายๆ ชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์นั้น เป็นตัวเลือกที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษาเพื่อการพัฒนาายาต้านไวรัสชนิดนี้ต่อไป^[30]

ส่วนที่ 5 : 3'-Untranslated region (3'-UTR)

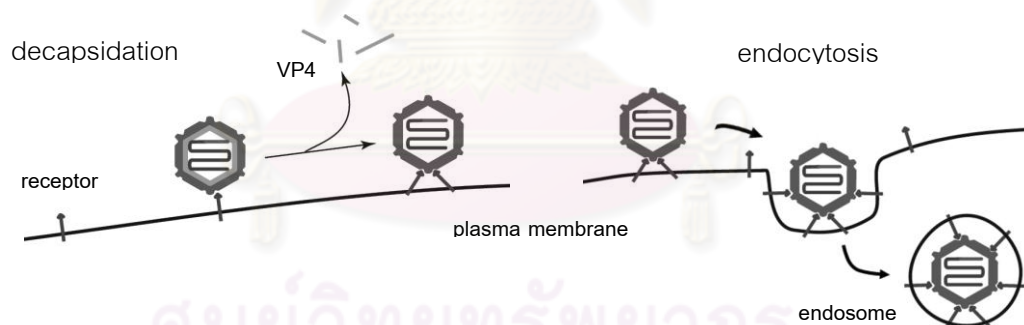
ในส่วนนี้เริ่มตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์หลัง stop codon จนถึง poly(A) tail มีขนาดแตกต่างกันไปใน picornavirus แต่ละชนิด สำหรับจีโนมของ HRV ส่วน 3' UTR มีขนาดตั้งแต่ 40-60 nt โดยพบว่าในบริเวณนี้มีการจัดโครงสร้างของ RNA เป็นโครงสร้างทุติยภูมิขนาดเล็ก (3' terminal stem loop) ประมาณ 20 nt แต่อย่างไรก็ตาม หน้าที่ของ stem loop นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อกันว่าจะทำหน้าที่เป็น recognition motif เพื่อใช้ในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง stem loop กับบริเวณอื่นๆ บนจีโนมของไวรัส

ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของส่วน 3' UTR คือ การมี poly(A) tail คล้ายกับใน mRNA โดย poly(A) tail ในจีโนมของไวรัส นั้น ถูกกำหนดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนม จึงพบได้ทั่วไปในจีโนมของไวรัส และเมื่อมีการถอดรหัสจาก sense RNA เป็น antisense RNA ลำดับ 3'-poly(A) tract จะถูกเปลี่ยนเป็น 5'-poly(U) tract และในระหว่างเกิด replication นี้ จะมีการจัดโครงสร้างเป็น homopolymer ระหว่าง poly(A) ของสาย sense RNA และ poly(U) ของสาย antisense RNA หรือกล่าวได้ว่า poly(A) ทำหน้าที่เป็น reciprocal template กับการสร้าง RNA สายใหม่ ในขณะที่ poly(A) tail ที่ปลายสาย mRNA ไม่ได้ถูกกำหนดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนของเซลล์ยูคาริโอต (non-template poly(A) tract) แต่ได้รับมาจากกระบวนการ mRNA processing เพื่อป้องกันไม่ให้ปลายสาย mRNA โดนทำลายจากเอนไซม์ endonuclease และช่วยรักษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบ (stability) นอกจากนี้ poly(A) tail ยังทำหน้าที่เสมือน

cellular signal ช่วยลำเลียงสาย mRNA ออกมาสู่ไซโทพลาสซึม (translocation) และมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ translation ด้วย บทบาทหน้าที่ของ poly(A) tail ในไวรัสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อกันว่าจะมีความคล้ายคลึงกับหน้าที่ของ poly(A) tail ใน mRNA ของเซลล์ยูคาริโอตและมีความสำคัญต่อกระบวนการ replication ของไวรัส^[25, 31]

วงชีวิตของเชื้อ Human Rhinovirus

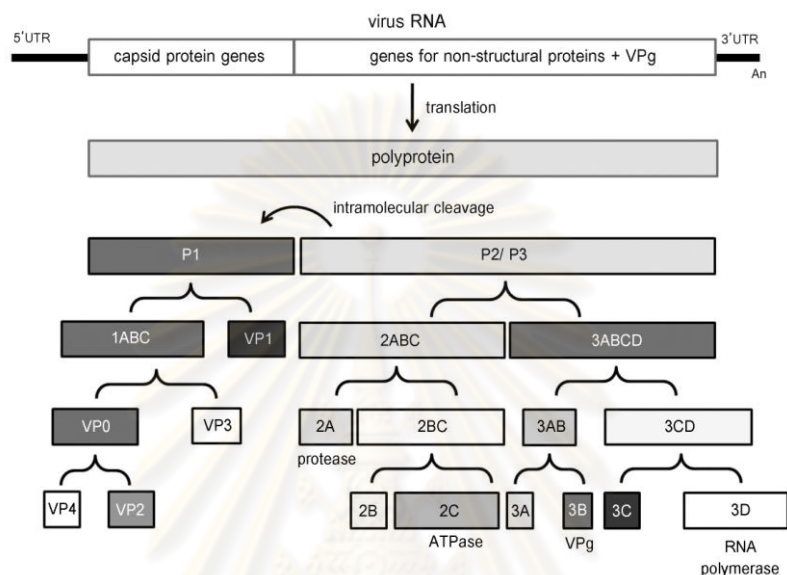
กระบวนการ replication ของไวรัสเกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ เจ้าบ้าน หลังจากอนุภาค HRV จับกับเซลล์ผ่านทาง receptor บนผิวเซลล์แล้ว ไวรัสจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน capsid ผ่านกระบวนการ decapsidation หรือ uncoating จากนั้นจึงส่งจีโนมของไวรัสเข้าสู่เซลล์ เพื่อเริ่มต้นกระบวนการจำลองจีโนมและถอดรหัสต่อไป หรืออนุภาคไวรัสอาจถูกพาเข้าเซลล์ ด้วยกระบวนการ endocytosis จากนั้นจึงเกิดการสลายโปรตีน capsid โดยอาศัยสภาวะที่เซลล์บริเวณนั้นมีค่า pH ต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิด acidification ภายใน endosome เมื่อโปรตีน capsid สลายไปแล้วจึงเกิดการปล่อยจีโนมสู่ไซโทพลาสซึม แต่อย่างไรก็ดีกลไกเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด^[32]



ภาพที่ 8 การเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของเชื้อ HRV

เมื่อจีโนมสายบวกถูกปล่อยเข้าสู่ไซโทพลาสซึมแล้ว จะถูกแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีน ต่างๆ ที่สำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดย เริ่มสร้างเป็นโปรตีนสายยาว (polyprotein) แล้วจึงตัดเป็นโปรตีนหน่วยย่อยโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ protease ที่ไวรัสสร้างขึ้นเอง บริเวณตัดจำเพาะบน polyprotein มี 2 บริเวณ ได้แก่ ระหว่างส่วน P1-P2 หรือระหว่างโปรตีน VP1 และ 2A ซึ่งจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ 2A^{pro} เพื่อแยก P1 precursor ออกจากส่วนอื่น และระหว่าง ส่วน P2-P3 หรือระหว่างโปรตีน 2C และ 3A ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 3C^{pro} จากนั้นจึงจะเกิดการตกแต่งโปรตีน แต่ละส่วนให้มีลักษณะตามที่ต้องการ กระบวนการตัดสาย polyprotein จะเกิดขึ้นควบคู่ไปกับ

กระบวนการ translation (co-translational cleavage) ทำให้ไม่พบ polyprotein สายสมบูรณ์ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ (ภาพที่ 9) เมื่อได้โปรตีน capsid และเอนไซม์ต่างๆ ที่สมบูรณ์แล้ว จึงจะเริ่มสร้างสาย antisense RNA ((-)RNA) ขึ้นเพื่อใช้เป็นแม่แบบสำหรับการจำลองตัวของจีโนม โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 3D^{pol}

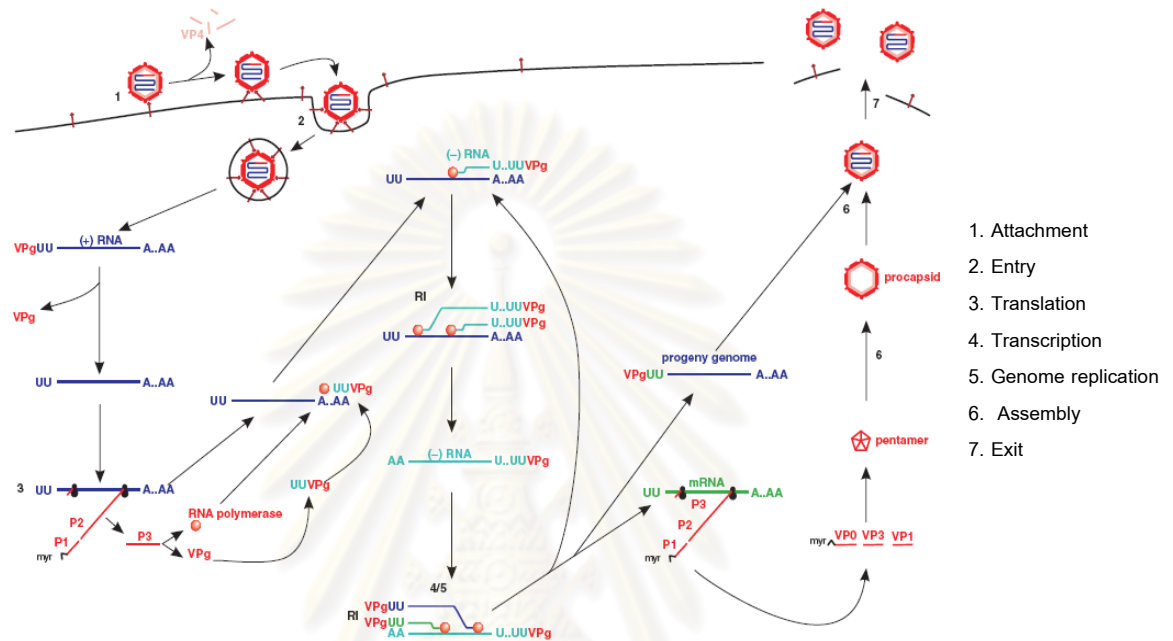


ภาพที่ 9 กระบวนการ translation และ co-translational cleavage ของ HRV

การประกอบโครงสร้างของ icosahedral capsid นั้น เริ่มจาก 5 หน่วยย่อยของ โปรตีน VP1, VP2 และ VP0 ประกอบกันเป็นโปรตีนหน่วยย่อย pentamer จากนั้นโปรตีน 12 pentamer จึงรวมกันเป็นโครงสร้าง procapsid เมื่อได้โครงสร้าง procapsid ที่สมบูรณ์แล้ว จีโนมของไวรัสจะถูกบรรจุเข้าไปในโปรตีน procapsid โดยอาศัยการทำงานของ VPg ทำหน้าที่ยึดส่วนปลาย 5' ของจีโนมกับผิวด้านในของ procapsid จากนั้นโปรตีน VP0 ทั้งหมด 60 หน่วยย่อยจะถูกตัดออกเป็น VP4 และ VP2 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการจะได้อนุภาคของไวรัสใหม่ ซึ่งอยู่ในสภาพที่พร้อมจะรุกรานเซลล์ข้างเคียงต่อไปได้ โดยอนุภาคของไวรัสจะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์โดยการย่อย cell membrane ของเซลล์เจ้าบ้าน (cell lysis)

ในระหว่างเกิดกระบวนการ replication นั้น ถ้าหากเซลล์หนึ่งถูกรุกรานด้วย HRV ต่างสายพันธุ์กันพร้อมกัน อาจทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนบางส่วนของ RNA ระหว่างกันได้ หรือเรียกว่ากระบวนการ recombination เมื่อองค์ประกอบต่างๆ ประกอบกันเป็นอนุภาคไวรัสใหม่ จึงเกิดเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ขึ้น นอกจากนี้การเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัส อาจมีสาเหตุมาจากการ

ผิดพลาดระหว่างการจำลองจีโนมไวรัส เนื่องเอนไซม์ 3D^{pol} นั้น ไม่มี proofreading activity ส่งผลให้การจำลองจีโนมอาจมีข้อมูลบางส่วนที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นแบบ และไม่สามารถตรวจหาความผิดพลาดได้ จึงสันนิษฐานว่ากลไกเหล่านี้ เป็นผลให้เชื้อ HRV มีความหลากหลายทางสายพันธุ์กว่า 100 serotype



ภาพที่ 10 กระบวนการ replication ของเชื้อ HRV ในเซลล์เจ้าบ้าน^[32]

บริเวณสำคัญของการเกิด replication คือ ภายในช่องปากและลำคอ โดยเฉพาะ epithelial cell ใน nasal mucosa และยังพบการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างด้วย เนื่องจากการตรวจพบ HRV ในตัวอย่างที่ได้จาก bronchoalveolar lavage การติดเชื้อ HRV ส่งผลให้เซลล์มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปหลายประการ (cytopathic effect : CPE) ตัวอย่างเช่น ขอบของเซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการหดของขอบเซลล์ทำให้เซลล์มีลักษณะกลม (cell rounding) และ เกิดเป็นเซลล์เดี่ยวกระจายทั่วในน้ำเลี้ยงเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออก สู่ภายนอกเซลล์ได้ ลักษณะ CPE ของเซลล์ติดเชื้อ HRV คล้ายกับเซลล์ติดเชื้อ HEV สามารถแยกจากกันได้โดยการทดสอบความเป็นกรด (acid lability test) ซึ่งเชื้อ HRV จะไม่ทนต่อกรด แต่เชื้อ HEV จะทนต่อกรดได้ดีกว่า

ความแตกต่างของเชื้อ Human Rhinovirus และ Human Enterovirus

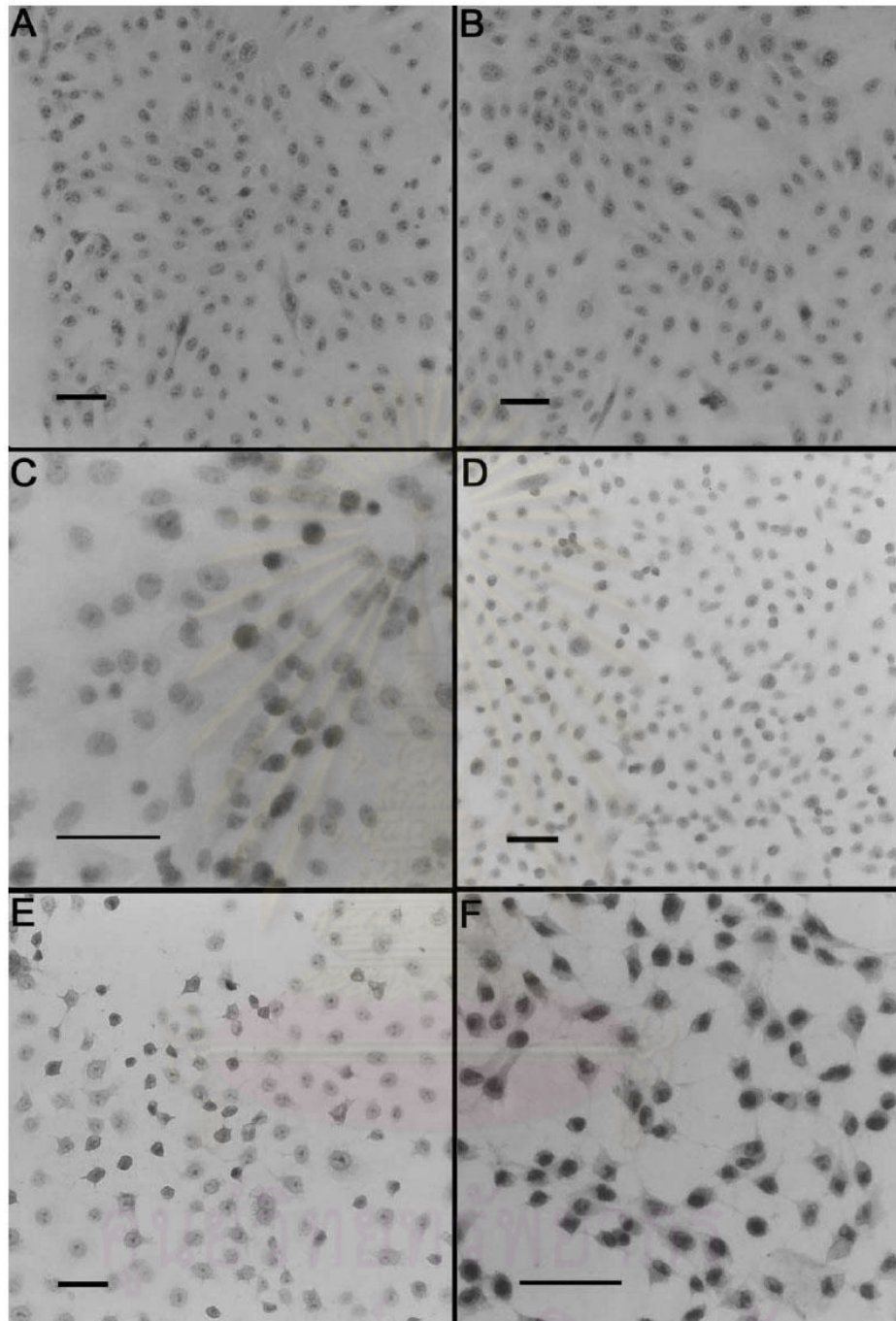
เชื้อ HRV มีลักษณะทั่วไปคล้ายกับเชื้อ HEV หลายประการ ได้แก่ สัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัส (virion morphology), การจัดเรียงตัวของยีนในจีโนม, กระบวนการ replication ของไวรัส เป็นต้น โดยพบว่าจีโนมของไวรัสทั้งสองชนิดมีค่า nucleotide identity มากกว่า 50% แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ HRV ยังมีคุณสมบัติทางกายภาพบางประการที่แตกต่างจากเชื้อ HEV เช่น

(1) สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ: เชื้อ HRV เจริญได้ดีที่อุณหภูมิเฉลี่ย 33°C และไม่ทนกรด pH ต่ำกว่า 6 (acid lability) แตกต่างกับ HEV ซึ่งมีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเฉลี่ยที่ 37°C และพบว่าที่ pH ต่ำกว่า 3 นั้น HEV ก็ยังคงคุณสมบัติ viral infectivity ไว้ได้ (acid stability)

(2) บริเวณที่พบการติดเชื้อไวรัส: เชื้อ HRV มีบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะทางเดินหายใจส่วนบน และไม่สามารถผ่านกระเพาะอาหารได้ จึงไม่พบการเจริญในระบบอื่นๆ ในขณะที่เชื้อ HEV มีบริเวณที่เหมาะสมต่อการเจริญหลายบริเวณ ทั้งในระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของไวรัส HEV

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ Rhinovirus เปรียบเทียบกับ Enterovirus

	pH sensitivity	optimum growth temperature	serotype	transmission	site of infection
HRV	ไม่ทนต่อสภาพเป็นกรด	~ 33°C	99	การหายใจ	ทางเดินหายใจ
HEV	ทนต่อสภาพเป็นกรด	~ 37°C	72	การกิน, สัมผัส	ทางเดินอาหาร



ภาพที่ 11 ผลการทำ immunohistochemistry

เพื่อศึกษา cytopathic effect ในเซลล์ แต่ละชนิดซึ่งติดเชื้อ HRV^[33]

เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ภาพ A คือ เซลล์ bronchial epithelial หลังติดเชื้อ HRV เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภาพ C คือ เซลล์ adenoidal epithelial หลังติดเชื้อ HRV เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ภาพ B, D คือ กลุ่มควบคุมของ เซลล์ bronchial epithelial และ adenoidal epithelial ตามลำดับ ภาพ E-F คือ เซลล์ HeLa หลังติดเชื้อ HRV เป็นเวลา 6.5 ชั่วโมง โดยเซลล์ A-E ถูกย้อมด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ HRV และเซลล์ F ย้อม ด้วย mouse isotype-control antibody และกำหนดให้เส้นตรงสีดำแทนความยาว 50 μm

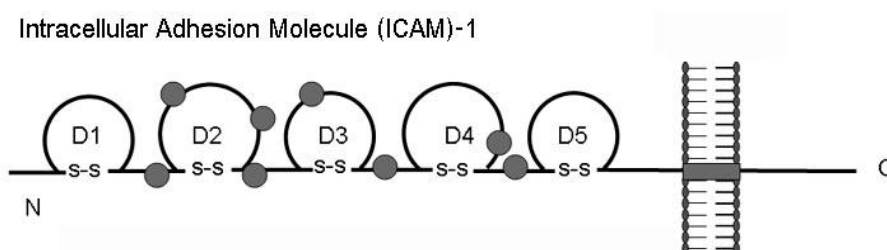
การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Human Rhinovirus

การจัดจำแนกกลุ่มของ HRV ใช้เกณฑ์การพิจารณาหลายรูปแบบ แต่เดิมใช้ การทำ capsid serotyping โดยพิจารณาจากความจำเพาะของ neutralizing antibody ต่อ antigenic site บนอนุภาคไวรัส จะสามารถจัดจำแนกไวรัส HRV ได้ทั้งหมด 99 serotype หรือใช้เกณฑ์การพิจารณาจากความจำเพาะของ cellular receptor ที่ไวรัสเข้าจับ เมื่อต้องการรุกรานเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ทำให้สามารถแบ่งไวรัสทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

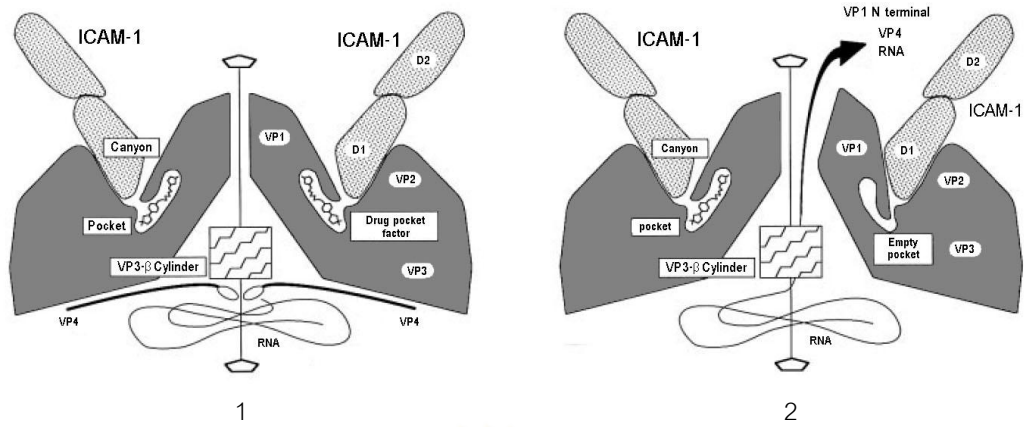
กลุ่มหลัก คือ เชื้อ HRV ที่เลือกใช้ intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) เป็น receptor ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ในกลุ่มนี้ประกอบสมาชิก 89 serotype ซึ่งนับเป็นส่วนใหญ่ของเชื้อ HRV จึงถือได้ว่า ICAM-1 จัดเป็น receptor หลักของเชื้อ HRV (major receptor)

ICAM-1 จัดอยู่ในกลุ่มของ immunoglobulin protein superfamily ทำหน้าที่เป็นโปรตีนยึดระหว่างเซลล์เข้าด้วยกัน (cell-cell adhesion) และเป็นส่วนหนึ่งของการสร้างแขนเทียม lamellipodium เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ endothelial โปรตีน ICAM-1 ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน ได้แก่ ปลาย N และส่วน domain ทั้ง 5 (D1-D5) ซึ่งยื่นออกจาก plasma membrane ของเซลล์และส่วน transmembrane protein แสดงดังภาพที่ 12

จากผลการศึกษาด้าน cryoelectron microscopy (cryo-EM) และ X-ray crystallography พบว่าส่วน D1 domain คือส่วนที่ทำหน้าที่เป็น binding site ของ ICAM-1 receptor ต่ออนุภาคไวรัส HRV โดยจะเกิดการจับบน icosahedral capsid ของอนุภาคไวรัสในบริเวณ canyon floor ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีน capsid VP1 และ VP3 และบางส่วนของโปรตีน capsid VP2 ผลจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง receptor และส่วน canyon floor นี้ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของโปรตีน capsid (decapsidation) เพื่อให้เกิดการปล่อยจีโนมของไวรัสเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านต่อไปได้³⁴



ภาพที่ 12 ภาพจำลองโครงสร้างของ ICAM-1receptor

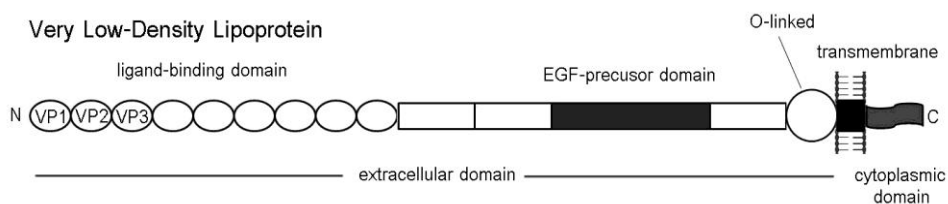


ภาพที่ 13 จำลองกระบวนการ decapsidation ของเชื้อไวรัส HRV กลุ่มหลัก [35]

(1) อ้างอิงจากผลการศึกษา cryo-EM พบว่าส่วน D1 domain ของ ICAM-1 receptor จับกับ canyon floor และ south wall บนโปรตีน capsid (2) เมื่อเกิดการจับของ receptor จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน capsid โดยเฉพาะส่วน north wall และ south wall ของ canyon floor ซึ่งครอบคลุมส่วนโปรตีน capsid VP1 เป็นส่วนหลัก และสันนิษฐานว่าทำให้เกิดการเปิดช่อง 5-fold axis ออกจึงทำให้จีโนมของไวรัสถูกส่งเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้

กลุ่มรอง คือ เชื้อ HRV กลุ่มที่เลือกใช้ very low-density lipoprotein (VLDL) receptor เป็น receptor ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ประกอบด้วยสมาชิก 10 serotype ทำให้จัดว่า LDL-R เป็น receptor รองของเชื้อ HRV (minor receptor)

VLDL เป็นสมาชิกหนึ่งใน LDL superfamily ทำหน้าที่ขนส่งสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis และพบว่าทำหน้าที่เป็น receptor ให้กับไวรัส HRV บาง serotype โครงสร้างของโปรตีน VLDL ประกอบด้วย extracellular domain ได้แก่ ligand-binding domain 8 domain อยู่ทางส่วนปลาย N ของโปรตีน, ส่วน epidermal growth factor (EGF)-precursor domain และ transmembrane segment ซึ่งเชื่อมระหว่างกันด้วยส่วน O-linked glycosylation domain ในส่วนของ cytoplasmic domain นั้นพบว่ามีโปรตีนโมเลกุลเล็กเกาะอยู่ที่ผิวด้านใน (coated pit) เพื่อทำหน้าที่เป็นสัญญาณภายในเซลล์เพื่อควบคุมกระบวนการ endocytosis



ภาพที่ 14 ภาพจำลองโครงสร้างของ VLDL receptor [36]

ถ้าหากพิจารณาการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส (antiviral drug sensitivity) เช่น การตอบสนองต่อยา pleconaril ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อไวรัสตระกูลนี้ ยาชนิดนี้สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ เนื่องจากมีผลยับยั้งกระบวนการ uncoating หรือขัดขวางการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง receptor กับบริเวณ canyon ใน VP1 ทำให้ไม่มีการส่งสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน โดยการแบ่งกลุ่มนั้นพิจารณาจากลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ binding pocket ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน capsid กับยา pleconaril จะสามารถแบ่ง HRV ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ต้านทานยา ประกอบด้วย 92 serotype และกลุ่มที่ต้านทานต่อยา ทั้งหมด 7 serotype ซึ่งประกอบด้วย serotype 4, 5, 42, 84, 93, 97 และ 99 เป็นต้น

ในปัจจุบันนี้การจำแนกเชื้อ HRV อาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นหลัก โดยพิจารณาจากความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนในส่วนต่างๆ ของจีโนมเป็นเกณฑ์ ได้แก่ 5'UTR, capsid protein VP4 หรือ VP1 จะสามารถจัดจำแนก HRV ทั้ง 99 serotype ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ HRV-A ประกอบด้วยสมาชิก 74 serotype และ HRV-B ประกอบด้วยสมาชิก 25 serotype และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์กับการจับกลุ่มทางวิวัฒนาการ ร่วมกับการเลือกใช้ receptor ของไวรัส พบว่าไวรัสกลุ่มที่ใช้ ICAM-1 ทั้งหมด 89 serotype นั้น ประกอบด้วยสมาชิกจาก HRV-A 64 serotype และ HRV-B 25 serotype ตามลำดับ ในขณะที่สมาชิกของ HRV-B อีก 10 serotype นั้น จะเลือกใช้ LDL-R เป็น receptor

จากผลการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic analysis ของข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HRV พบว่า serotype 87 มีการจับกลุ่มแยกออกมาจากสมาชิก HRV โดยพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับ HEV-68 มากกว่า HRV แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า HRV-87 ยังคงคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อ HRV ไว้ คือ ไม่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด แตกต่างกับเชื้อ HEV แสดงให้เห็นว่า HRV-87 มีลักษณะร่วมระหว่างเชื้อ HRV และ HEV และเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ น่าจะมีวิวัฒนาการร่วมกันมา

การจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีการอื่นๆ เนื่องจากให้ผลที่ถูกต้องและรวดเร็วมากกว่าการทำ capsid serotyping โดยกำหนดให้ HRV ชนิดใดๆ ที่มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide identity) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ prototype ต่ำกว่า 80% จัดได้ว่าเป็น HRV ต่าง strain แต่ด้วยวิธีการนี้ก็ยังจัดแบ่ง HRV ได้เป็น 2 สายพันธุ์หลัก จนกระทั่งในปี 2006 ได้มีรายงานการค้นพบ HRV สายพันธุ์ใหม่ (HRV-C) ซึ่งแยกได้จาก

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนโปรตีน capsid VP4/VP2 และ VP1 และเป็นสายพันธุ์ที่มี อัตราการระบาดใกล้เคียงกับ HRV-A และพบมากในผู้ป่วยเด็กที่มีการติดเชื้อในทางเดินหายใจ ส่วนล่างที่แสดงอาการหายใจมีเสียงวี๊ด (wheezing) หรือเป็นหอบหืด ทำให้นักวิจัยให้ความสนใจ กับ HRV-C สายพันธุ์ใหม่นี้ ในฐานะที่เป็นไวรัส ที่อาจจะก่อให้เกิดการพัฒนาของโรคทางเดิน หายใจเรื้อรังและโรคหอบหืดได้ และนอกจากนี้ยังพบว่า HRV-C มีแนวโน้มต้านทานต่อยา pleconaril ด้วย แต่อย่างไรก็ตามนับตั้งแต่มีการค้นพบ HRV-C จนกระทั่งถึงปัจจุบันนั้น ใน ฐานข้อมูล NCBI ได้มีรายงานข้อมูลของจีโนมเพียง 9 strain เท่านั้น ประกอบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ นี้ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์ทดลองได้ จึง ทำให้ข้อมูลสำหรับการศึกษาระบาดวิทยา ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์กับการก่อโรค และข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อนั้นมียู่อย่างจำกัด

พยาธิกำเนิดและภูมิคุ้มกัน^[37]

กลไกในการก่อโรคและลักษณะอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ HRV ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เนื่องจากผู้ป่วยมักมีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย โดยเชื่อว่ากลไกการตอบสนองของร่างกาย เมื่อเชื้อไวรัสสุกรานเข้าสู่เซลล์เยื่อบุตา, เยื่อบุโพรงจมูก หรือเยื่อบุในระบบทางเดินหายใจ ชนิดอื่นๆ ที่มี receptor จำเพาะต่อไวรัส HRV แล้ว จะส่งผลให้เซลล์เยื่อบุชนิด columnar บริเวณนั้นตาย และหลุดลอกออก และกระตุ้นให้เซลล์รอบข้างเกิดอาการอักเสบด้วย ทำให้อาการทั่วไปที่พบในผู้ ติดเชื้อ HRV คือ เจ็บคอ และมีไข้ เมื่อมีเซลล์ติดเชื้อไวรัส ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะถูก กระตุ้นเพื่อให้สามารถกำจัด เชื้อไวรัสออกจากร่างกายได้ ทั่วไปการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เริ่มจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (innate immunity) เพื่อควบคุมการ เพิ่มจำนวนของไวรัสในขั้นแรก จากนั้นจึงกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) ต่อไป

เชื้อไวรัส HRV กว่า 90% มักอาศัย ICAM-1 เป็น receptor ทำให้สามารถทำนายกลไก การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ได้ โดยอาศัย จากคุณสมบัติของ ICAM-1 โดยทั่วไป ICAM-1 คือ โกลโคโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปบนผิวเซลล์เยื่อบุ มีหน้าที่ควบคุมการ สะสมของ เซลล์ lymphocyte (lymphocyte trafficking) ในบริเวณที่มีการติดเชื้อและอักเสบ ผ่านการทำงานของ antigen 2 ชนิดบนผิวเซลล์ ได้แก่ lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) และ macrophage-1 antigen (Mac-1) เซลล์เยื่อบุผิวทางเดินหายใจ นอกจากทำหน้าที่ เป็นเซลล์

เป้าหมายของเชื้อ HRV แล้ว ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเซลล์รอบๆ เซลล์ที่ติดเชื้อ และเนื้อเยื่อบริเวณนั้น เพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ HRV ด้วย โดยกลไกการกระตุ้นการทำงาน เชื่อว่ามาจากกรณีที่ไวรัสมีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว แต่จะเกิดการสร้าง RNA สายคู่ (double-stranded RNA-mediated pathway) เมื่อมีการจำลองสายจีโนม ซึ่งโครงสร้าง RNA สายคู่นี้จัดเป็น intermediate RNA structure ที่เกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเมื่อ RNA สายบวกและสายลบยังไม่แยกออกจากกัน และสภาพที่มี RNA สายคู่นี้ นับเป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งไม่พบในเซลล์ปกติ ร่างกายจะสามารถแยกสิ่งแปลกปลอมนี้ได้ และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมนั้น โดย เหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งสาร inflammatory chemokine และ cytokine หลายชนิด เพื่อทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณนั้นต่อไป สารสำคัญเหล่านี้ ได้แก่

(1) Interleukin (IL)-1, 16 และ 18

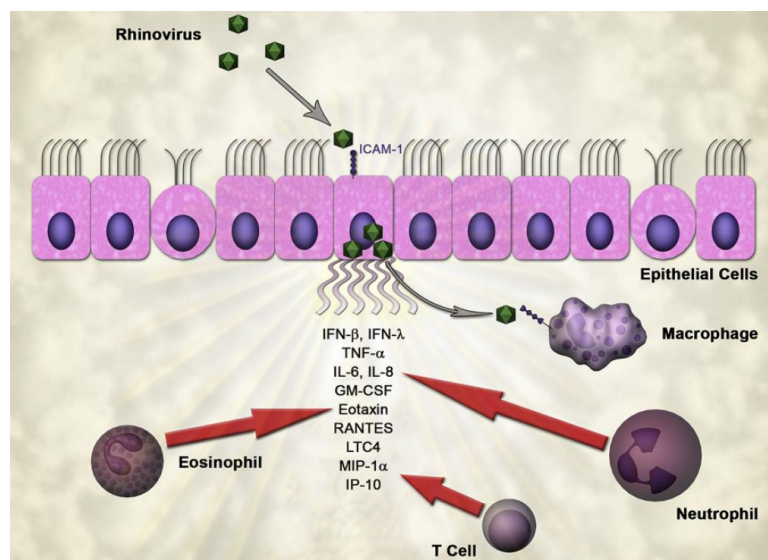
เป็น IL ที่เกี่ยวข้องกับการระดมการอักเสบของเซลล์ มีหน้าที่หลักควบคุมการทำงานของเซลล์ neutrophil ตามปกติแล้ว IL-1 ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ neutrophil, เซลล์ epithelial และเซลล์ endothelial จากการกระตุ้นโดยสารพิษต่างๆ ที่เซลล์ สร้างขึ้น หรือจากจุลชีพ ทั้งแบคทีเรียและไวรัส การเพิ่มขึ้นของ IL-1 นั้น ส่งผลให้ยีนสร้าง ICAM-1 และ TNF- α มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้เพิ่ม receptor ที่จำเพาะต่อไวรัส HRV ด้วย โอกาสในการที่อนุภาคของไวรัสจะเกิดการจับกับ receptor จึงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ IL-1 ยังทำหน้าที่การควบคุมการสร้างสารย้อนกลับ (positive feedback) ทำให้มาเพิ่มการสร้างสาร IL-1 ได้อีกด้วย รวมทั้งกระตุ้นการสร้างสาร IL-6, IL-8, และ GM-CSF ซึ่งเป็นสารที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ neutrophil และ eosinophil

สาร IL-6 มีหน้าที่กระตุ้นสารที่ใช้ ในการตอบสนองต่อภาวะเฉียบพลันในเซลล์ (acute-phase reactant) และเกี่ยวข้องกับการเกิด class-switch ของ Ig มาเป็น IgG1 ในขณะที่สาร IL-8 นั้น เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ neutrophil เพื่อมาสะสมยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย อย่างไรก็ตามการสร้างสาร IL-6 ถูกยับยั้งได้ด้วยการทำงานของ glucocorticoid, IL-4 และ IL-13 และ IL-8 ถูกยับยั้งได้ด้วย IL-4 ซึ่งสร้างจากการเหนี่ยวนำของ IgE

(2) GM-CSF และ eotaxin

สารในกลุ่มนี้จัดเป็นสารสำคัญต่อการอยู่รอด ของเซลล์, กระบวนการแบ่งเซลล์ และการตอบสนองต่อสื่อเคมี (chemotaxis) ของเซลล์ eosinophils และ mast cell

eotaxin จะทำงานร่วมกับ IL-5 ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ eosinophil และในกระบวนการ degranulation โดย eotaxin-1 และ 2 เป็นสารที่สำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์ eosinophil มาสะสมที่เนื้อเยื่อปอด ในขณะที่ eotaxin-3 เกี่ยวข้องกับการสะสมของเซลล์ esophageal eosinophil ในบริเวณที่มีการติดเชื้อ



ภาพที่ 15 การตอบสนองของเซลล์เยื่อปอดต่อการติดเชื้อ HRV

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immune cell response)

ในการกำจัดเชื้อไวรัส HRV โดยการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันรูปแบบนี้ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นครั้งแรก โดยมีรูปแบบ การตอบสนองด้วยวิธีที่ไม่ซับซ้อนมาก อาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์ที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่

(1) เซลล์ Natural Killer (NK cell)

จัดเป็นเซลล์สำคัญของ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เพื่อการกำจัดเซลล์ติดเชื้อไวรัสในเบื้องต้น หรือเพื่อกำจัดเซลล์ให้เกิดการตายแบบ apoptosis พร้อมทั้งมีส่วนช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะด้วย กลไกการทำงานของ NK cell นั้นใช้การควบคุมด้วยสมดุลของ killer receptor ของเซลล์ 2 ชนิด คือ inhibitory receptor และ activating receptor

โครงสร้างของ inhibitory receptor นั้นคล้ายกับ Ig receptor มีหน้าที่จดจำกับโมเลกุลของ human leukocyte antigen (HLA)-A, HLA-B และ HLA-C และ lectin-like CD94/NKG2A

receptor ซึ่งจะมีการเชื่อมต่อกับโมเลกุล HLA-E และส่งผลให้ NK cell สามารถจดจำเซลล์ปกติของร่างกายได้ผ่านการจดจำโมเลกุล MHC-class I เมื่อเซลล์เกิดการติดเชื้อไวรัส จะมีผลทำให้ระดับสมดุของ killer receptor และความสามารถในการจดจำโมเลกุล MHC-class I เสียไป และ NK cell จะอาศัยกลไกเหล่านี้ในการแยกเซลล์ติดเชื้อออกจากเซลล์ปกติได้ ในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยอาศัยการทำงานของ NK cell นั้น พบว่า NK cell จะหลั่งสาร cytokine ที่สำคัญหลายชนิดเพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน อาทิเช่น หลั่งสาร IFN- γ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ macrophage หรือ antigen-specific cytotoxic T cell เพื่อให้เกิดการกำจัดเซลล์ติดเชื้อต่อไป

(2) เซลล์ Neutrophil

เมื่อนำสารคัดหลั่งของผู้ป่วยอาการหอบหืดที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ HRV มาตรวจวิเคราะห์ พบว่ามีเซลล์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด เซลล์ที่ตรวจพบได้มากที่สุด คือ เซลล์ neutrophil การเพิ่มขึ้นของเซลล์ชนิดนี้ รวมทั้งกระบวนการสลายแกรนูโลภายในเซลล์ (neutrophil degranulation) ส่งผลทำให้ทางเดินหายใจส่วนล่างตีบตันและเกิดการพัฒนาเป็นโรคหอบหืดได้

(3) เซลล์ Macrophage

เซลล์ macrophage เป็นเซลล์ที่พบได้มากที่สุดในทางเดินหายใจ พบว่าเชื้อ HRV สามารถรุกรานเซลล์ชนิดนี้ได้ แต่จะถูกจำกัดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคไวรัสกับเซลล์ macrophage กระตุ้นให้เซลล์หลั่งสาร proinflammatory cytokine หลายชนิด เช่น IL-1, IL-8, TNF- α , IFN- γ และ macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α การเพิ่มขึ้นของระดับ TNF- α นั้นส่งผลกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 เพื่อใช้ในกระบวนการ leukocyte trafficking และยังทำหน้าที่เป็น receptor หลักของเชื้อ HRV ในเซลล์เยื่อบุด้วย จึงเพิ่มโอกาสการเข้าเซลล์ของไวรัสเพิ่มขึ้นได้ทางอ้อม นอกจากนี้เชื้อ HRV ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้างของ IFN-type1 ได้ สาร IFN- α ถูกสร้างจากเซลล์ macrophage ในทางเดินหายใจ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในระยะ antiviral state ของเซลล์เยื่อ

(4) เซลล์ Eosinophil

การติดเชื้อ HRV ภายในเซลล์นั้น ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ eosinophil infiltration และการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ eosinophil จากผลการศึกษาในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HRV และแสดงอาการใช้หวัดธรรมดา เปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีอาการหอบหืด พบว่าผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มมี

ปริมาณเซลล์ชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้น และในผู้ป่วยกลุ่มที่แสดงอาการหอบหืดเท่านั้น ที่มีระดับของเซลล์ eosinophil สูงนาน 6-8 สัปดาห์ นับตั้งแต่เกิดการติดเชื้อ HRV และสันนิษฐานว่าปริมาณเซลล์ eosinophil ที่เพิ่มขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสนี้ มีความเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการตอบสนองของทางเดินหายใจให้มีความไวต่อสิ่งกระตุ้นมากกว่าปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุของการพัฒนาเป็นโรคหอบหืดต่อไป (airway hyperresponsiveness)

เซลล์ eosinophil สามารถต้านการติดเชื้อไวรัสได้ โดยการสร้างและหลั่งเอนไซม์ ribonuclease ออกมาทำลาย RNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HRV และยังมีส่วนช่วยลดโอกาสในการเกิดระบบหายใจทำงาน ผิดปกติด้วย นอกจากนี้เซลล์ eosinophil ยังทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอ antigen ให้กับเซลล์อื่นในระบบภูมิคุ้มกัน (antigen-presenting cell) เพื่อให้เกิดการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ โดยการสร้างโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ naive CD4⁺ T lymphocyte (MHC class II protein) และส่งผลต่อกระบวนการ T cell proliferation และการหลั่งสาร IFN- γ ได้ ถ้าหากเปรียบเทียบผลการทำงานของเซลล์ eosinophil และ macrophage นั้น พบว่าเซลล์ eosinophil สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ eosinophil อาจถูกยับยั้งได้ถ้าหากในเซลล์นั้นเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย หรือเป็นสภาวะที่มี bacterial superinfection

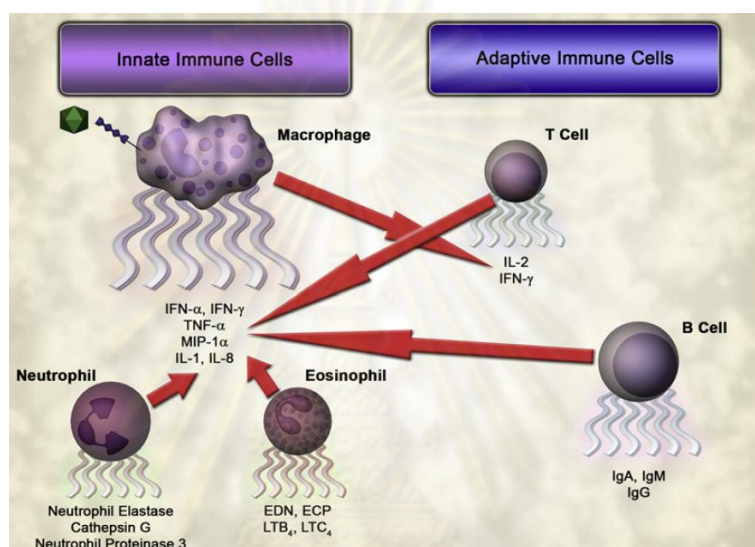
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune cell response)

การตอบสนองโดยการทำงานของ T lymphocyte

จากผลการศึกษา bronchial biopsy ในผู้ป่วยโรคหอบหืดซึ่งติดเชื้อ HRV เปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ พบว่าเซลล์เยื่อและเซลล์เยื่อเมือกในทางเดินหายใจ มีการสะสมเซลล์ T lymphocyte ที่มาจากกระบวนการ airway lymphocyte infiltration และ peripheral blood lymphopenia ซึ่งส่งผลให้หลอดลมของผู้ป่วยตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหรือสิ่งแปลกปลอมมากกว่าปกติ โดยกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสาร T_H1 cytokine, IFN- γ และ IL-2 สารเหล่านี้มีผลต่อการทำงานของ IFN- γ -inducible protein (IP)-10 ซึ่งสำคัญต่อกระบวนการ T-cell chemotaxis อีกทั้งยังช่วยสนับสนุนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วย (T_H1-cell-specific apoptosis) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ปัจจุบันเชื่อว่าผลจากการทำงานของเซลล์ประเภทนี้ ทำให้เกิดอาการในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคหอบหืดด้วย

การตอบสนองโดยการทำงานของ B lymphocyte

จากผลการศึกษาใน *in vivo* พบว่าหลังจากเซลล์ทดลองได้รับเชื้อ HRV จะมีระดับการสร้างสาร mucosal IgA เพิ่มขึ้นประมาณวันที่ 3 หลังการติดเชื้อ และจะเริ่มสร้าง IgM และ IgG ภายในวันที่ 7-8 ซึ่งการเพิ่มปริมาณของ antibody เหล่านี้ มีความสัมพันธ์ต่ออาการไข้หวัดและปริมาณเชื้อไวรัสในผู้ป่วยด้วย และพบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ neutralization ของ IgG นี้ มีส่วนช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อ HRV ชนิดเดิมซ้ำซ้อนได้

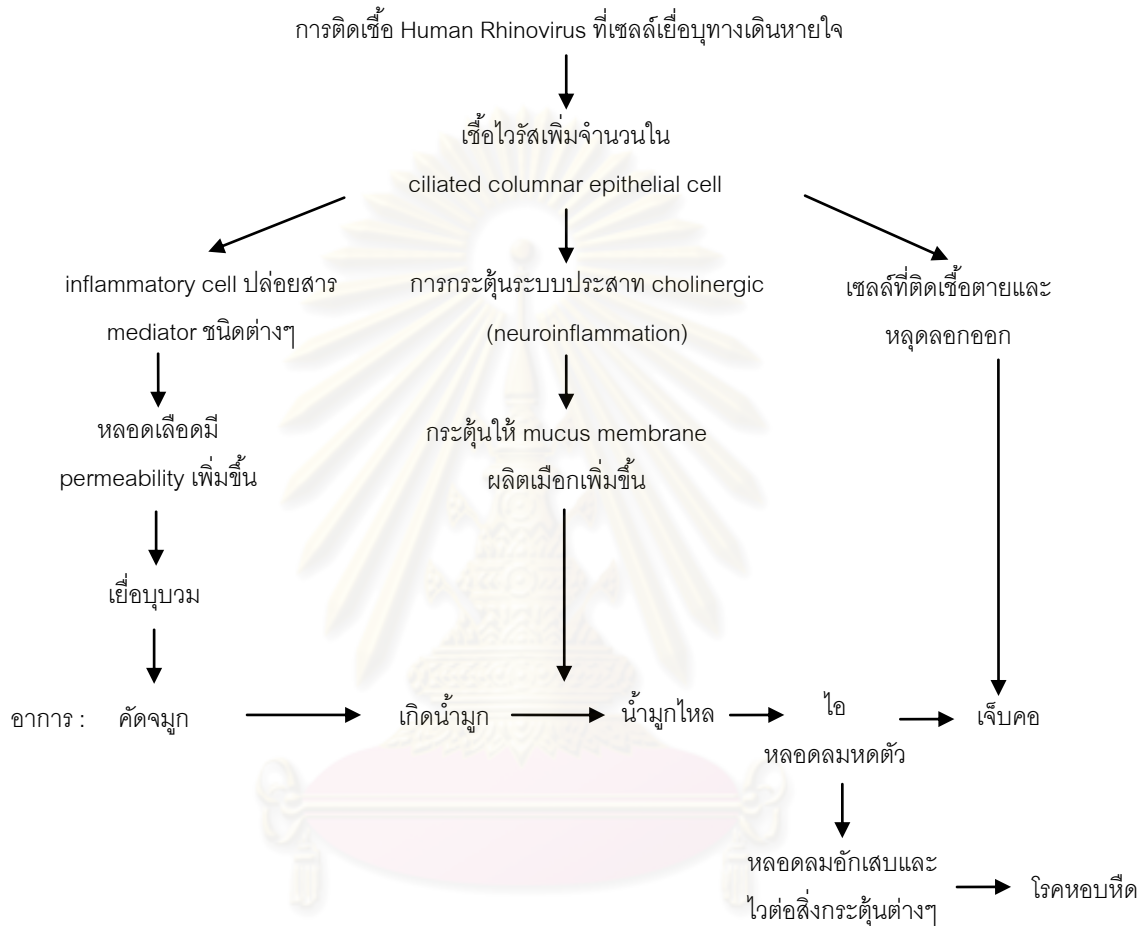


ภาพที่ 16 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HRV

ลักษณะอาการทางคลินิกและการรักษา

ในผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ HRV แสดงอาการหลากหลายและมีระดับความรุนแรงของโรคปานกลางจนถึงมาก นับตั้งแต่การเกิดโรคไข้หวัดธรรมดา ไปจนถึงอาการปอดอักเสบ หลอดลมอักเสบและโรคหอบหืดเรื้อรัง ขึ้นกับบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดยเมื่อร่างกายได้รับเชื้อ HRV เข้าไป เชื้อจะใช้ระยะฟักตัวประมาณ 1-4 วันจึงเริ่มแสดงอาการ และจะเกิดอาการที่ รุนแรงที่สุดในช่วงวันที่ 3-7 หลังติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันจะเริ่มตอบสนองต่อการติดเชื้อ ไวรัส โดยอาศัยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเมื่อเกิดการติดเชื้อในครั้งแรก (primary infection) และถ้าหากร่างกายเคยติดเชื้อชนิดนั้นมาแล้ว (secondary infection) จะอาศัยการทำงาน neutralizing antibody ร่วมด้วย นอกจากสารต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว ร่างกายยังตอบสนองต่อการติดเชื้อ HRV โดยกระตุ้น การหลั่งสารชนิดอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการทำงานของทางเดินหายใจอีกมากมาย เช่น

bradykinin เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดรอบๆ เยื่อบุทางเดินหายใจมีความสามารถในการควบคุม การผ่านเข้าออกของสาร (permeability) เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการบวมของเยื่อ และส่งผลให้เกิด อาการคัดจมูก แน่นจมูก อีกทั้งมีการกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาท cholinergic ซึ่งจะทำให้ เกิดการหลั่งสารเมือกเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดน้ำมูกใสร่วมด้วย^[38]



แผนภาพที่ 2 แสดงการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อ HRV

ลักษณะอาการที่พบประจำ ได้แก่ ไอ (cough), หวัดลงคอ (sore throat) และเยื่อโพรง จมูกอักเสบ (coryza) นอกจากนี้อาจพบอาการปวดหัวและเป็นไข้ร่วมด้วย ทั้งนี้ระยะเวลาในการ แสดงอาการจะแตกต่างกันไป แต่จะบุคคลและระยะเวลาในการรักษาโดย เฉลี่ย เท่ากับ 2 สัปดาห์ โดยทั่วไปในผู้ป่วยเด็กมักจะมีภาวะช่องหูอักเสบอย่างรุนแรง เนื่องจากเกิดการติดเชื้อที่ช่องหู ส่วนกลางการติดเชื้อ HRV พบในบริเวณ respiratory-salivary route ทำให้การถ่ายทอดเชื้อสู่ผู้อื่น เกิดจากการสัมผัสหรือเป็นการถ่ายทอดมาทางอากาศได้ โดยพบว่า การติดเชื้อ HRV นั้นพบในเด็ก เล็กมากกว่าในผู้ใหญ่ โดยเฉพาะในเด็กอายุประมาณ 2 เดือน - 2 ปี ซึ่งผลจากการศึกษาทาง

serology ในผู้ป่วยแรกเกิดจนกระทั่งอายุ 35 ปี พบว่ามีปริมาณของ neutralizing antibody เพิ่มขึ้นตามช่วงวัย จึงทำให้ในวัยผู้ใหญ่พบการติดเชื้อ HRV น้อยกว่าในเด็กเล็ก และการระบาดของ HRV นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับสภาพอากาศด้วย โดยเฉพาะแล้วโอกาสที่จะตรวจพบ HRV นั้นมีอยู่ตลอดทั้งปี แต่จะมีการติดเชื้อมากในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว

การรักษาอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ HRV นั้น มียาต้านไวรัสหลายชนิด (ตารางที่ 2) ตัวอย่างของยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ยา pleconaril ในระยะเริ่มแรกยา pleconaril ถูกออกแบบมาในรูปแบบของยากิน เพื่อใช้รักษาอาการไข้หวัด (common cold) แต่ไม่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration (FDA)) เนื่องจากพบผลข้างเคียงจากการใช้ยาชนิดนี้ โดยพบว่าเกิดการกระตุ้นการทำงานของ cytochrome P450 3A enzyme^[39] อีกทั้งยังไม่มีผลการระบุผลข้างเคียงที่ชัดเจน ต่อมาจึงมีการพัฒนายา pleconaril ให้เป็นรูปแบบยาพ่นทางจมูกเพื่อรักษาอาการไข้หวัดและโรคหอบหืดจากการติดเชื้อ HRV ซึ่งได้ผ่านการพัฒนายาใน phase II แล้ว ในปัจจุบันยาชนิดนี้อยู่ในระหว่างการทดลองใช้ เพื่อศึกษาผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นต่อไป^[40]

ความจำเพาะของยา pleconaril ต่อ drug susceptibility ของเชื้อ HRV นั้น กำหนดด้วยกรดอะมิโนบางตำแหน่งใน hydrophobic pocket ของโปรตีน capsid VP1 โดยพบว่าเชื้อ picornavirus บางสายพันธุ์สามารถต้านทานต่อฤทธิ์ยา pleconaril ได้ (natural resistant virus) และเชื้อ HEV บางสายพันธุ์อาจเปลี่ยนแปลงเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสได้ (resistant mutant virus) และส่งผลให้ก่อโรคที่มีอาการรุนแรงมากขึ้น ตัวอย่างเช่น ในการศึกษา pleconaril resistant strain ของ Coxsackie virus B3 (CVB3) ในหนูทดลอง พบว่าเชื้อไวรัสก่อโรคที่รุนแรงมากขึ้น (high virulent) และพบการติดเชื้อ CVB3 ในหัวใจของหนูทดลอง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค chronic myocarditis ได้^[48-50] แต่สำหรับเชื้อ HRV นั้น มีเพียง 7 serotype จากทั้งหมด 99 serotype ที่ต้านทานต่อยาชนิดนี้^[9] ทำให้ยา pleconaril ยังคงเป็นที่สนใจศึกษาถึงประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของยา ประกอบกับ ยังไม่มีรายงานว่าการติดเชื้อ HRV สายพันธุ์เหล่านี้ จะก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงมากกว่าสายพันธุ์อื่นหรือไม่ ทำให้การตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ HRV ในผู้ป่วยจึงมีความสำคัญต่อการวางแผนรักษาผู้ป่วยและการพัฒนายาต้านไวรัส HRV ต่อไป

ตารางที่ 2 สรุปชนิดของยาต้านเชื้อไวรัส HRV

ชนิดของยา	ผลต่ออนุภาคไวรัส	ฤทธิ์ของยา	ผลข้างเคียง
IFN- α ^[41-43]	กระตุ้นการทำงานของเซลล์	ลดการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ แต่ต้องได้รับยาภายใน 24 ชม.	เป็นพิษต่อเซลล์
Pirodavis (R77957) ^[28,41]	จับบนโปรตีน capsid	ออกแบบมาในรูปของยาพ่น สามารถยับยั้งได้ทั้ง HRV-A และ HRV-B ต้องใช้ยา 3-6 ครั้งต่อวัน	ทำให้ระคายเคืองและกระตุ้นการสังเคราะห์เมือก
WIN 54954 ^[41,44]	จับบนโปรตีน capsid	ให้ผลยับยั้งเชื้อได้ดีในหนูทดลอง	ประสิทธิภาพของยาลดลงเมื่อทดลองใช้ในคน
Pleconaril ^[7,41]	จับบนโปรตีน capsid	บรรเทาอาการได้ภายใน 1-2 วัน มีฤทธิ์ดีกว่า Pirodavis แต่พบว่าเชื้อ HRV บางชนิดต้านทานยาได้	Pleconaril ในรูปยาพ่น อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้
BTA798 ^[45]	จับบนโปรตีน capsid	ให้ผลยับยั้งเชื้อดีและปลอดภัยในสัตว์ทดลอง	มีค่า bioavailability ดี และปัจจุบันยาได้ผ่านการทดลองใน phase I แล้ว
Rupintrivir (AG-7088) ^[41,46]	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3C protease	ผลการทดลองไม่เป็นที่น่าพอใจ	-
Enviroxime ^[43]	โปรตีน 3A	ยับยั้ง <i>in vitro</i> replicative activity	พบผลข้างเคียงใน <i>in vivo</i>
Tremacamra ^[47]	soluble ICAM-1	ช่วยอาการใช้หวัดได้ในกลุ่มทดลอง	พบผลข้างเคียงใน <i>in vivo</i>

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (cross-sectional, descriptive research) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ เป็นตัวอย่าง NP suction แขนงที่เหลือจากการตรวจหาไวรัสทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ซึ่งเก็บส่งตรวจโดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างอย่างเฉียบพลัน (acute lower respiratory tract infection (LRTI)) โดยกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษา คือ ผู้ป่วยเด็กซึ่งมีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2006 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2007 รวมเป็นระยะเวลา 1 ปี ข้อบ่งชี้ในการคัดเลือกผู้ป่วยเพื่อใช้เป็นกลุ่มตัวอย่าง (inclusion criteria) คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคหลอดลมฝอยอักเสบเฉียบพลัน (acute bronchiolitis) หรือเป็นโรคปอดอักเสบในชุมชน (community acquired viral pneumonia (CAP)) ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครองของผู้ป่วยก่อนแล้ว มีดังนี้

เกณฑ์ในการวินิจฉัยผู้ป่วยว่าเป็นโรคหลอดลมฝอยอักเสบเฉียบพลัน คือ ผู้ป่วยแสดงอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งอาจจะมีหรือไม่มีไข้ร่วมด้วย มีลักษณะ abnormal lung auscultation (rhonchi หรือ wheeze) ร่วมกับผลการเอ็กซเรย์ปอดแสดง hyperinflation

ผู้ป่วยที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคปอดอักเสบในชุมชน (CAP) คือ มีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และมีภาวะหายใจเร็วกว่าปกติ (tachypnea) โดยมีอัตราการหายใจ (respiratory rate (RR)) แบ่งตามช่วงอายุของผู้ป่วยได้ดังนี้

อายุต่ำกว่า 2 เดือน ; RR > 60/min อายุตั้งแต่ 2-12 เดือน ; RR > 50/min

อายุตั้งแต่ 1-5 ปี ; RR > 40/min อายุมากกว่า 5 ปีขึ้นไป ; RR > 30/min

ร่วมกับมีไข้ (37.8°C) และมี abnormal lung auscultation (rhonchi, crackle หรือ wheeze) ผลการเอ็กซเรย์ปอดแสดงลักษณะบ่งชี้ของ pneumonia เช่น consolidation หรือ perihilar infiltrate

ข้อบ่งชี้ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากศึกษา (exclusion criteria) ประกอบด้วย ผู้ป่วยที่มีประวัติการคลอดก่อนกำหนด, เป็นผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน, เป็นผู้ที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเรื้อรัง หรือไม่ได้รับการยินยอมจากผู้ปกครองของผู้ป่วย โดยโครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม กระทรวงสาธารณสุข และได้ทำการขออนุญาตใช้ตัวอย่างที่เหลือเพื่อการศึกษาเชื้อก่อโรคอื่นๆ จากอธิบดีกรมควบคุมโรคติดต่อแล้ว

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

ในการคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV ในประเทศไทย ได้อาศัยข้อมูลการระบาดของเชื้อ HRV ในภูมิภาคอื่นที่รายงานในฐานข้อมูลเป็นข้อมูลเปรียบเทียบ พบว่าการระบาดในภูมิภาคเอเชียและภูมิภาคอื่นๆ ทั่วโลกนั้น มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 45% ^[5, 10-11, 51-52]

$$\text{สูตรการคำนวณ ; } n = \frac{Z^2PQ}{d^2}$$

กำหนดให้ ค่า Z ที่ระดับความเชื่อมั่น (confident interval (CI)) ที่ 95% = 1.96

ค่า d คือ ความคลาดเคลื่อน กำหนดให้เท่ากับ 20% ของอัตราการระบาดของเชื้อ HRV ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง

P = ค่าเฉลี่ยของอัตราการตรวจ HRV ในภูมิภาคต่างๆ = 45%

Q = 1-P = 55%

$$\text{แทนค่าลงในสูตรคำนวณ ; } n = \frac{(1.96)^2 * (0.45) * (1-0.45)}{((20/100) * 0.45)^2} = 117.38$$

ดังนั้นต้องทำการศึกษาจากตัวอย่างในประเทศไทยอย่างน้อย 118 ตัวอย่าง

ในการศึกษาวิจัยนี้มีตัวอย่าง NP suction ที่เก็บได้จากกลุ่มประชากรศึกษาทั้งหมด 289 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย LRTI จำนวน 286 ราย ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา จึงสรุปได้ว่าจากจำนวนตัวอย่างที่มีนั้น สามารถใช้เป็นตัวแทนของการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV ในประเทศไทยได้ ซึ่งจะให้ผลการศึกษาเป็นที่น่าเชื่อถือได้

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- (1) Pipet tip: 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Elkay, Ireland)
- (2) Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)
- (3) Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- (4) Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500ml, 1000 ml (Pyrex ,USA)
- (5) Flask: 250 ml, 500 ml, 1000ml (Pyrex,USA)
- (6) Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran,USA)
- (7) Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- (8) Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- (9) Parafilm (American Nation Can,USA)
- (10) Plastic wrap
- (11) Stirring-magnetic bar
- (12) Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- (13) 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), P1000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- (14) Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- (15) Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- (16) Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- (17) Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
- (18) Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)
- (19) Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- (20) Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany)
- (21) Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- (22) Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- (23) Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- (24) Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)
- (25) Freezer -20°C (Sanyo, Japan)

- (26) Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)
- (27) Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)
- (28) Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Viral transport media สำหรับการเก็บตัวอย่าง NP suction

- (1.1) Phosphate buffer saline ปริมาตร 2 ml
- (1.2) Antibiotic (2 million units/l Penicillin G และ 200 mg/l Streptomycin)

2. สารเคมีสำหรับการสกัด RNA (RNA Extraction) ด้วยวิธี Guanidium-isothiocyanate-(2, 10)- β -mercaptoethanol

- (2.1) Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)
- (2.2) Guanidium thiocyanate (Sigma, Singapore)
- (2.3) Absolute ethanol (Sigma, Singapore)
- (2.4) Glycogen (USB, Ohio)
- (2.5) Isopropanol (Sigma, Singapore)
- (2.6) Sodium acetate (Sigma, Singapore)
- (2.7) Phenol (Pierce, USA)
- (2.8) Chloroform (Sigma, Singapore)
- (2.9) Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)

3. สารเคมีสำหรับการทำ Reverse transcription เพื่อเตรียม cDNA template

- (3.1) Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, USA)
- (3.2) deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Promega, USA)
- (3.3) Random hexamer (Promega, USA)
- (3.4) RNase inhibit (Promega, USA)
- (3.5) 5x MMLV Buffer (Promega, USA)

4. สารเคมีสำหรับการทำ PCR

- (4.1) Master mix solution (Eppendorf, Germany)
- (4.2) Distill water (DW)
- (4.3) PCR primer: forward primer (F) และ reverse primer (R)
- (4.4) cDNA template หรือ DNA template
- (4.5) $MgCl_2$

5. สารเคมีสำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis

- (5.1) Agarose molecular grade (Promega, USA)
- (5.2) 1x Tris borate buffer (1x TBE)
- (5.3) Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

6. สารเคมีสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

- (6.1) HiYield™ Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)
- (6.2) Isopropanol (Sigma, Singapore)

7. สารเคมีสำหรับการทำโคลนนิ่ง (Cloning)

- (7.1) Ampicillin (Pharmacia, Hong Kong)
- (7.2) Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (Bio Basic, Germany)
- (7.3) Magnesium sulfate (Sigma, Singapore)
- (7.4) Sodium chloride (Sigma, Singapore)
- (7.5) Tryptone (Giboco BRL, USA)
- (7.6) Yeast extract (Giboco BRL, USA)
- (7.7) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Bio Basic, Germany)
- (7.8) pGEM-T Easy Vector System I (Promega, USA)
- (7.9) Glucose (Giboco BRL, USA)

8. สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด

- HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง Nasopharyngeal (NP) Suction

1. เก็บตัวอย่าง NP suction จากผู้ป่วยภายใน 48 ชั่วโมงหลังเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยเก็บลงใน Viral transport media ซึ่งประกอบด้วย Phosphate buffer saline ปริมาตร 2 ml ผสมกับ antibiotic (2 million units/l Penicillin G และ 200 mg/l Streptomycin)
2. ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex นาน 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเก็บสารละลายใส่ในหลอด 1.5 ml แบ่งให้ได้ประมาณ 3 หลอด เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -70°C

การสกัด RNA ด้วยวิธี Guanidium-isothiocyanate

1. เตรียมหลอดขนาด 1.5 ml ใส่สารละลาย GTC Mix ซึ่งเป็นสารผสมของ GTC และ methanol ในอัตราส่วน 1:2 [GTC 9000 μl เติม β -mercaptoethanol 70 μl] ปริมาตร 500 μl จากนั้นเติมตัวอย่าง 100 μl แล้วนำไป vortex นาน 15 วินาที
2. เติมสารละลาย 2M NaOAC ปริมาตร 50 μl และ phenol ปริมาตร 500 μl และ CH_2Cl_2 : IAA (49:1) ปริมาตร 100 μl ลงในหลอด
3. ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปแช่เย็นที่ -20°C เป็นเวลา 15 นาที
4. นำมาปั่นที่ความเร็ว 13,500 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที
5. เตรียมหลอดใหม่ เติม glycogen (20mg/ml) 4 μl และเติม Isopropanol 600 μl
6. ผสมสารในหลอดให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปแช่ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -70°C ซ้ำมคืน
7. นำหลอดที่แช่ -70°C ออกมา วางไว้ที่อุณหภูมิต่ำของจนสารภายในหลอดละลายหมด
8. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,500 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนสารละลายด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนที่ก้นหลอดไว้
9. เติมสารละลาย 70% EtOH ปริมาตร 500 μl ลงในหลอด กลับไปมาเพื่อล้างตะกอนให้สะอาด แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง และปั่นด้วยความเร็วสูงสุดอีก 5 นาที

10. คูดสารละลาย 70% EtOH ออก จากนั้นทำการอบตะกอนเพื่อระเหย EtOH ออกให้หมด และทำให้ตะกอนแห้งภายใน Vacuum นาน 5 นาที
11. ละลายตะกอน RNA ด้วย diethyl-pyrocarbonate treated water (DepC) 12 μ l ได้เป็น สารละลาย RNA

การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse transcription

เตรียมสารละลายสำหรับการทำ reverse transcription ดังต่อไปนี้

- 5x MMLV Buffer	5.0	μ l
- 10 uM dNTP	5.0	μ l
- Random hexamer	1.0	μ l
- RNase inhibitor	1.0	μ l
- MMLV reverse transcriptase	1.0	μ l

จากนั้นเติม RNA 12.0 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

การตรวจสอบผลการสกัด RNA และผลการทำ reverse transcription

ตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ที่เตรียมได้ด้วยวิธี PCR โดยตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งจัดเป็น universal housekeeping gene โดยปริมาตรของสารละลาย, ชนิดของไพรเมอร์ และสภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR แสดงดังตารางที่ 3-4 ตามลำดับ วิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลความเข้มข้น 2% agarose gel ในการแยกหาขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่ต้องการ ซึ่ง 2% agarose gel เป็นค่าความเข้มข้นของเจลที่ให้ขนาดรูพรุนของเจล เหมาะสำหรับการแยกวิเคราะห์สาร DNA ขนาด 0.2 - 1 kb เปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp Ladder (DNA marker) นำเจลที่ได้จากการทำ electrophoresis มาแช่ในสารละลาย ethidium bromide เพื่อย้อมดูแถบของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการตรวจสอบภายใต้ UV โดยขนาดของผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH มีขนาดเท่ากับ 491 nt

การเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR amplification

ส่วนที่ 1 เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV ในประเทศไทย

1. ออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกยีน VP4 และนำ cDNA ที่ได้มาทำ semi-nested PCR

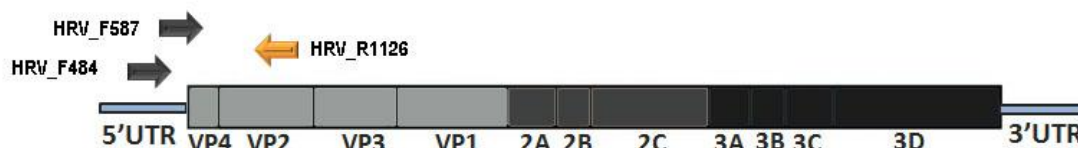
ออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกยีนสร้างโปรตีน capsid VP4 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ HRV เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในสารตัวอย่าง และเพื่อการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับโมเลกุลของเชื้อ HRV โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRV ในส่วน 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank เป็นลำดับอ้างอิงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ในรอบที่ 1 ซึ่งได้มาจากการทำ PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ HRV_F484/HRV_R1126 มีขนาดเท่ากับ 642 nt และผลิตภัณฑ์จากรอบที่ 2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HRV_F587/HRV_R1126 มีขนาดเท่ากับ 539 nt โดยใช้ปริมาตรของสาร, ชนิดของไพรเมอร์ และสภาวะที่ใช้สำหรับการทำ semi-nested PCR แสดงดังตารางที่ 3-5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาตรของสารต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทำ PCR

สาร	ปริมาตร (μl)
H ₂ O	6.0
2.5X Master mix	5.0
10 μM Forward primer	0.25
10 μM Reverse primer	0.25
cDNA Template	1.0

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีน GAPDH^[53] และสารพันธุกรรมของเชื้อ HRV (5'UTR/ VP2)

Primer's name	Sequence (5' → 3')	Position	target region	size (bp)
GAPDH_F112	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	112-131	GAPDH	491
GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	603-583	GAPDH	
HRV_F484	CGGCCCTGAATGYGGCTAA	484-504	5'UTR	642
HRV_F578	CTACTTTGGGTGCCGTGTTTC	578-599	5'UTR	539
HRV_R1126	ATCHGGHARYTTCCAMCACCA	1104-1126	VP2	



ภาพที่ 17 ตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ HRV ในส่วน 5' UTR และส่วนต้นของยีน VP2

ตารางที่ 5 สภาวะที่ใช้สำหรับการทำ PCR ของยีน GAPDH และ semi-nested PCR

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา			จำนวนรอบ
		GAPDH	HRV (5'UTR/ VP2)		
			1 st PCR	2 nd PCR	
Initial denaturation	94°C	3 นาที	3 นาที	3 นาที	1
Denaturation	94°C	30 วินาที	30 วินาที	30 วินาที	} 40
Annealing	55°C	30 วินาที	30 วินาที	30 วินาที	
Extension	72°C	1 นาที	1 นาที	1 นาที	
Final Extension	72°C	7 นาที	7 นาที	7 นาที	1
Hold	25°C	5 นาที	5 นาที	5 นาที	1

2. ตรวจสอบผลการทำ semi-nested PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct nucleotide sequencing

วิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ในการแยกหาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จากนั้นตัดเจลในบริเวณที่มีแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการ และสกัดสาร DNA ออกจากเจลด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Bioscience) จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HRV ด้วยวิธี direct nucleotide sequencing โดยใช้บริการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของบริษัท 1st base laboratories SDN BHD

3. การตรวจสอบความจำเพาะ (Specificity) ของไพรเมอร์

ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ HRV ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจนั้น จำเป็นต้อง ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อไวรัสที่ต้องการตรวจหา เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ซึ่งไพรเมอร์ที่ดีไม่ควรที่จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ (cross reactivity) หรือสารพันธุกรรมของคนซึ่งปนเปื้อนอยู่ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ในการทำ semi-nested PCR ซึ่งประกอบด้วย HRV_F484, HRV_F578 และ HRV_R1126 โดยจะนำคู่ไพรเมอร์มา ทำการทดสอบกับ ตัวอย่าง ที่ทราบว่าเป็นผลบวก ต่อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดใดแล้ว ด้วยวิธี semi-nested PCR โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ได้แก่ IFVA, IFVB, HPIV, RSV, hMPV และ HEV

ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ได้แก่ HBoV, HAoV, WU และ KI polyomavirus

4. การเตรียม Positive control ด้วยวิธี Cloning

เมื่อได้สารพันธุกรรมของยีนในส่วนที่ต้องการแล้ว จะนำมาโคลนเพื่อเตรียมเป็น positive control สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี semi-nested PCR และเพื่อใช้ในการหาค่าความไว (sensitivity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ต่อไป โดยมีขั้นตอนสำหรับการ cloning ดังนี้

4.1 เตรียม competent cell ด้วยวิธี CaCl_2

(1) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 3 ml เขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ แบคทีเรียที่ได้มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 300 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือ คำนวณหาปริมาณเชื้อจากการวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 550 nm

(2) นำเชื้อที่ได้มาปั่นที่ 3,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรีย

(3) ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 50 mM CaCl_2 ที่เย็น ปริมาตร 2 ml แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมด

(4) เติมสารละลาย 50 mM CaCl_2 ที่เย็น ปริมาตร 2 ml อีกครั้ง บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

(5) เติมสารละลายด้านบนทิ้งแล้วจึงเติมสารละลาย 50 mM CaCl_2 จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C

4.2 Ligation เพื่อเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เตรียมสารละลายสำหรับการทำ ligation ของผลิตภัณฑ์ PCR กับ pGEM-T Easy vector

2x ligation buffer	5.0 μ l	pGEM-T Easy vector	1.0 μ l
T4 DNA ligase	1.0 μ l	PCR product	3.0 μ l

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.3 Transformation ด้วยวิธี heat shock

(1) เตรียมเซลล์ competent ปริมาตร 50 μ l ในหลอด 1.5 ml จากนั้นเติมสารละลาย ligation ปริมาตร 2 μ l แล้วนำหลอดไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้เซลล์ละลายอย่างช้าๆ

(2) เพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยการแช่หลอดใน water bath เพื่อทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วด้วยการบ่มน้ำแข็ง 2 นาที

(3) เติม SOC medium ปริมาตร 950 μ l ลงในหลอด

(4) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

(5) นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอนของเซลล์ที่ก้นหลอดประมาณ 45 μ l

(6) เติม X-gal 15 μ l และ IPTG 5 μ l ลงในหลอดเซลล์และผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมากระจายบน LB agar plate โดยใช้ spreader

(7) นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เพื่อคัดเลือกเซลล์ แบคทีเรียที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

4.4 คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (White/Blue Colony selection) และตรวจสอบโคลนด้วยการทำ Colony PCR

(1) คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB agar โดยเขี่ยเชื้อบางส่วนมาทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เซลล์แบคทีเรียได้รับนั้น มีชิ้นส่วนของยีนที่สนใจอยู่หรือไม่ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณใน pGEM-T vector หรือไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ HRV ในการทำ colony PCR ตรวจสอบผลด้วยการทำ

agarose gel electrophoresis โดยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการจะให้ขนาดของ PCR product เท่ากับขนาดของ insert product+250 bp หรือเท่ากับ 892 bp

(2) คัดเลือกโคโลนีสีขาว ที่ทราบว่ามีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 2 ml

(2) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

4.5 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Plasmid extraction)

(1) นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 1.5 ml มาใส่ลงในหลอดขนาด 2 ml

(2) นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง

(3) นำเซลล์ที่ได้มาละลายในสารละลาย lysis ปริมาตร 400 μ l ปั่นที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที

(4) นำสารละลายเซลล์ใส่ลงใน spin column และปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที

(5) เติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 400 μ l และนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที

(6) เทสารละลายที่ผ่าน spin column ทิ้ง และนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที เพื่อชะ

เอาสารละลายที่หลงเหลืออยู่ใน column ออกให้หมด

(7) นำ spin column ใส่ลงใน collection tube ใหม่และเติม elution buffer 50 μ l

(8) นำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที ได้สารละลายพลาสมิดที่บริสุทธิ์แล้ว ปริมาตร 50 μ l

(9) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อ

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิด โดยหาค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายพลาสมิด จากความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0

$$\text{DNA Purity} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

กำหนดให้ A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm

A_{280} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย μ g/ml

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของ A_{260} = 50 μ g/ml ของสารละลาย dsDNA บริสุทธิ์

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย Copy/ μ l

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

โดย Recombinant plasmid มีขนาดเท่ากับ ขนาดของ pGEM-T Easy vector 3,015 nt
+ ขนาดของ insert product

5. การคำนวณค่าความไวของเทคนิค PCR ด้วยการทำให้ 10 fold serial dilution

เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดสำหรับใช้เป็น positive control แล้ว จึงนำมาทำ serial dilution โดยกำหนดให้มีค่า dilution factor เท่ากับ 10 และมีค่าความเข้มข้นของพลาสมิดอยู่ระหว่าง 10^9 - 10^0 Copies/ μ l ของ PCR reaction ค่าความไว (sensitivity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยังคงให้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามต้องการได้ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ยอมรับได้สำหรับการทำ PCR มีค่าประมาณ 10^4 - 10^2 Copies/ μ l^[54] และสำหรับการทำ semi-nested PCR ควรจะมีค่า sensitivity ที่ต่ำกว่า

ส่วนที่ 2 เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ HRV ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่าง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ sequencing ของ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 6-8 และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ semi-nested PCR เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม แสดงผลสรุปดังตารางที่ 9 ตรวจสอบผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ direct nucleotide sequencing โดยส่งตรวจกับบริษัท 1st base laboratories SDN BHD

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DNA sequencing ของ HRV-A

อ้างอิงตำแหน่งจาก NC_001617

pair	Primer's name	Sequence (5' → 3')	Position	region
1	HRV_A_F1486	TATGTCAATGCWGTNCCHATGGA	1486-1509	VP2
	HRV_A_R2159	TGGACTGCAANCCHAYATCCCA	2159-2138	VP3
	HRV_A_R2273	GAAGTATAAGAGYDGYTGTACCA	2273-2249	
2	HRV_A_F2014	GCGCTTTAGYTTYATGTTYGTGG	2014-2037	VP1
	HRV_A_R2782	ACTATTGTTATYTCWGARTCAAAYCT	2782-2757	
	HRV_A_R2865	GTGCTCCTGGDGGNACASACAT	2865-2841	
3	HRV_A_F2697	GAAGGTTAGTCTTMARGARATGGC	2697-2719	2A
	HRV_A_R3426	CTTCAGTGTTGKCGRTADATGA	3426-3403	
	HRV_A_R3546	ATTCTGATTCYTGATYCAWACCA	3546-3522	
4	HRV_A_F3390	TCCAGTGATCTARTCATHTAYCGMACA	3390-3416	2B
	HRV_A_R3982	AGAGTTTCTCTTNARRAAYCTCCA	3982-3957	2C
	HRV_A_R4038	CTGCATTACACATYTCWGTRAAAYTT	4060-4038	3A
5	HRV_A_F4550	ACAGAGTGNGTNATHATGGATGA	4550-4526	3C
	HRV_A_R5153	GTACACTCTGCTGGDAHNAAYCCA	5153-5131	
	HRV_A_R5466	GCCTGGNTCAGMATGDGTDGG	5466-5446	
6	HRV_A_F5555	TTGTGAAATTAANTAGNAATGARAARTT	5555-5582	3D
	HRV_A_F5680	GTTGGTGATGYNGTNCNTATGG	5680-5702	
	HRV_A_R6248	GAAACATADGGAWANCTGCACT	6248-6226	
7	HRV_A_F6210	TTTGGATTTDAAYACHAGTGCWGG	6210-6233	3'UTR
	HRV_A_R6659	AAGAAAADATNACATCATCHCCATA	6683-6659	
	HRV_A_R7114	CATACATGADGNTTYTTNGTCCA	7114-7091	
8	HRV_A_F6577	GCTTTTGATTAYWCAAAYTATGAYGG	6577-6602	3'UTR
	HRV_A_R7114	CATACATGAAGDTTYTTNGTCCA	7137-7112	
	HRV_A_R7137	CAAAGATAGNACRTGHTCNTGCAT	7114-7091	

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DNA sequencing ของ HRV-C

อ้างอิงตำแหน่งจาก EF582385 (HRV-C024)

pair	Primer's name	Sequence (5' → 3')	Position	region
1	HRV_C_F857	CCGATAGGCTNAARCAAATYACTAT	844-869	VP2
	HRV_C_F979	GATAAACCYACNCAYCCNGAAAC	962-989	
	HRV_C_R1481	GTTGTGCCNNARCATRYTRTCCAT	1447-1470	
2	HRV_C_F1164	TAATGCCACMAAATTYMYAGTGG	1152-1175	VP3
	HRV_C_F1389	CACCAGCTNATMAAYTTGMGGAC	1377-1400	
	HRV_C_R2010	CAGTACTRAARCTRTCACANACACA	1951-1975	
3	HRV_C_F2022	GATAGCMTACACMCCNCCAGG	1986-2006	VP1
	HRV_C_F2291	ATGNTRCGNGACACCCNATGAT	2257-2279	
	HRV_C_R3212	GTTCTGTRTGACAWANAKRTRACT	3133-3158	
4	HRV_C_F3630	ACACAAAYTAGGNARYGCNTTTGG	3574-3596	2B
	HRV_C_R4433	GGGTTYTGRCNNANATCATCCAT	4360-4382	2C
	HRV_C_R4485	CAGTGNTNGANACCATYTGACA	4408-4429	3A
5	HRV_C_F4401	CARGANGTGGTRATNATGGATGAT	4345-4368	3B
	HRV_C_R5300	GCATGTGKGGTANNACWGCACA	6240-6217	3C
	HRV_C_R5441	CTTCTATRTCYCTRAACTTYTCATT	5381-5356	3A
6	HRV_C_F5027	CARTATGCTNTNAATTGYNTNGGTAG	4969-4994	3D
	HRV_C_R5834	CAGGAAACAYATCRTRGAANACACT	5749-5774	
	HRV_C_R6019	CCATGGWNATNGGNTCWGGGTT	5938-5959	
7	HRV_C_F5596	CCACNMAACCAGGNCANTGTGG	5539-5561	3'UTR
	HRV_C_R6402	CAACGWAGCATNNATNYGTGACCA	6319-6342	
	HRV_C_R6446	CTNCCATCATARTTKGTNTANTCAAA	6361-6387	
8	HRV_C_F6312	ACTGSYTTYCATGCMAAYCCAGG	6252-6275	3'UTR
	HRV_C_R7009	TCTYTRGTCCAYCTGATYGATTCA	6925-6947	
	HRV_C_R7116	CCATTYANATGAANTNNTCNATCCA	7030-7053	

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ DNA sequencing ของ HRV-B

อ้างอิงตำแหน่งจาก NC_001490

pair	Primer's name	Sequence (5' → 3')	Position	region
1	HRV_B_F749	GTTATTAAYTAYTAYAAGGATGCAGC	749-774	VP4
	HRV_B_F773	GCTGGTCAATCACTGTCAATGGA	766-789	
	HRV_B_R1512	TGTCATWGAATCMATDGGBACTGA	1512-1490	VP2
2	HRV_B_F1435	GTTTATTAATCTNAGRACMAAYAATAC	1435-1461	VP3
	HRV_B_R2264	GCAAAATAAGDGAWGTYTGATACCA	2264-2240	
	HRV_B_R2330	TCAACTTAAATCTGRACARGCACT	2330-2304	
3	HRV_B_F2109	CTAGGTACTCATGTDRTNTGGGAT	2084-2109	VP3
	HRV_B_F2127	CATAGTAATGAMHATHCCNTGGAC	2127-2150	
	HRV_B_R2700	GGACAGTTGATYTTCCAATCATT	2700-2676	
4	HRV_B_F2379	AGTCATCGTTGABAAARYGAAACAG	2379-2503	VP1
	HRV_B_R3063	TATTCTGAATGCHATRCTDCCCAT	3063-3040	
	HRV_B_R3005	GCATCATCATGTGARTANCCATC	3005-2983	
5	HRV_B_F2882	CAAAGTGCYTCWAAYCCHAGTGT	2882-2905	2A
	HRV_B_R3544	TGCCGGNCCHACHCCTTTCAT	3544-3523	
	HRV_B_R3663	TCGTATGTCHGCRAARCANACATA	3663-3639	
6	HRV_B_F3484	CCCACCAACATNTGGATHGAAGG	3484-3507	2A
	HRV_B_R4254	CTTTTGGCAGATYTGTYCYAACCA	4254-4231	
	HRV_B_R4367	TAATACACANACTGGHTCNGTTCT	4367-4343	
7	HRV_B_F3991	GATGGATGGTTYARRAARTTYAATGA	3991-4017	2C
	HRV_B_F4026	TGCTGCAAARGGHYTRGARTGGAT	4026-4050	
	HRV_B_R4866	TACCAAGCTAABDGCTTTDCCACA	4866-4842	
8	HRV_B_F4543	GATATAAGYATDITYTYGCARATGGT	4543-4568	3B
	HRV_B_R5237	TATGGWCCYTGDTYTGDCGAAA	5237-5215	
	HRV_B_R5318	GCAAAYTCAGTRTTDGGNCCTTG	5318-5295	

pair	Primer's name	Sequence (5' → 3')	Position	region
9	HRV_B_F5770	GGTATTCATGTBGGHGGHAATGG	5770-5792	3D
	HRV_B_R6412	TTCATTCTCATRTTNACWGARTCATT	6412-6388	
	HRV_B_R6563	GAGGCATCAAAATTTGARTARTCAAA	6576-6553	
10	HRV_B_F6302	CCTCTAGTTACHTAYATHAARGATGA	6302-6327	3'UTR
	HRV_B_R7032	TATATCTTDCATTGGCATNACTGG	7032-7008	
	HRV_B_R7116	TCTCCTGARTGCCADGCYAAACAT	7116-7093	

ตารางที่ 9 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR

PCR reaction	semi-nested PCR				จำนวนรอบ
	1 st PCR		2 nd PCR		
	อุณหภูมิ	เวลา	อุณหภูมิ	เวลา	
Initial denaturation	94°C	3 นาที	94°C	3 นาที	1
Denaturation	94°C	40 วินาที	94°C	40 วินาที	44
Annealing*	50-52°C	40 วินาที	52-55°C	40 วินาที	
Extension	72°C	2 นาที	72°C	2 นาที	1
Final Extension	72°C	7 นาที	72°C	7 นาที	1
Hold	25°C	5 นาที	25°C	5 นาที	1

* หมายเหตุ: อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นกับชนิดของคู่ไพรเมอร์

การเก็บรวบรวมข้อมูล

รวบรวมและเก็บบันทึกข้อมูลบน data sheet เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบข้อมูลและการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR และ genome sequencing ทั้งหมดนั้นใช้โปรแกรมในการออกแบบและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

- Bioedit เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการออกแบบไพรเมอร์ โดยการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ โดยโปรแกรมที่ใช้เป็นรุ่น 7.0.4.1 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)

- Oligos และ FastPCR เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการกลับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (reverse complement) เพื่อเตรียม reverse primer และคำนวณค่า Tm ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ พร้อมทั้งใช้ตรวจสอบโอกาสในการเกิด primer dimer ในเบื้องต้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการทำ DNA sequencing จะถูกตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขโดยใช้โปรแกรมหาดังต่อไปนี้

- Basic local alignment search tool (BLAST) ทำการเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยดำเนินการผ่านทางเว็บไซต์ของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)fj

- Chromas เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing โดยพิจารณาจากผลกราฟ chromatogram

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 หรือ MEGA4 เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการสร้าง phylogenetic tree เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV หรือเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชุดข้อมูลที่ทำการศึกษาวิเคราะห์ โดยในการศึกษานี้ กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ Neighbor-joining method, Kimura's 2-parameter และค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

- ClustalW เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของชุดข้อมูล ที่ คัดเลือก (multiple alignment) และเพื่อการสร้าง phylogenetic tree สามารถทำการวิเคราะห์ ผ่านเว็บไซต์ DDBJ (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>) หรือโปรแกรม ClustalW2 ใน เว็บไซต์ EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)

โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ genome sequencing

- DNASTAR's Seqman Genome Assembly เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการต่อข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 2 ข้อมูลเข้าด้วยกัน (nucleotide contig assembly) โดยการพิจารณา ลำดับเบสและผล chromatogram ที่ได้ประกอบเพื่อวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของข้อมูลร่วมด้วย นอกจากนี้สามารถใช้โปรแกรม CAP3 ผ่านเว็บไซต์ <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php> ได้เช่นกัน

- โปรแกรมสำหรับการคำนวณค่า %GC content ของข้อมูล coding sequence เลือกลงจากโปรแกรมใน Bioedit หรือผ่านเว็บไซต์ http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/Genom_GC_Calculator.shtml ค่าที่ได้จากทั้งสองโปรแกรมนี้ เป็น ค่าผลรวมของ %GC content และแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์องค์ประกอบทั้ง 4 ชนิดของข้อมูล ที่ วิเคราะห์ด้วย ในการพิจารณาความสัมพันธ์ของค่า %GC content ในบริเวณต่างๆ บน coding sequence ของเชื้อไวรัส HRV ที่ทำการศึกษานั้น กำหนดให้ใช้ค่า window size เท่ากับ 600 และ window step เท่ากับ 10

- Recombination Detection Program 3Beta41 หรือ RDP3-v.3.41 เป็นชุดโปรแกรม เพื่อวิเคราะห์แนวโน้ม ในการเกิด recombination ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจ ในชุด โปรแกรม RDP3 ประกอบด้วยโปรแกรมย่อย 5 โปรแกรม ได้แก่ RDP, Bootscan, Maximum X2, Chimaera, SiScan และ 3Seq ซึ่งใช้เพื่อการวิเคราะห์ recombination ได้เช่นเดียวกัน แต่มี ข้อกำหนดในการใช้โปรแกรมแตกต่างกันไป ตัวอย่าง เช่น ในการวิเคราะห์ แนวโน้ม การเกิด recombination ด้วยโปรแกรม Bootscan เมื่อใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HRV prototype ทุกสายพันธุ์ ($n > 100$) เป็นข้อมูลอ้างอิง กำหนดให้พารามิเตอร์ของโปรแกรม Bootscan มีค่าดังนี้ window size เท่ากับ 200, step size 10, replication number เท่ากับ 500 และใช้ Kimura's 2 model เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าจะเกิด recombination กัน แล้ว จึงทำการคัดเลือกข้อมูลเหล่านั้น มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bootscan อีกครั้ง โดย

เปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ ดังต่อไปนี้ window size เท่ากับ 400, step size 20, replication number เท่ากับ 1,000, Kimura's 2 model, อัตราส่วนของ transition ต่อ transversion เท่ากับ 2 เพื่อเพิ่มค่าความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่วิเคราะห์ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

- SimPlot เป็นโปรแกรมที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลของการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในรูปของกราฟ %similarity ของคูนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบสัมพันธ์กับตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ นั้น ตัวอย่างเช่น ในการวิเคราะห์ข้อมูลของ coding sequence ของเชื้อ HRV ตัวเลขของตำแหน่งที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งของยีน ต่างๆ บนจีโนม เป็นต้น และโปรแกรมนี้อาจยังสามารถใช้ทำนายโอกาสในการเกิด recombination ด้วยการทำ Bootscan ได้เช่นเดียวกับโปรแกรม RDP3

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV ในกลุ่มประชากรไทยนั้น ความสัมพันธ์ของการระบาดในแต่ละฤดูกาล อาการที่พบในผู้ป่วย ถูกคำนวณหาค่าความสัมพันธ์ทางสถิติต่างๆ ด้วยโปรแกรม SPSS ค่าที่ใช้เพื่อทดสอบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดข้อมูล ได้แก่ T-test, Pearson χ^2 ซึ่งคำนวณด้วยโปรแกรม ANOVA ค่าที่ยอมรับได้กำหนดให้มีค่า P-value (p) ต่ำกว่า 0.05

การวิเคราะห์ข้อมูล

- (1) วิเคราะห์ระบาดวิทยาของเชื้อ HRV จาก NP suction ในกลุ่มตัวอย่าง ตั้งแต่ปี 2006 -2007 เพื่อศึกษาอัตราการก่อโรค ลักษณะอาการ และความสัมพันธ์ของสายพันธุ์กับการเกิดก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ
- (2) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ในส่วนยีน VP4 ของเชื้อ HRV สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน เพื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยกับสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ เพื่อทำนายแนวโน้มการระบาดของเชื้อ HRV
- (3) วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ HRV ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยวิเคราะห์ cleavage site ใน coding region เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์

- (4) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในส่วน VP1 เพื่อทำนายชนิดของ receptor ที่ HRV ใช้ในการเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน โดยมุ่งเน้นที่ HRV-C ซึ่งเป็นสายพันธุ์อุบัติใหม่ พร้อมทั้งทำนายแนวโน้มของ antiviral drug susceptibility ต่อยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา วิจัยนี้ ทั้งส่วนของยีนสร้างโปรตีน capsid VP4 และข้อมูลของ coding sequence ทั้ง 6 strain โดยใช้โปรแกรม Sequin 7.25 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin>) ไปยังฐานข้อมูล GenBank



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนที่ 1 ผลศึกษาระบาดวิทยาและการจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับซีวโมเลกุล ของเชื้อ Human Rhinovirus ในประเทศไทย

ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV หรือเชื้อชนิดอื่นๆ ในตระกูล *Picornaviridae* ตามข้อกำหนดของคณะกรรมการจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัส หรือ International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) ว่าด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสนั้น ระบุให้ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน coding sequence เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก ซึ่งบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV ได้แก่ ส่วนยีน VP4, VP4/ 2 และ VP1 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละส่วนจะให้ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่สอดคล้องกัน และเนื่องจากส่วน 5'UTR เป็นส่วน noncoding sequence ที่มีความอนุรักษ์มากและมีลักษณะคล้ายกันระหว่างเชื้อ HRV และ HEV จึงอาจทำให้การจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้ไม่น่าเชื่อถือ^{11,55-56} และมักจะนิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ Enterovirus แบบไม่ระบุสายพันธุ์ (Pan-Enterovirus screening) ในงานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกลำดับการสังเคราะห์โปรตีน capsid VP4 ที่สมบูรณ์ เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HRV ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจได้อย่างถูกต้อง และเพื่อให้สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV ให้ได้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ

1.1 เทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ HRV ด้วยวิธี Semi-nested PCR

ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HRV ในตัวอย่าง NP suction ซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปี 2006-2007 ด้วยวิธี semi-nested PCR นั้น ผลลัพธ์ที่ได้จากการทำ semi-nested PCR ทั้ง 2 รอบ ครอบคลุมส่วนสำคัญบนจีโนมตั้งแต่ส่วนปลายของบริเวณ 5'UTR จนถึงส่วนต้นของยีน VP2 โดยมีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 เท่ากับ 642 bp และ 539 bp ตามลำดับ โดยความจำเพาะ (specificity) ของวิธีตรวจวิเคราะห์ ถูกตรวจสอบด้วยการทดลองทำ semi-nested PCR กับตัวอย่างที่ทราบว่าเป็นผลบวกต่อเชื้อไวรัสทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ทั้งเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ได้แก่ IFAV, IFBV, HPIV, RSV, hMPV, HEV และไวรัสที่มีสารพันธุกรรม

เป็น DNA ได้แก่ HBoV, HAdV, WU polyomavirus และ KI polyomavirus พบว่าวิธีตรวจวิเคราะห์นี้ มีความจำเพาะต่อเชื้อ HRV และไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนของไวรัสชนิดอื่นได้

ค่าความไว (sensitivity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ สามารถหาได้จากการทำ 10 fold-serial dilution ของ positive control ซึ่งเตรียมจากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ semi-nested PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ HRV_F484 และ HRV_R1126 มาเชื่อมต่อเข้าไปใน pGEM-T Easy vector จากนั้นจึงทำการส่งถ่าย รีคอมบิแนนท์พลาสมิด เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี blue/ white colony selection และตรวจสอบผลด้วยการทำ colony PCR จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย และทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น positive control ต่อไป วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพลาสมิดที่ได้และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย พบว่ามีค่า A_{260} เท่ากับ 0.18 และ A_{280} เท่ากับ 0.0092

$$\text{DNA purity} = \frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{0.18}{0.0092} = 1.96$$

ค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายพลาสมิดที่เหมาะสม ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.7-2.0 ซึ่งค่าที่คำนวณได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 1.96 ถือเป็นค่าที่ยอมรับได้

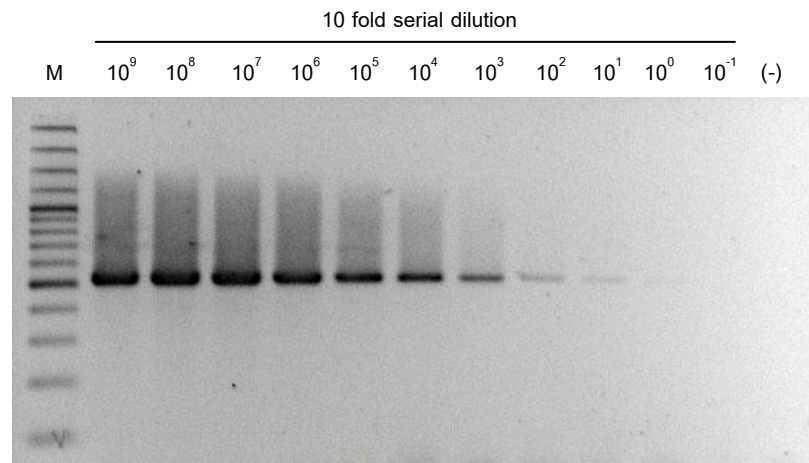
คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} [\text{DNA}] &= A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50 \\ &= 0.18 \times 10 \times 50 \\ &= 90 \mu\text{g/ml} \quad \text{หรือ} \quad 9 \times 10^{-8} \text{ g/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายพลาสมิดในหน่วย Copy/ μl

$$\begin{aligned} [\text{DNA}] &= \frac{[\text{DNA}] (\text{g/}\mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Recombinant plasmid (nt)} \times 660} \\ &= \frac{[9 \times 10^{-8}] \times 6.02 \times 10^{23}}{(3015 + (1126-373)) \times 660} = 2.303 \times 10^{10} \text{ copies/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

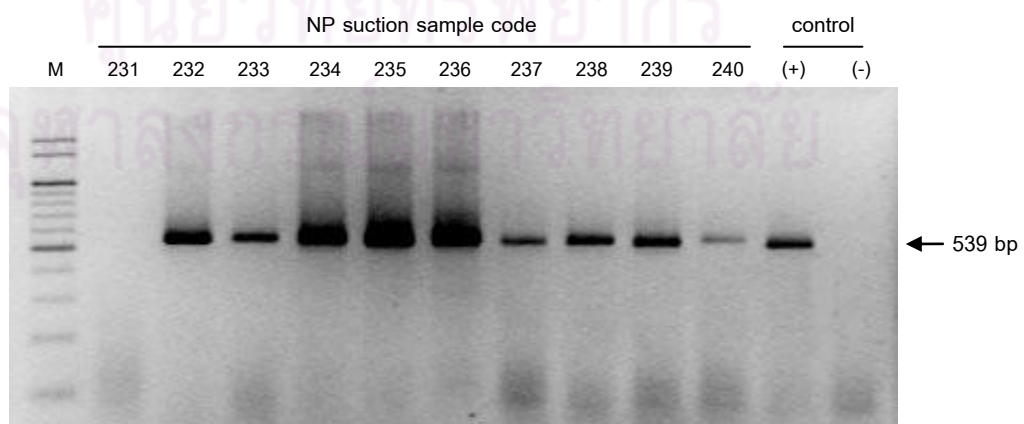
จากนั้นเจือจางสารละลายพลาสมิดซึ่งใช้เป็น positive control ให้มีความเข้มข้น 1×10^9 ถึง 1×10^1 copies/ μl และใช้เป็น DNA ตั้งต้นสำหรับการทำ semi-nested PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HRV_F484 และ HRV_R1126 สำหรับ PCR รอบที่ 1 และ HRV_F587 และ HRV_R1126 สำหรับ PCR รอบที่ 2 พบว่าค่าความไวของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีค่าเท่ากับ 10 copies/ μl



ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์หาความไวของวิธี semi-nested PCR

โดยใช้สารละลาย plasmid ที่ได้จากการทำ 10 fold serial dilution ของ positive control เป็น DNA ตั้งต้น

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HRV ในตัวอย่าง NP suction จำนวน 289 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการป่วยในระบบทางเดินหายใจ 286 ราย ด้วยวิธี semi-nested PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 87 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยทั้งหมด 84 ราย สามารถคำนวณหาอัตราระบาดของเชื้อ HRV ในประชากรไทยได้เท่ากับ 30% แบ่งออกเป็นผู้ป่วยชายและหญิงเท่ากับ 52 ราย และ 32 ราย ตามลำดับ หรือมีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงประมาณ 1.6:1 โดยพบว่าผู้ป่วย 2 ราย ที่มีการติดเชื้อ HRV ซ้ำซ้อน นอกจากนี้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ในกลุ่มตัวอย่างประชากร เดียวกันนี้ พบว่ามีค่าความชุกของเชื้อไวรัส ชนิดอื่นๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ RSV 15%, IFAV 11%, HMPV 8%, HBoV 7%, WU polyomavirus 7%, HAdV 6%, PIV 5% และ KI polyomavirus 2% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าเชื้อไวรัส HRV เป็นเชื้อไวรัสที่มีการระบาดมากที่สุดในประชากรไทยในปี 2006-2007



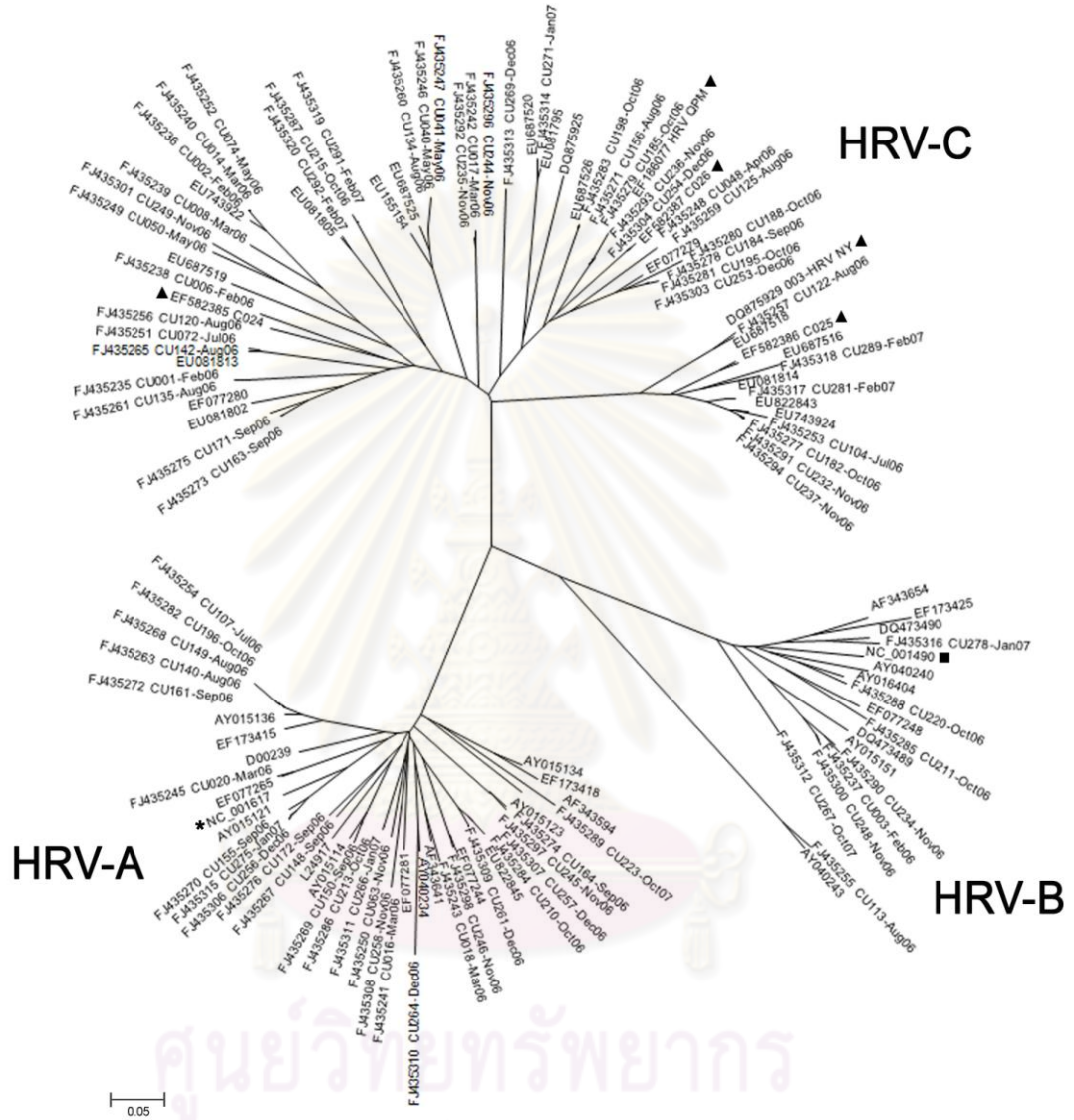
ภาพที่ 19 ตัวอย่างผลการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหาเชื้อ HRV ด้วยวิธี semi-nested PCR (ตัวอย่าง NP suction ที่ 231-240)

1.2 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของยีน VP4 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis

เมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 ที่สมบูรณ์ขนาดเฉลี่ย 200 nt ซึ่งได้จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HRV ทั้ง 87 ตัวอย่าง (GenBank accession number : FJ435235-FJ43533) มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์เทียบกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และทำ phylogenetic analysis พบว่ามีตัวอย่างที่ถูกจำแนกเป็น HRV-C เท่ากับ 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 58% จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HRV, HRV-A เท่ากับ 29 ตัวอย่าง คิดเป็น 33% และ HRV-B เท่ากับ 8 ตัวอย่าง หรือ 9% จึงสามารถสรุปได้ว่าในกลุ่มประชากรไทยในปี 2006-2007 นั้น เชื้อ HRV-C มีอัตราการระบาดสูงที่สุดในขณะที่ HRV-B มีอัตราการระบาดต่ำที่สุด ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างจากในภูมิภาคอื่นๆ เช่น ประเทศ United State^[10, 20], Australia^[12] หรือ Hong Kong^[11] เป็นต้น ซึ่งมักจะพบการระบาดของเชื้อ HRV-A สูงกว่า หรือมีอัตราส่วนของ HRV-A และ HRV-C ที่ใกล้เคียงกัน

จากลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HRV ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่ามีลักษณะสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าการระบาดของเชื้อ HRV มีลักษณะกระจายทั่วโลก ไม่พบความจำเพาะของสายพันธุ์กับภูมิภาค ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 ของ HRV จากการศึกษาวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับ prototype strain ของเชื้อ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRV-C มีค่าเฉลี่ย %sequence identity ต่ำเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ โดยมีค่า %sequence identity ระหว่าง 51-62% และ 50-61% เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRV-A และ HRV-B หรือมีค่า % sequence identity ระหว่าง 49-64% และ 46-54% เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HRV-A และ HRV-B ตามลำดับ สำหรับความสัมพันธ์ของค่า identity เฉลี่ยภายในสายพันธุ์ HRV-C นั้นมีค่าของ %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ระหว่าง 63-99% และลำดับกรดอะมิโนระหว่าง 78-94% โดยพบว่ามี HRV-C จากงานวิจัยนี้ทั้งหมด 3 strain ได้แก่ FJ435242-CU017-Mar06, FJ435292-CU235-Nov06 และ FJ435296-CU244-Nov06 แสดงตำแหน่งบน phylogenetic tree เป็นเอกลักษณ์แยกจาก strain อื่นๆ ทำให้ค่า identity เมื่อเปรียบเทียบภายใน HRV-C มีค่าแตกต่างกันมาก ซึ่ง HRV-C ทั้ง 3 strain นี้มีค่าเฉลี่ย identity เมื่อเปรียบเทียบกับ prototype ของ HRV-C ดังนี้ C024 (EF582385) มีค่า nucleotide identity เท่ากับ 73% และค่า

amino acid identity เท่ากับ 80%, QPM (EF186077) มีค่า nucleotide identity เท่ากับ 72% และ amino acid identity เท่ากับ 80% และเมื่อเปรียบเทียบ กับ NY (DQ875929) พบว่ามีค่า nucleotide identity และ amino acid identity เท่ากับ 69% และ 77% ตามลำดับ

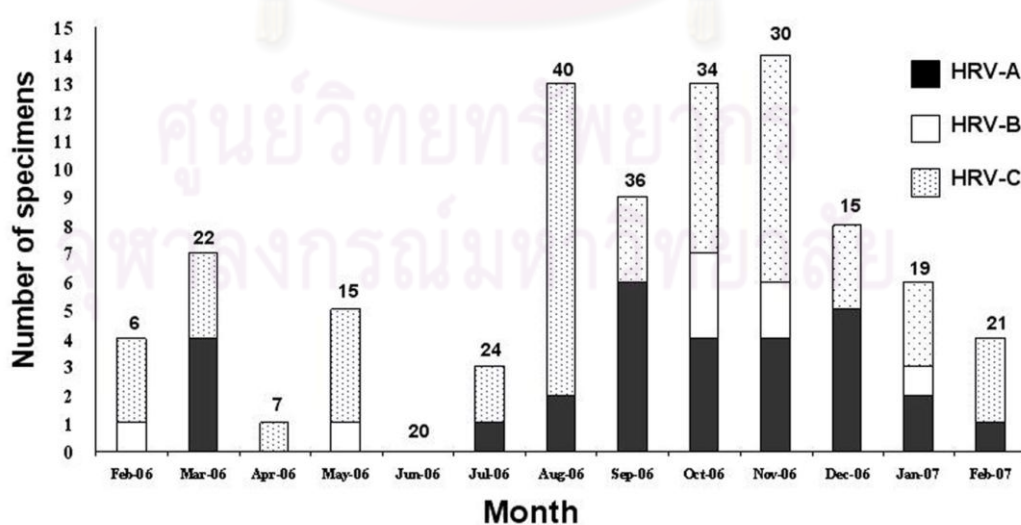


ภาพที่ 20 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ HRV

โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้างโปรตีน capsid VP4 จากตัวอย่างทั้ง 87 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 (MEGA4) (www.megasoftware.net) นั้น เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Kimura's two-parameter และค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000 กำหนดให้เส้นตรงได้ภาพแทนจำนวน nucleotide substitution ต่อตำแหน่ง และ prototype strain ของแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ % nucleotide identity และ deduced amino acid identity แทนด้วยสัญลักษณ์ดังต่อไปนี้ (*) คือ ตัวแทนของ HRV-A, (■) คือ ตัวแทนของ HRV-B และ (▲) คือ ตัวแทนของ HRV-C ตามลำดับ

1.3 การระบาดของเชื้อ Human Rhinovirus และความสัมพันธ์กับฤดูกาล

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อ HRV กับฤดูกาล ได้แบ่งช่วงระยะเวลาที่ศึกษาออกเป็น 3 ฤดูกาล ตามลักษณะการแบ่งฤดูกาลของประเทศไทย ได้แก่ ฤดูร้อน มีระยะเวลาตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์-เมษายน, ฤดูฝน คือเดือนพฤษภาคม-ตุลาคม และฤดูหนาว คือตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน-มกราคม พบว่าการระบาดของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์แสดงรูปแบบที่แตกต่างกันไป เชื้อ HRV-C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดมากในประเทศไทยนั้น มีลักษณะการระบาดกระจายทั่วทั้งปี ยกเว้นในเดือนมิถุนายน และพบมากในช่วงฤดูฝน โดยมีค่าความชุกในแต่ละฤดูกาลดังนี้ ฤดูฝน มีตัวอย่าง 26 ตัวอย่างจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 52%, ฤดูหนาว เท่ากับ 28% (14/50) และฤดูร้อน เท่ากับ 20% (10/50) สำหรับเชื้อ HRV-A ซึ่งมีอัตราการระบาดรองมาจาก HRV-C พบการระบาดมากในฤดูฝนและฤดูหนาว มีค่าเท่ากับ 45% (13/29) และ 36.7% (11/29) ตามลำดับ และในฤดูร้อนพบการระบาดของเชื้อ HRV ต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 17% เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HRV-A ทั้งหมด ในขณะที่เชื้อ HRV-B พบการระบาดเพียง 5 เดือนเท่านั้นจากช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง NP suction ได้แก่ เดือนกุมภาพันธ์, พฤษภาคม, ตุลาคม, พฤศจิกายน และมกราคม จึงสามารถสรุปได้ว่า ลักษณะการระบาดของเชื้อ HRV-C และ HRV-A มีความสัมพันธ์กับฤดูกาล โดยพบการระบาดมากในช่วงฤดูฝนและต้นฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



แผนภูมิที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อ HRV ต่อฤดูกาลในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษ จำนวนตัวอย่าง NP suction ที่เก็บได้ในแต่ละเดือนกำกับด้วยตัวเลขด้านบนแผนภูมิ

1.4 อาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ Human Rhinovirus ในทางเดินหายใจ

จากตัวอย่าง NP suction ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HRV ทั้ง 87 ตัวอย่างนั้น เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลการตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ได้แก่ RSV, HPIV, IFVA, IFVB, hMPV, HAdV, HBoV, WU/KI polyomavirus, HEV ซึ่งได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่ามีตัวอย่างทั้งสิ้น 33 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 38% จากตัวอย่างทั้งหมดที่มีการติดเชื้อ HRV ร่วม (co-infection) กับไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่น จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า เชื้อ WU/KI polyomaviruses, HAdV และ IFAV มีอัตราการติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HRV เท่ากัน คือ 18%, เชื้อ HBoV และ hMPV พบการติดเชื้อร่วมกับ HRV คิดเป็น 15% และ 9% ส่วนเชื้อ PIV เป็นเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HRV น้อยที่สุด คิดเป็น 6% และพบว่าเชื้อ RSV เป็นเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HRV มากที่สุด เท่ากับ 36% ของตัวอย่างที่พบว่ามีเชื้อร่วม แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ HRV และ RSV นั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง HRV และ IFBV ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ HRV เพียงชนิดเดียวนั้น มีจำนวนทั้งสิ้น 54 ตัวอย่าง หรือเท่ากับ 62% โดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ HRV-C เท่ากับ 30 (34%), HRV-A เท่ากับ 19 ตัวอย่าง (22%) และ HRV-B เท่ากับ 5 ตัวอย่าง (6%) ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ HRV ต่อช่วงอายุของผู้ป่วย เพื่อทำนายแนวโน้มปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยเด็กในแต่ละช่วงวัยนั้น พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HRV มีอายุตั้งแต่ 11 วัน ถึง 10 ปี 5 เดือน จึงได้ทำการแบ่งกลุ่มประชากรศึกษา ออกตามช่วงอายุเป็น 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยแรกเกิดจนกระทั่งถึงอายุ 5 เดือน, กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 23 เดือน, กลุ่มที่ 3 คือ ผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 24 เดือนถึง 59 เดือน และกลุ่มที่ 4 คือผู้ป่วยที่มีตั้งแต่ 60 เดือนขึ้นไป จากการวิเคราะห์ผลพบว่าค่าเฉลี่ยของอายุที่พบการติดเชื้อ HRV มาก ได้แก่ในช่วงอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 23 เดือน ในขณะที่เด็กแรกเกิดถึง 5 เดือน ซึ่งเป็นกลุ่มที่น่าจะมีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัส และทำให้เกิดอักเสบอย่างเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง มากกว่า เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของร่าง กายยังทำงานไม่สมบูรณ์ พบอัตราการติดเชื้อ HRV ต่ำกว่าในกลุ่มที่ 2 ($p > 0.05$) ถ้าหากพิจารณาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อ HRV ต่อการก่อโรคเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างนั้น พบว่า HRV-C พบมากในผู้ป่วยเด็กอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 59 เดือนมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยพบว่าเป็นกลุ่มที่ 2 ซึ่งอายุ

ตั้งแต่ 6 เดือนถึง 23 เดือน ตรวจพบเชื้อ HRV-C เท่ากับ 31 ตัวอย่างจากทั้งหมด 55 ตัวอย่าง และ
 ผู้ป่วยกลุ่มที่ 3 อายุตั้งแต่ 24 เดือน ถึง 59 เดือนพบเชื้อ HRV-C เท่ากับ 12 ตัวอย่างจากทั้งหมด
 16 ตัวอย่าง ในขณะที่ HRV-A และ HRV-B ที่ตรวจพบในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 21 ตัวอย่างและ 1
 ตัวอย่างตามลำดับ และในกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 3 ตัวอย่างและ 1 ตัวอย่างตามลำดับ

ตารางที่ 10 สรุปผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Human Rhinovirus ในกลุ่มประชากรศึกษา

จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	HRV-A	HRV-B	HRV-C	ผลรวม
ต่อเชื้อ HRV	29	8	50	87
อายุของผู้ป่วย				
0-5 เดือน	3	2	5	10
6-23 เดือน	21	3	31	55
24-59 เดือน	3	1	12	16
มากกว่า 60 เดือนขึ้นไป	1	2	3	6
ติดเชื้อ HRV เพียงชนิดเดียว				
	19	5	30	54
ติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่น				
Human Bocavirus	0	0	5	5
Adenovirus	1	0	5	6
WU polyomavirus	1	0	2	3
KI polyomavirus	2	0	1	3
Influenza A virus	1	0	5	6
Influenza B virus	0	0	0	0
Parainfluenza virus	0	0	2	2
Respiratory syncytial virus	4	3	5	12
Human Metapneumovirus	2	0	1	3

จากผลการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV พบว่ามีรายงานความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ
 HRV ต่อการพัฒนาของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันถึงเรื้อรังในผู้ป่วยเด็กเล็ก ผล
 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก ของผู้ป่วย กับการติดเชื้อ HRV ในงานวิจัยนี้
 สามารถสรุปได้ว่า อาการทั่วไปที่พบมากกว่า 50% ในผู้ป่วยเด็กเล็ก ซึ่งติดเชื้อ HRV เพียงชนิด
 เดียว และตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้แก่ หลอดลมอักเสบเฉียบพลัน (acute bronchiolitis)
 และปอดบวม (pneumonia) แต่อย่างไรก็ตามความรุนแรงของอาการที่พบนั้น ไม่แตกต่างจากโรค
 ติดเชื้อเฉียบพลันในทางเดินหายใจที่มีสาเหตุมาจากไวรัสชนิดอื่น

ในการทำนายความสัมพันธ์ของเชื้อ HRV ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ต่อแนวโน้มในการก่อโรคทางเดินหายใจ ส่วนล่าง นั้น ผู้วิจัยได้ทำการสรุปลักษณะอาการที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HRV-C จำนวน 11 รายจากทั้งหมด 50 ราย (22%) มีภาวะหลอดลมตีบและหายใจมีเสียงวี๊ด (wheezing) และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น อาการ wheezing จากโรคหลอดลมอักเสบเฉียบพลัน โดยกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบอาการดังกล่าวนี้มีอายุตั้งแต่ 4 เดือนถึง 23 เดือน และพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HRV-C จำนวน 9 ราย (18%) แสดงอาการ wheezing ซ้ำได้ (recurrent wheezing) ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับการรักษาด้วยการให้ยาขยายหลอดลม (bronchodilator) เพียงอย่างเดียวหรือให้ยาพร้อมกับ corticosteroid อุณหภูมิร่างกายของผู้ป่วยติดเชื้อ HRV-C มีค่าเฉลี่ย $37.3 \pm 0.70^{\circ}\text{C}$ ซึ่งใกล้เคียงกันกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HRV สายพันธุ์อื่นๆ คือ ในผู้ติดเชื้อ HRV-A และ HRV-B มีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ย $37.5 \pm 0.83^{\circ}\text{C}$ และ $37.8 \pm 0.57^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ ($p=0.2$) ในผู้ป่วยที่มีโรคหอบหืดหรือ RAD เป็นประจำตัว พบว่ามีแนวโน้มตรวจพบเชื้อ HRV-C ได้มากกว่าเชื้อ HRV-A และ HRV-B ($p = 0.09$)

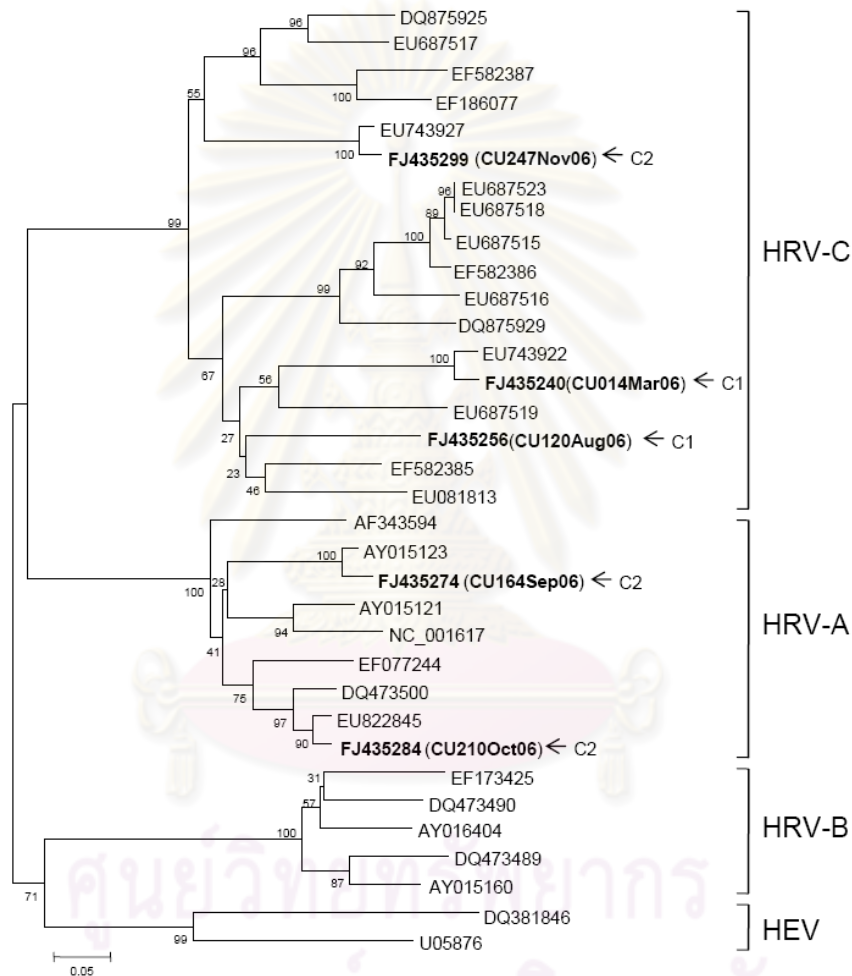
ตารางที่ 11 ลักษณะอาการทางคลินิกที่ตรวจพบในผู้ป่วยติดเชื้อ HRV

อาการทางคลินิก	HRV-A	HRV-B	HRV-C
อุณหภูมิร่างกาย ($^{\circ}\text{C}$)	37.5 ± 0.83	37.8 ± 0.57	37.3 ± 0.70
Underlying disease			
Asthma / RAD	8 (27%)	2 (25%)	25 (50%)
ผลการวินิจฉัยโรค			
Acute Bronchiolitis	8 (27.5%)	1 (12.5%)	11 (22%)
Pneumonia	17 (58%)	7 (87.5%)	30 (60%)
Wheezing	17 (58%)	3 (37.5%)	36 (72%)

RAD = reactive airway disease

เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ผู้ป่วย ติดเชื้อ HRV เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4 วัน และไม่พบความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HRV ต่างสายพันธุ์กัน ($p=0.4$) จึงสรุปได้ว่าอาการที่พบในผู้ติดเชื้อ HRV-C นั้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ HRV-A และ HRV-B

ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV จากตัวอย่างทั้ง 87 ตัวอย่าง ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 พบว่ามีตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนล่างจำนวน 2 ราย ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อ HRV ซ้ำซ้อน (Re-infection) ร่วมกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น แสดงผลสรุปการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV ที่พบในตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 21 และผลการตรวจวินิจฉัยโรคดังตารางที่ 12



ภาพที่ 21 Phylogenetic tree ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ HRV ซ้ำซ้อนทั้ง 5 ตัวอย่าง

(ระบุด้วยตัวอักษรหนาของ GenBank accession number) จากผู้ป่วย 2 ราย โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 ซึ่งได้จากผู้ป่วยทั้งสองคือ C1 และ C2 ตามลำดับ และกำหนดให้ HEV คือตัวอย่างของไวรัสสายพันธุ์อื่น (outgroup) เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 12 ผลการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วย 2 รายที่พบว่าติดเชื้อ HRV ซ้ำซ้อน

เพศ	โรคประจำตัว	ครั้งที่	อายุ (เดือน)	ผลการวินิจฉัยโรค	เชื้อไวรัสที่พบ
1 หญิง	-	1	5	bronchiolitis	RSV
		2	6	pneumonia, wheezing	-
		3	14	bronchiolitis, wheezing	HRV-C, RSV
		4	21	wheezing, respiratory distress	HRV-C, IFAV
2 ชาย	congenital heart disease,	1	7	bronchiolitis	HRV-A, RSV
	cow's milk protein allergy	2	9	pneumonia, RAD	HRV-A
		3	9	respiratory distress	HRV-C

ผู้ป่วยรายแรก (C1) เป็นทารกเพศหญิง มีประวัติการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งหมด 4 ครั้ง นับตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย ในการเข้ารับการรักษาครั้งแรก เมื่ออายุ 5 เดือน ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคหลอดลมอักเสบ ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อ RSV เข้ารับรักษานาน 3 วัน การเข้ารับการรักษาครั้งที่ 2 เกิดขึ้นเมื่อผู้ป่วยอายุ 6 เดือน โดยมีภาวะหลอดลมตีบร่วมกับอาการปอดบวม ในครั้งต่อมาเมื่อผู้ป่วยอายุ 14 เดือน พบว่ามีอาการเป็นไข้ต่ำ ไอ หายใจลำบากเนื่องจากหลอดลมตีบ ผลการตรวจตัวอย่าง NP suction ด้วยวิธี semi-nested PCR พบการติดเชื้อ HRV-C (CU014-Mar06: FJ435240) ร่วมกับเชื้อ RSV ซึ่งได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR และในระยะเวลา 7 เดือนต่อมา ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาเนื่องจากมีอาการหลอดลมตีบ และหายใจมีเสียงวี๊ด (recurrent wheezing) โดยผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ พบเชื้อ HRV-C (CU120-Aug06: FJ435256) ร่วมกับเชื้อ IFVAV โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้จากการถอดรหัสยีน VP4 ของเชื้อ HRV ทั้ง 2 strain แสดงตำแหน่งที่แตกต่างกันบน phylogenetic tree และมีค่า nucleotide identity เท่ากับ 70.1%

ผู้ป่วยรายที่สอง (C2) เป็นทารกเพศชาย มีโรคหัวใจและ ะแพ้โปรตีนจากนํ้านมวัวเป็นโรคประจำตัว เข้ารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนล่างรวม 3 ครั้ง ในครั้งแรกเมื่ออายุ 7 เดือน ตัวอย่าง NP suction ตรวจพบการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ HRV-A (CU164-Sep06: FJ435274) และ RSV ในครั้งต่อมาเข้ารับการรักษาเมื่ออายุ 9 เดือน เนื่องจากปอดบวมซึ่งมี

สาเหตุ จากการติดเชื้อไวรัสและ มีอาการหอบ และในครั้งนี้ตรวจพบการติดเชื้อ HRV-A (CU-210Oct06: FJ435284) เพียงชนิดเดียว หลังจากนั้นอีก 3 สัปดาห์ผู้ป่วยเข้ารับการรักษา เนื่องจากมีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน มีไข้ ต่ำ ไอ หายใจลำบาก และหอบ ผลการตรวจวิเคราะห์ NP suction พบเชื้อ HRV-C เพียงชนิดเดียว (CU247-Nov06: FJ435299) โดยไม่พบไวรัสก่อโรคทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ผลการเปรียบเทียบค่า %nucleotide identity ของ HRV-A ทั้ง 2 strain มีค่าเท่ากับ 82.5% เมื่อเปรียบเทียบกับ HRV-C พบว่ามีค่าเท่ากับ 51.2% และ 61.1% ตามลำดับ

จากผลการทำ phylogenetic analysis และค่า nucleotide identity ที่ได้นี้ สามารถสรุปได้ว่าเชื้อไวรัส HRV ที่ถอดรหัสได้จากผู้ป่วยทั้ง 2 รายนั้น เป็นเชื้อไวรัสที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อซ้ำซ้อนใน strain หรือสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ไม่ได้มีสาเหตุจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากร่างกายได้อย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ดี จากการที่ผู้ป่วยทั้งสองนั้นมีอายุน้อยและมีโรคประจำตัว จึงส่งผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ซึ่ง อาจทำให้ผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อชนิดเดิมๆ ซ้ำซ้อน และการที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อหลายชนิดร่วมกันนั้น อาจเป็นสาเหตุให้อาการที่เกิดขึ้นมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นด้วย

เมื่อพิจารณาลักษณะอาการ ของผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อ HRV พบว่ามีอาการทั่วไป คือ มีไข้ มีน้ำมูกและไอ ซึ่งอาการในเบื้องต้นนั้นไม่แตกต่างจากผู้ติดเชื้อ HRV จึงสรุปได้ว่าเชื้อ HRV น่าจะก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้ไม่แตกต่างกับไวรัสชนิดอื่นๆ ซึ่งระดับ ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นนั้นจะต้องพิจารณาจากปัจจัยหลายชนิดร่วมด้วย ทั้งอายุ , โครงสร้างทางเดินหายใจ และระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV และความสัมพันธ์ในการก่อโรคทางเดินหายใจ เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลประกอบการศึกษาในงานวิจัยอื่นๆ ต่อไป

ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาข้อมูล coding sequence ของเชื้อ Human Rhinovirus

ในการศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของเชื้อ HRV โดยการวิเคราะห์ลักษณะทั่วไป ความคล้ายคลึงของไวรัสในสายพันธุ์เดียวกัน หรือลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเพาะของไวรัสแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกับกันนั้น ผู้วิจัยได้ทำการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นจำนวนทั้งหมด 6 strain ด้วยเทคนิค long-range semi-nested PCR ซึ่งทำการคัดเลือกตัวอย่าง NP suction เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา โดยอ้างอิงจากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการทำ phylogenetic analysis ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 และค่า %identity เป็นเกณฑ์ สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRV-A และ HRV-B ที่ได้ นั้น พบว่าแต่ละตัวอย่างที่ทำการศึกษานั้น มีค่า %pairwise nucleotide identity เมื่อเปรียบเทียบกับ prototype strain ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำการสุ่มคัดเลือกตัวอย่าง NP suction ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HRV-A และ HRV-B อย่างละ 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันและมีปริมาณไวรัสมาก เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาข้อมูล coding sequence ของเชื้อ HRV ที่ถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อที่ตรวจพบในผู้ป่วยโดยตรง โดยตัวแทนของ HRV-A ได้แก่ CU107 และ CU150 และตัวแทนของสายพันธุ์ HRV-B ได้แก่ CU003 และ CU211 สำหรับเชื้อ HRV-C นั้นได้คัดเลือกตัวอย่าง CU072 และ CU184 เป็นตัวแทนในการศึกษา ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และลักษณะทั่วไปของ coding sequence สามารถสรุปได้ดังนี้

2.1 การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ Human Rhinovirus ด้วยวิธี Phylogenetic analysis

ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของเชื้อ HRV ทั้ง 6 strain พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ coding sequence ที่ถอดรหัสได้ หรือ ลำดับกรดอะมิโนในส่วน polypeptide ที่แปลรหัสได้ในการศึกษานี้ กับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank นั้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลให้ผลที่สอดคล้องกับการ จัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสร้างโปรตีน capsid VP4 ดังต่อไปนี้

- สายพันธุ์ HRV-A ได้แก่ CU107 และ CU150

โดยพบว่า CU107 เป็นตัวอย่างที่ได้ผู้ป่วยติดเชื้อที่เข้ารับการรักษาในเดือนกรกฎาคม ปี 2006 จัดเป็น serotype 12 มีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

โนเท่ากับ 94% และ 98% ตามลำดับ, CU150 คือ serotype 81 ได้มาจากผู้ป่วยติดเชื้อที่เข้ารับการรักษาในเดือนกันยายนปี 2006 โดยมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 90% และ 99% ตามลำดับ

- สายพันธุ์ HRV-B ได้แก่ CU003 และ CU211

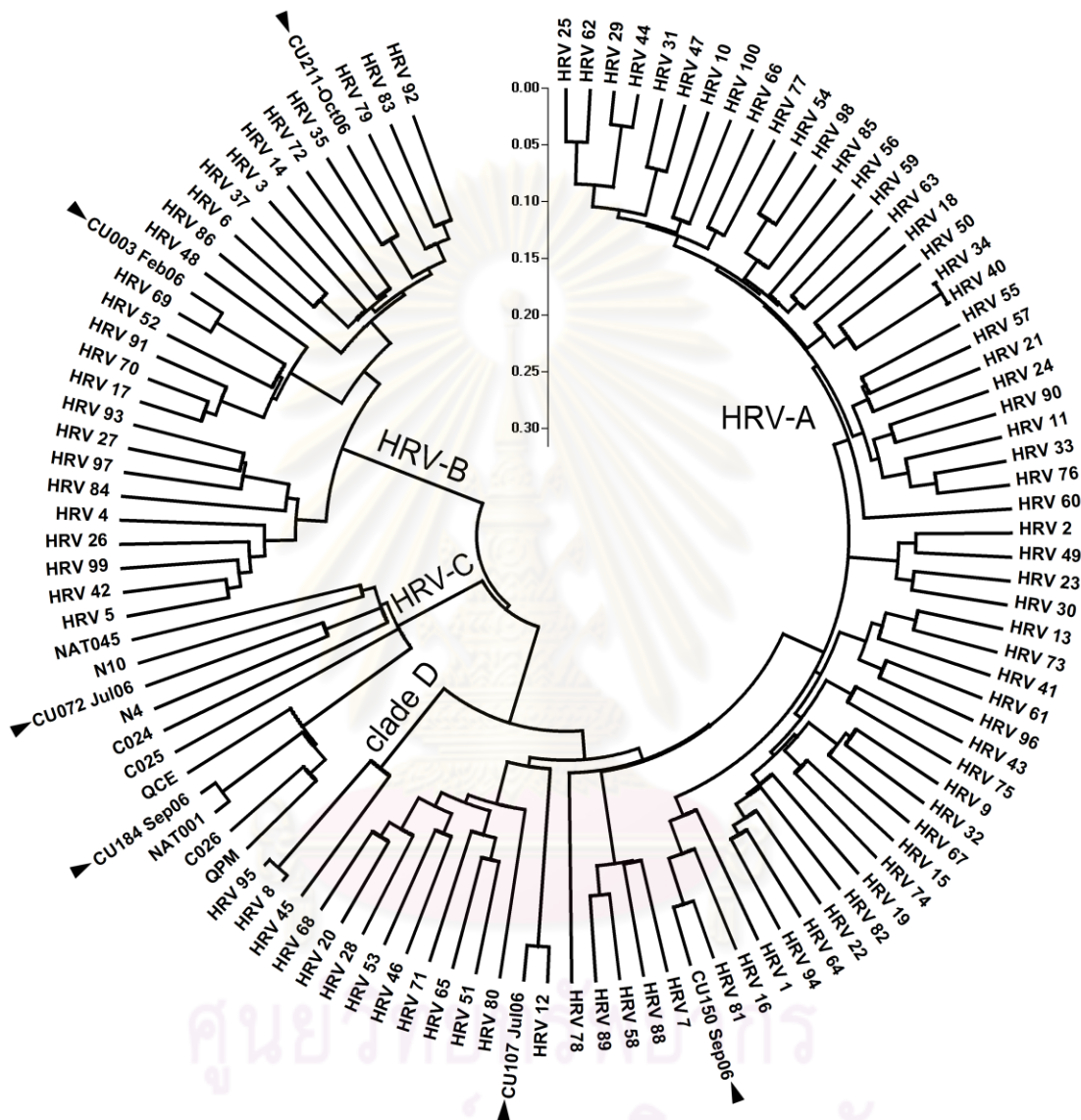
ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HRV ได้มาจากการถอดรหัสสารพันธุกรรมของตัวอย่าง CU003 และ CU211 ซึ่งได้จากตัวอย่าง NP suction ของผู้ป่วยติดที่เข้ารับการรักษาพยาบาลในเดือนกุมภาพันธ์และตุลาคม ปี 2006 ตามลำดับ โดย CU003 คือ serotype 69 เนื่องจากมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับ serotype 69 เท่ากับ 93% และ 97% ตามลำดับ สำหรับ CU211 มีความคล้ายคลึงกับทั้ง serotype 35 และ 69 โดยองค์ประกอบของ coding sequence ได้รับมาจาก serotype 35 เป็นหลัก จึงแสดงค่า %identity สูงเมื่อเทียบกับ serotype 35 โดยมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 84% และ 92% ตามลำดับ และมีค่าเท่ากับ 75% และ 83% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ serotype 69 จึงทำให้ CU211 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ serotype 35 มากกว่าและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันบน phylogenetic tree ในขณะที่ serotype 69 จัดอยู่ใน clade ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน

- สายพันธุ์ HRV-C ได้แก่ CU072 และ CU184

CU184 ได้มาจากการถอดรหัสสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่เก็บในเดือนกันยายน ปี 2006 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ NAT001 ค่อนข้างมาก โดยมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 97% และ 99% ตามลำดับ ในขณะที่ CU072 ซึ่งได้จากตัวอย่างที่เก็บในเดือนกรกฎาคม ปี 2006 มีความคล้ายคลึงกับ N4 มากที่สุด โดยมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 73% และ 78% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ในสายพันธุ์ HRV-C พบว่ามีค่าเฉลี่ย %identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 65% และ 67% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน

ในการพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับกันด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าเชื้อ HRV-A และ HRV-C น่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกัน ในขณะที่ HRV-B มีวิวัฒนาการแยกออกไป จากผลการวิเคราะห์ ลักษณะ การจัดกลุ่มบน

phylogenetic tree ของ HRV-A นั้น พบว่ามี HRV-A ทั้งหมด 3 serotype ได้แก่ serotype 8, 45 และ 95 ที่แสดงการจับกลุ่มแยกออกจาก serotype อื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด และแสดงแนวโน้มของการจัดจำแนก HRV เป็นสายพันธุ์ใหม่ คือ HRV-D



ภาพที่ 22 ผลการทำ phylogenetic analysis เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HRV โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ polyprotein ซึ่งได้มาจากการถอดรหัสพันธุกรรมของเชื้อ HRV ในตัวอย่าง NP suction ทั้ง 6 ตัวอย่าง (ซึ่งได้ด้วยลูกศรสีดำและระบุด้วยช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้น) ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม MEGA4 เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Neighbor-joining method, Kimura's 2-parameter และค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000

2.2 ลักษณะทั่วไปของ complete coding sequence ของเชื้อ Human Rhinovirus

ORF ของ HRV มีขนาดครอบคลุมขนาดกว่า 90% ของความยาวจีโนม และยีนต่างๆ มีการจัดเรียงตัวเหมือนกับไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ ในตระกูล *Picornaviridae* โดยมีขนาดและลักษณะของยีนใกล้เคียงกับที่พบใน HEV มากที่สุด ผลการวิเคราะห์ ลักษณะ ORF ของ HRV พบว่ามีขนาดแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ โดย ORF ของ HRV-B มีขนาดเฉลี่ยยาวกว่า HRV สายพันธุ์อื่นๆ โดยพบว่ามีขนาดตั้งแต่ 6,537-6,561 nt หรือมีขนาดของ polyprotein ตั้งแต่ 2,178-2,186 aa สำหรับ ORF ของ HRV-A มีขนาดตั้งแต่ 6,453-6,498 nt หรือ 2,150-2,165 aa และ HRV-C มีขนาดเฉลี่ยเล็กที่สุดและเล็กกว่า HEV ทุกสายพันธุ์ เนื่องจากพบ deletion ในบางบริเวณ โดยมีขนาดตั้งแต่ 6,423-6,459 nt หรือ 2,140-2,152 aa องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ต่างๆ ใน coding sequence ของ HRV พบว่าประกอบด้วยเบส adenine (A) เป็นส่วนประกอบหลัก คิดเป็น 31-34% รองลงมาคือ uridine (U) 25-30%, guanine (G) 19-22% และ cytosine (C) 18-22% ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของเบสทั้ง 4 ชนิดใน HRV แต่ละสายพันธุ์มีค่าไม่แตกต่างกัน

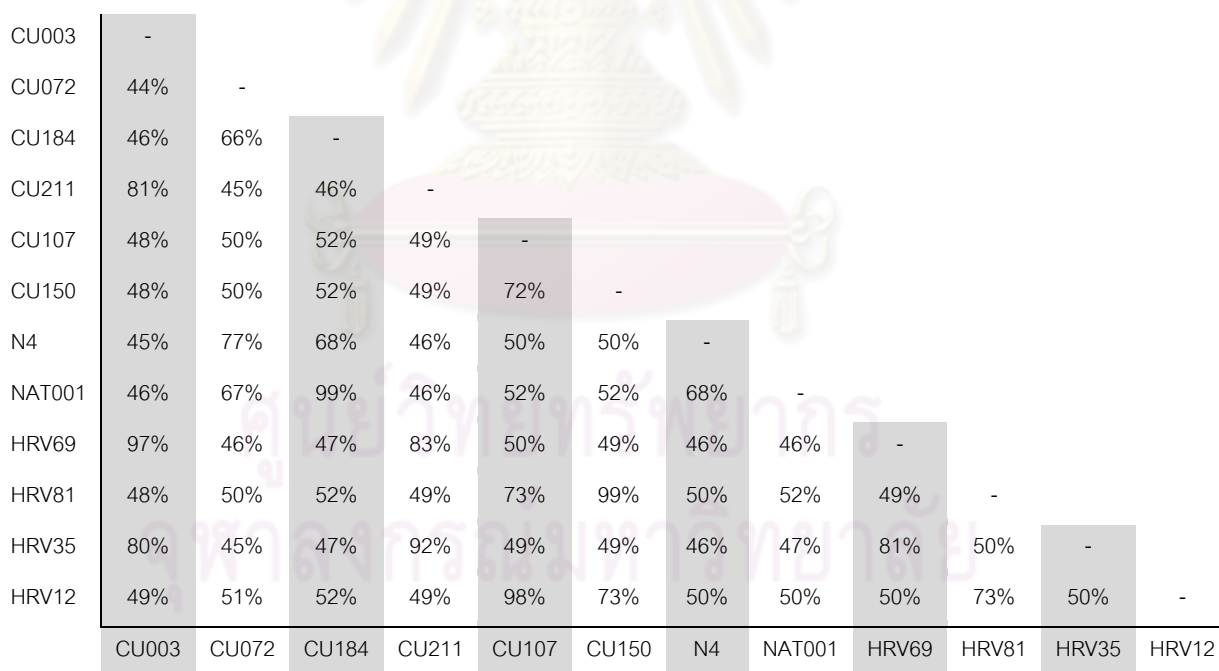
ผลการพิจารณา identity matrix ของ polyprotein ของ HRV แต่ละสายพันธุ์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบภายในสายพันธุ์ HRV-C มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 78% (68-95%) ในขณะที่ HRV-A และ HRV-B มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80% (64-99%) และ 83% (75-97%) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ HRV-C มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์มากกว่า HRV-A และ HRV-B

ลักษณะ ORF terminator ของ HRV ประกอบด้วย stop codon ทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ UAA, UAG และ UGA ผลการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRV-A พบว่าส่วนมากใช้ UAA เป็น stop codon หลัก ในขณะที่ 15 serotype และ CU150 ใช้ UAG และอีก 4 serotype รวมทั้ง CU107 ซึ่งจัดเป็น serotype 12 ที่ถอดรหัสข้อมูลพันธุกรรมได้จากผู้ป่วยโดยตรงนั้น มี UGA เป็น stop codon ในสายพันธุ์ HRV-B ทั้ง 25 serotype รวมทั้ง CU003 และ CU211 มี stop codon หลักเป็น UAA ในขณะที่มี 3 serotype ได้แก่ serotype 27, 70 และ 84 ใช้ UGA และมีเพียง serotype 14 เท่านั้นที่มีลำดับของ stop codon เป็น UAG สำหรับ HRV-C พบว่ามีการเลือกใช้ stop codon ทั้ง 3 รูปแบบ ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งในปัจจุบันข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ coding sequence ของ HRV-C ที่มีรายงานในฐานข้อมูลมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ไม่สามารถสรุปแนวโน้มการเลือกใช้ stop codon ได้เหมือนกับ HRV-A และ HRV-B จากผลการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่าการเลือกใช้ stop codon ของเชื้อ HRV นั้น ไม่แสดงลักษณะจำเพาะภายในแต่

ละลายพันธุและพบว่า HRV ที่เป็น serotype เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์ (variant) ก็พบว่ามีการใช้ stop codon ต่างกัน

ตารางที่ 13 ลักษณะทั่วไปของ coding sequence และขนาด viral protein ของเชื้อ HRV

Strain	ORF			viral protein (aa)										
	length		G+C content	P1				P2			P3			
	(nt)	(aa)		VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
A CU107	6,468	2,155	39%	69	263	238	287	143	95	322	77	21	183	458
A CU150	6,462	2,153	38%	69	260	238	285	142	95	323	77	21	183	460
B CU003	6,546	2,181	41%	69	262	236	293	146	97	330	85	23	182	458
B CU211	6,537	2,178	39%	69	262	236	288	146	97	330	85	23	182	460
C CU072	6,450	2,149	43%	67	265	236	273	142	99	326	75	22	183	460
C CU184	6,429	2,142	43%	67	264	234	272	142	97	325	76	22	183	460



ภาพที่ 23 ผลการเปรียบเทียบค่า %sequence identity ของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสพันธุกรรมของเชื้อ HRV ในการศึกษาวิจัยนี้เปรียบเทียบกับ prototype ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยกำหนดให้ลำดับกรดอะมิโนของ HRV-12 และ HRV-81 เป็นตัวแทนของ HRV-A, HRV-35 และ HRV-69 เป็นตัวแทนของ HRV-B และ NAT00, N4 เป็นตัวแทนของ HRV-C สำหรับการเปรียบเทียบ

ในการวิเคราะห์ลักษณะของโปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้นนั้น อ้างอิงจากกระบวนการ translation ของเชื้อ HRV ซึ่งจะแปลรหัสสารพันธุกรรมเป็น polyprotein สายยาวที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยเรียงต่อกันตามลำดับของยีนบนจีโนม และโปรตีนเหล่านี้จะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ viral protease (viral protease-dependent cascade) เป็นโปรตีนหน่วยย่อย 11 ชนิด เพื่อใช้ในการประกอบเป็นไวรัสอนุภาคใหม่ต่อไป ผลจากการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนแต่ละส่วนของ HRV แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน พบว่าโปรตีน capsid VP4, VP2 และ VP3 ของเชื้อ HRV ทุกสายพันธุ์ มีขนาดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ซึ่งการรักษาขนาดของโปรตีนโครงสร้างนี้มีความสำคัญต่อการประกอบเข้าเป็น icosahedral capsid และการกำหนดขนาดของอนุภาคไวรัส แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีน capsid VP1 ซึ่งทำหน้าที่เสมือน epitope ของไวรัส HRV-C มีขนาดเล็กกว่า HRV-A และ HRV-B ประมาณ 10-20 aa

ลักษณะสำคัญของกระบวนการ viral protease-dependent cascade โปรตีนสายยาวจะถูกตัดออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อยได้อย่างถูกต้องได้นั้น จะถูกกำหนดด้วยบริเวณตัดจำเพาะ (protease cleavage site) ระหว่างรอยต่อของโปรตีนแต่ละชนิด ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญซึ่งอยู่ระหว่างรอยต่อของโปรตีนหน่วยย่อยของ HRV แต่ละสายพันธุ์แสดงผลดังตารางที่ 14 และสามารถสรุปได้ว่า บริเวณตัดจำเพาะบางบริเวณแสดงลักษณะอนุรักษ์เฉพาะภายในสายพันธุ์เดียวกัน เช่น cleavage site ระหว่างโปรตีน capsid VP4/ VP2 พบว่าใน HRV-C ทุก strain มีลำดับกรดอะมิโนเป็น methionine/ serine (M/S) ในขณะที่ HRV-A ส่วนมากมีลำดับกรดอะมิโนเป็น glutamine/ serine (Q/S) และ HRV-B มีลำดับเป็น asparagine/ serine (N/S) และ cleavage site ในบางบริเวณก็แสดงลักษณะร่วมระหว่างสายพันธุ์ เช่น บริเวณระหว่างรอยต่อของโปรตีน 2C/ 3A, 3A/ 3B, 3B/ 3C และ 3C/ 3D มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณเหล่านี้เป็น glutamine/ asparagines (Q/N) เหมือนกันในทุกสายพันธุ์ ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่า CU072 ซึ่งเป็น HRV-C ที่มีความคล้ายคลึงกับ N4 มากที่สุด โดยมีค่า %amino acid identity เท่ากับ 78% นั้น เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณตัดจำเพาะเปรียบเทียบกับ N4 และ strain อื่นในสายพันธุ์ HRV-C พบว่ามีลักษณะทั่วไปคล้ายกัน ยกเว้นในบริเวณตัดจำเพาะระหว่างโปรตีน VP1/ 2A ของทั้ง CU072 และ N4 แสดงลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะแตกต่างกันไป โดยมีลำดับเป็น Valine/ Glycine (V/G) คล้ายกับใน HRV-A ในขณะที่ strain อื่นๆ มีลำดับเป็น alanine หรือ leucine/glycine (A,L/G)

ตารางที่ 14 ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณตัดจำเพาะระหว่างโปรตีนแต่ละชนิด

protein junction	CU072	HRV-C	HRV-A	HRV-B
VP4/ VP2	M/S	M/S	Q/S	N/S
VP2/ VP3	Q/G	Q/G	Q,E/G	Q/G
VP3/ VP1	N/D	Q/N	Q/N	E/G
VP1/ 2A	V/G	A,L/G	A,F,V,Y/G	Y/G
2A/2B	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
2B/2C	Q/S	Q/G,S	E,Q/S	Q/A,S
2C/3A	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
3A/3B	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
3B/3C	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G
3C/3D	Q/G	Q/G	Q/G	Q/G

กำหนดให้ HRV-C ได้จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ C024, C25, C026, NAT001, NAT045, QPM และ QCE, HRV-A วิเคราะห์การทำ multiple alignment และคัดเลือกตัวแทนที่แสดงลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน 26 serotype ได้แก่ HRV1, 2, 7, 10, 15-16, 23, 28, 30, 34, 36, 38-39, 41, 44, 46, 49, 53, 55, 59, 73-76, 88-89 และ HRV-B 7 serotype ได้แก่ HRV3, 4, 6, 14, 35, 48, 70

ผลการเปรียบเทียบ %identity ของโปรตีนทั้ง 11 โปรตีนของ HRV-C กับ HRV-A และ HRV-B พบว่าโปรตีน capsid VP2 คือโปรตีนที่มีค่า %identity สูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบกับ HRV-A เท่ากับ 63% และ HRV-B เท่ากับ 62% ในขณะที่โปรตีน 3A เป็นโปรตีนที่มีค่า %identity ต่ำที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 42% และ 30% เมื่อเปรียบเทียบกับ HRV-A และ HRV-B ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนของ HRV-C ที่นับว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากโปรตีนของ HRV-A และ HRV-B มากที่สุด คือ โปรตีน capsid VP1 โดยพบทั้งการเกิด insertion หรือ deletion ภายในโปรตีนนี้และส่งผลให้ขนาดของโปรตีน capsid VP1 ของ HRV-C มีขนาดแตกต่างจาก HRV-A และ HRV-B มาก และนอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า %identity ของโปรตีน capsid VP1 ภายในสายพันธุ์ HRV-C พบว่ามีค่าต่ำโดยอยู่ในช่วงระหว่างต่ำกว่า 70% ถึงสูงที่สุดคือ 74% เมื่อเปรียบเทียบกับ N4 ซึ่งเป็น strain ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าเชื้อ HRV-C เป็นเชื้อที่มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์มาก

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ค่า %amino acid sequence identity ของ CU072 โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก CU072 ซึ่งจัดอยู่ในสายพันธุ์ HRV-C เปรียบเทียบกับข้อมูลกรดอะมิโนของ HRV สายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้

HRV species	%amino acid sequence identity										
	P1				P2			P3			
	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
HRV-A	63%	51%	39%	42%	60%	48%	47%	37%	53%	48%	60%
HRV-B	55%	51%	39%	35%	36%	46%	43%	27%	48%	45%	57%
HRV-C	78%	67%	61%	64%	70%	65%	61%	70%	64%	72%	69%

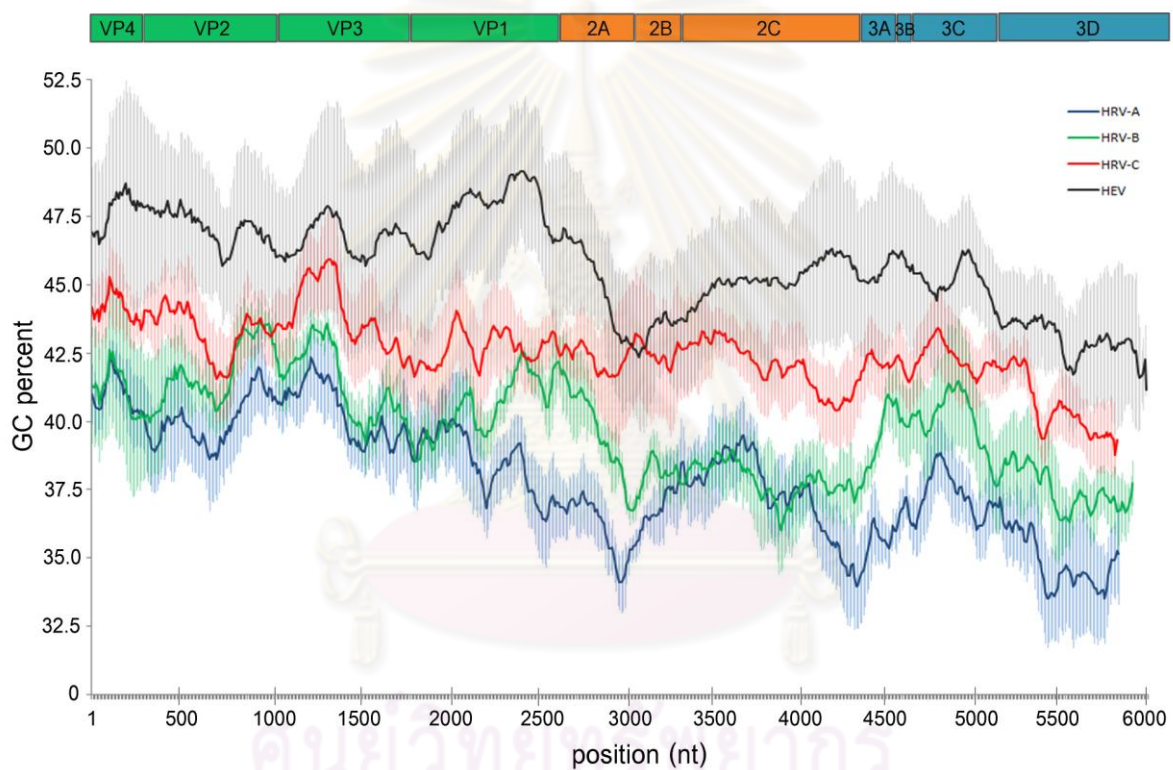
HRV-A: CU107, CU150, HRV-B: CU003, CU211, HRV-C: CU184

2.3 ผลการวิเคราะห์ค่า %GC content

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ลักษณะของจีโนมที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นข้อมูลนั้น สามารถพิจารณาจากค่า %GC content ของแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน โดยอ้างอิง จากผลการศึกษาในเชื้อ HEV ซึ่งเป็นไวรัสที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเชื้อ HRV มากกว่าเชื้ออื่นๆ ในตระกูล *Picornaviridae* พบว่าค่า %GC content ที่เปลี่ยนแปลงไปในเชื้อ HEV นั้น จัดเป็น genomic factor ที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อวิวัฒนาการของไวรัส ซึ่ง มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการปรับตัวของเชื้อ HEV ให้อยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ค่า %GC content ที่แตกต่างกันของเชื้อ HEV แต่ละสายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ไวรัส ซึ่งทำให้เชื้อ HEV แตกต่างสายพันธุ์กันสามารถก่อโรคในบริเวณที่แตกต่างกัน ได้ และเชื่อว่าเชื้อ HEV สายพันธุ์ที่มีค่า %GC content สูงจะสามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงกว่าเชื้อ HEV ที่มีค่า %GC content ต่ำ

ผลการวิเคราะห์ค่า %GC content ในส่วน coding sequence ของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกันนั้น พบว่ามีค่าเฉลี่ยใน HRV-A เท่ากับ 38%, HRV-B เท่ากับ 39% และ HRV-C เท่ากับ 43% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HEV ทั้ง 4 สายพันธุ์และ Poliovirus พบว่ามีค่าแต่ละสายพันธุ์มีค่าเฉลี่ย GC content ดังต่อไปนี้ HEV-A (EV71) และ HEV-B (EV73) มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 48%, HEV-C เท่ากับ 45%, HEV-D (EV70) เท่ากับ 42% และ Poliovirus เท่ากับ 46% สามารถสรุปได้ว่าค่า %GC content โดยเฉลี่ยของ HRV-A มีค่าต่ำ

ที่สุด ในขณะที่ HRV-C มีค่าสูงที่สุดใกล้เคียงกับเชื้อ HEV-C และ HEV-D จึงทำนายได้ว่าทั้งเชื้อ HRV และ HEV นั้น มีแนวโน้มในการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการสอดคล้องไปในทางเดียวกัน โดยเชื้อ HRV-A และ HRV-B สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่คล้ายกัน คือในระบบทางเดินหายใจส่วนบน มีอุณหภูมิเฉลี่ย 33°C และแตกต่างจากเชื้อ HEV ค่อนข้างมาก เนื่องจากเชื้อ HEV พบการเจริญได้ในหลายระบบ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 37°C และสามารถทนสภาพกรดได้ดี ในขณะที่ HRV-C อาจจะมีคุณลักษณะบางประการแตกต่างไปและอาจคล้ายกับเชื้อ HEV บางสายพันธุ์มากกว่า



ภาพที่ 24 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย %GC content ของ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์และ HEV (แสดงด้วยเส้นหนา) ซึ่งคำนวณได้จากการทำ multiple sequences alignment กำหนดให้ค่า sliding window เท่ากับ 600 nt, step size เท่ากับ 10 nt และค่า SD เหนือค่าเฉลี่ยและต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลแสดงด้วยพื้นที่แรเงาโดยรอบ

2.4 ผลการวิเคราะห์ conserved motif และ functional domain ใน polyprotein ของเชื้อ Human Rhinovirus

ผลการวิเคราะห์ motif ต่างๆ บนสาย polyprotein ซึ่งได้จากการถอดรหัสสารพันธุกรรม จากไวรัส HRV แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน พบว่าโปรตีนของสายพันธุ์ HRV-C มีลักษณะทั่วไป คล้ายกับโปรตีนจาก HRV สายพันธุ์อื่น โดยเฉพาะในบริเวณ motif สำคัญ ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การควบคุมกระบวนการ replication ของไวรัส ตัวอย่างเช่น

(1) GxxxS motif ในโปรตีน VP0

GxxxS หรือ myristoylation motif ในโปรตีน VP0 ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นของโปรตีน capsid VP4 และ VP2 มีตำแหน่งตรงกับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 ของโปรตีน VP0 โดย motif นี้มีความสำคัญในการเติมหมู่ myristoyl ให้กับโปรตีน VP0 เพื่อที่จะทำให้เกิดการตัดแบ่งสายโปรตีน ออกเป็นโปรตีน VP4 และ VP2 และเชื่อว่ามีบทบาทในการช่วยรักษาความเสถียรของโปรตีน capsid ด้วย โดยพบว่า HRV เกือบทั้งหมดมีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้เป็น GAQVS ยกเว้น HRV21 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น GTQVS และ HRV93 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น GAQIS

(2) G(P/A)Y(S/T)GxP ในโปรตีน 3B (VPg)

motif นี้เริ่มต้นที่ตำแหน่งที่ 1 ของโปรตีน 3B โดยพบว่ากรดอะมิโน Y ในตำแหน่งที่ 3 ของ motif นี้ แสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันในเชื้อ HRV ทุกสายพันธุ์ และพบว่ามีลักษณะเป็น homolog กับโปรตีน 3B ใน Poliovirus ซึ่งกรดอะมิโน Y3 นี้มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างพันธะ phosphodiester ระหว่างโปรตีน 3B กับส่วนปลาย 5' UTR ของจีโนมไวรัสเพื่อยึดสายจีโนมเข้ากับด้านในของโปรตีน capsid นอกจากนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 2 ใน HRV-C เกือบทั้งหมด มีลำดับเป็น P2 เหมือนกับใน HRV-A และ HRV-B ยกเว้น C025, N4 และ NAT045 strain มีลำดับเป็น A2 สำหรับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 พบว่าใน HRV-C แสดงลักษณะเฉพาะของกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลำดับเป็น T4 ซึ่งพบเฉพาะใน HRV-C เท่านั้น ได้แก่ C024, C026, QPM, QCE, NAT001 และ NAT045 กลุ่มที่ 2 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น S4 คล้ายกับ HRV สายพันธุ์อื่น ได้แก่ CU072, C025, N4 และ N10

	Y3	10	20
	▼		
		
HRV-C	CU072	GPYSGLP-NPPSKRPELRKATLQ	
	CU184	GPYTGLP-QPKPRKPELRKAVVQ	
	C024	GPYTGMF-TTPKKKPELRRATLQ	
	C025	GAYSGNA-NPIPRKPELRKAVKQ	
	C026	GPYTGLP-QPKPRKPELRKAVIQ	
	QPM	GPYTGLP-QPKVRKPELRKAVIQ	
	NAT001	GPYTGLP-QPKPRKPELRKAVVQ	
	NAT045	GAYTGHV-EPTLKRSELKAVTQ	
	N4	GAYSGVP-NPTPKKPELRKATLQ	
	N10	GPYSGAP-QPIPKKPELRRAPLQ	
	QCE	GPYTGLP-QPKPRKPELRRAVIQ	
HRV-A	CU107	GPYSGQP-KPKTRQPE-RRVVIQ	
	CU150	GPYSGEP-KPKTKVPE-RRVVAQ	
HRV-B	CU003	GPYSGNPSHTKPKPPTLRQVVVQ	
	CU211	GPYSGNPTHNKLPPTLRPVVAQ	

ภาพที่ 25 ผลการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีน 3B

โดยเปรียบเทียบผลของ HRV-C ทุก strain ที่มีรายงานในฐานข้อมูล กับ HRV-A และ HRV-B

3. motif ในโปรตีน 3D

โปรตีน 3D ของ picornavirus ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ประกอบด้วย motif ที่สำคัญทั้งหมด 8 motif ตัวอย่างเช่น YGDD motif ทำหน้าที่เป็นบริเวณจดจำระหว่างเอนไซม์และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid recognition site), YGL, FLKR และ SIRWT motif ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย C ของโปรตีน 3D โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนภายใน motif เหล่านี้แสดงลักษณะอนุรักษ์ภายในสายพันธุ์ HRV และยังพบลักษณะร่วมกับ motif ในโปรตีนของ HEV ด้วย

2.5 ผลการทำนาย conserved motif และ functional domain บนโปรตีน VP1

2.5.1 ลักษณะทั่วไปของโปรตีน VP1

Viral capsid protein 1 หรือ VP1 คือ โปรตีน capsid ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นองค์ประกอบหลักของ icosahedral capsid ของอนุภาคไวรัส โปรตีนชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการกำหนด antigenicity ของไวรัส เนื่องจากเป็นส่วนหนึ่งของ epitope ของไวรัสซึ่งจะถูกจับได้ด้วย neutralizing antibody และเป็นบริเวณที่ใช้ทำนายการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้ในบริเวณโปรตีน VP1 ยังทำหน้าที่เป็น receptor attachment site ของไวรัส จึงสามารถใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัส เพื่อการทำนายชนิดของ cellular receptor ที่ไวรัสใช้ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ coding sequence ของเชื้อ HRV ทั้ง 6 strain พบว่าขนาดของยีน VP1 ใน HRV สายพันธุ์ A และ B มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมี

ขนาดเฉลี่ย 864 nt หรือโปรตีนมีขนาดเฉลี่ย 288 aa เมื่อทำการวิเคราะห์ผลของการเปรียบเทียบ ลำดับกรดอะมิโน (amino acid alignment) ของโปรตีน VP1 เปรียบเทียบกับตัวแทนของแต่ละ สายพันธุ์ ซึ่งได้ทำการคัดเลือก serotype ที่มีรายงานผลการึกษา X-ray crystallography ของ rhinovirion ในฐานะข้อมูล หรือเป็นสายพันธุ์ที่มักถูกคัดเลือกเป็นไวรัสต้นแบบ (prototype) เพื่อ การศึกษาเปรียบเทียบ ดังต่อไปนี้

ตัวแทนของ HRV-A ได้แก่ HRV-1, 16 และ 45 ซึ่ง HRV-45 จัดเป็นสมาชิกของ clade D และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ HRV-A

ตัวแทนของ HRV-B ได้แก่ HRV-5, 14, 42 และ 70 โดยเลือกใช้ serotype 5 และ 42 เพื่อ เป็นตัวแทนของ HRV ที่ต้านทานต่อยา pleconaril (pleconaril resistant)

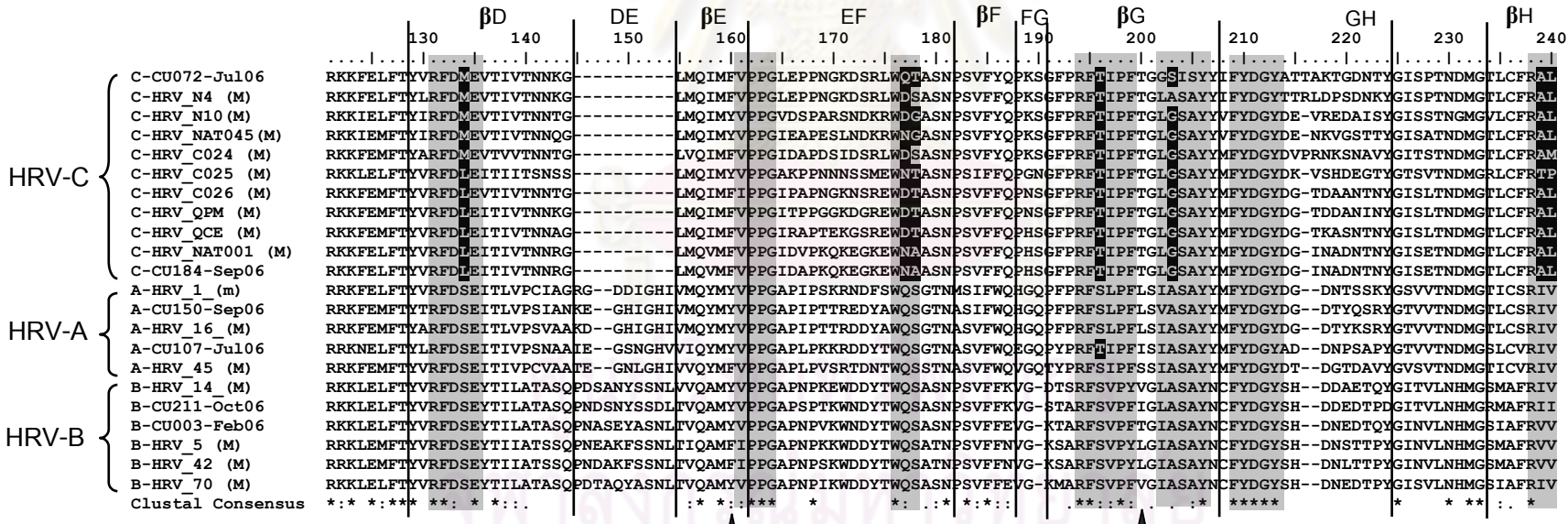
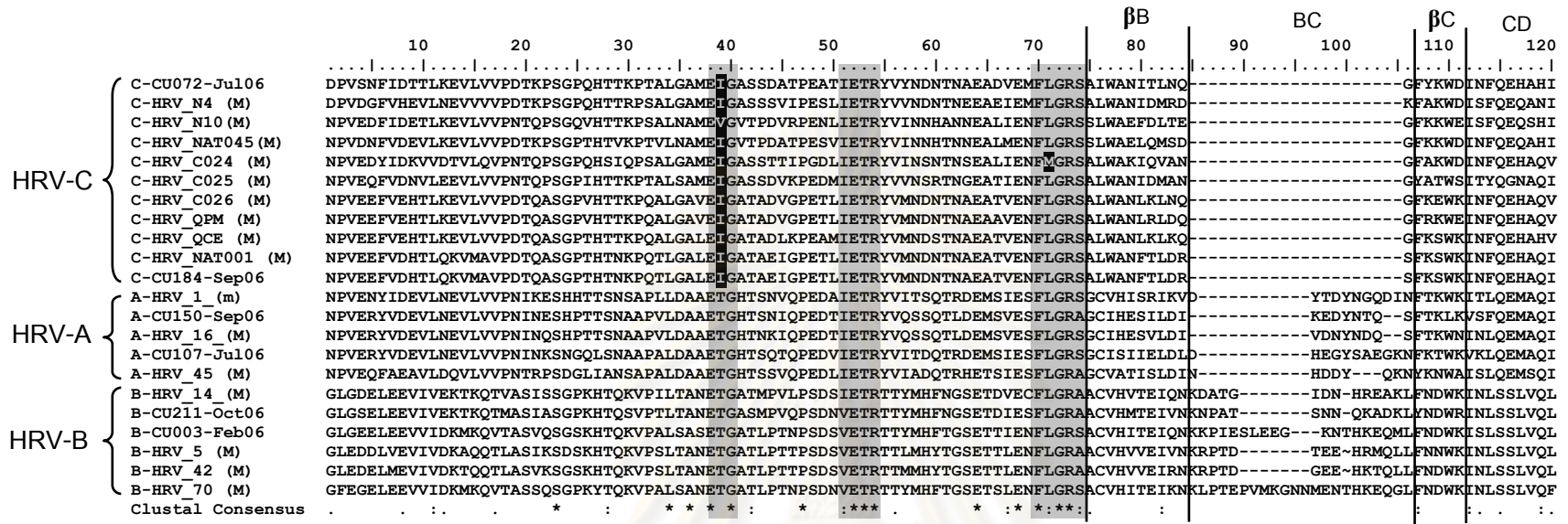
ตัวแทนของ HRV-C ได้แก่ HRV-C024, 025, 026, QPM, NAT001, NAT045, QCE, N4 และ N10 ซึ่งเป็น HRV-C ที่มีข้อมูล coding sequence ที่สมบูรณ์แล้ว

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบพบว่า HRV-A มีความหลากหลายของกรดอะมิโนภายใน สายพันธุ์มากกว่า HRV-B โดยมีค่า %amino acid identity เฉลี่ยมากกว่า 58% ในขณะที่ HRV-B มีค่าเฉลี่ยมากกว่า 68% เมื่อพิจารณาทั้ง HRV-A และ HRV-B พบว่าบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลง มาก ได้แก่ บริเวณ BC loop, DE loop และส่วนปลาย carboxy ของโปรตีน capsid VP1 โดยพบ การเปลี่ยนแปลงทั้งลำดับกรดอะมิโนและความยาวของ domain ส่วนบริเวณที่มีลักษณะอนุรักษ์ ร่วมระหว่างสายพันธุ์มากที่สุด คือ CD loop นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน (amino acid insertion) ในบางตำแหน่งของโปรตีน ซึ่งมีลักษณะจำเพาะต่อสายพันธุ์ ดังนี้

1 amino acid insertion พบใน HRV-A ในบริเวณส่วนต้นของ β G stand

2 amino acid insertion พบใน HRV-B ในบริเวณส่วนต้นของ DE loop

ถ้าหากพิจารณาไวรัสสายพันธุ์เดียวกันที่มีการใช้ receptor แตกต่างกัน เช่น HRV-16 ซึ่ง จัดเป็นไวรัส HRV-A ที่ใช้ ICAM-1 เป็น receptor (HRV-A/ major) เปรียบเทียบกับ HRV-1 ซึ่งใช้ LDL-R เป็น receptor (HRV-A/ minor) พบว่าโปรตีน VP1 ของไวรัสในกลุ่ม major มีลำดับกรดอะ มิโนส่วนมากเป็น hydrophilic และมีประจุลบ ในขณะที่ไวรัส กลุ่ม minor พบกรดอะมิโนที่มีความ หลากหลายมากกว่า และพบ deletion ในบริเวณ BC loop, DE loop และ GH loop นอกจากนี้ถ้า กำหนดให้ motif บนโปรตีน capsid VP1 ที่มีลักษณะอนุรักษ์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน หรือระหว่าง สายพันธุ์ของไวรัส HRV เป็นบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันตั้งแต่ 3 residue ขึ้นไป



ภาพที่ 26 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนซึ่งได้จากการแปลรหัสยีน VP1

	HI	β I								
	250	260	270	280	290	300	310			
HRV-C	C-CU072-Jul06	DD----	IVKNDVKVFKPKHISAWVPRPPRAT	EYTHKYSTNYHY--	KPDGEGHALTDRHF	IQKRNNIKNV~				
	C-HRV_N4 (M)	DD----	STNNHIKVIKPKHITAWIPRPPRAT	EYTHAYSTNYHY--	KAPDATPQQL	ESRHFMKFREQIKNV~				
	C-HRV_N10 (M)	ED----	KTNNDVKVFIKPKHIRAWCPRPPRAT	SYTHKNSTNYHT--	PTGASDG--	TLKEKHLYKHRDDIKNL~				
	C-HRV_NAT045 (M)	ED----	TAKQDVKVFVKPKHITAWCPRPPRAVDY	THRYSPTYHT--	KRVAPQ--	KLEEKHYINTRTIKTA~				
	C-HRV_C024 (M)	ED----	TNEHSIRVFKPKHTIAWIPRPPRATQY	THKFSTNYHV--	KKPDDTGLLIQKH	FINHRDITKTA~				
	C-HRV_C025 (M)	NNN---	SGTDIIRIFGKPKHTRAWIPRPPRAT	EYTHKSTNYNRVNP	NSDSTL	TRDHYIKTRATVTTA~				
	C-HRV_C026 (M)	DG----	TEVSDIKVFAKPKHTAAWIIPRPPRATQY	LHKFSTNYNK--	PKTKGSN--	ELEPKHFLKYRDDITSITTL				
	C-HRV_QEM (M)	DG----	TGASDIKVFVKPKHITAWIPRPPRATQY	LHKFSTNYNK--	PKTSGST--	ELEPKHFFKYRQDITSITNL				
	C-HRV_QCE (M)	DG----	ATSDIKVFAKPKHTAWIPRPPRATQY	LHKFSTNYNK--	PETEGSN--	ILIQKHFLHRADITTL~				
HRV-A	C-HRV_NAT001 (M)	DG----	AENSEIKIFAKPKHTAWIPRPPRATQY	LHKFSTNYNK--	QKPDSSG--	KLSPKHFLNTRNDIKNL~				
	C-CU184-Sep06	DG----	AENSEIKIFAKPKHTAWIPRPPRATQY	LHKFSTNYNK--	QKPDSSG--	KLSPKHFLNTRNDIKKL~				
	A-HRV_1 (m)		TEKQKHSVVI	THIYHKAKHTKAWCPRPPRAV	PYTHSHVTNYMPE--	TGDVTT-----	AIVRRNTITTA~			
	A-CU150-Sep06		TSEQVHKV	VVTRIYHKAKHTKAWCPRPPRAV	QYTHSHVTNYKLE	TDVHTSV-----	AIRPRTSLTNV~			
	A-HRV_16 (M)		TSEQLHKV	VVTRIYHKAKHTKAWCPRPPRAV	QYSHHTTNYKLS	SEVHNDV-----	AIRPRTNLTTV~			
	A-CU107-Jul06		TDQQKHKV	KITSRITYHKAKHISAWGPRPPRAV	PYRHIHNPYKTS	SSGVPDNR-----	VKLRDTLTTV~			
	A-HRV_45 (M)		TDQQQHRV	KIDSMVYLKAKHIAWIPRPPRAV	TYNHTYNPNY	VRADE~TATK-----	VQTRANVTTV~			
	B-HRV_14 (M)		NEHDEHKT	LVKIRVYHRAKHVEAWIPRAPRAL	PYTSIGRTNYPK	NTPEVIKK-----	RKGDIKSY~			
	B-CU211-Oct06		NDHDVHTT	EVKIRVYHRAKHIRAWIPRPPRAL	PYIKIGRTNYSK	PGAPVIKK-----	RNA-ITQY~			
HRV-B	B-CU003-Feb06		NDHDEHTT	IVKIRVFHRAKHIRAWIPRPPRAL	PYTSIGRTNFP	PNTHGKVIAR-----	RNK-ITTY~			
	B-HRV_5 (M)		NEHDNHTT	HVKRVYHRAKHIRAWIPRAPRAL	EYLHIGRTNYK	QSPQNPPIKT-----	RKT-ISTY~			
	B-HRV_42 (M)		NEHDIHTT	HVKIRVYHRAKHIRAWIPRAPRV	LEYLHIGRTNYK	QNPKNPIKT-----	RDS-ISTY~			
	B-HRV_70 (M)		NDHDVHTT	LVKIRVFHRAKHIRAWIPRPPRAL	PYTSIGKTNFP	PNTHSKVIAT-----	RDS-ITTY~			
	Clustal Consensus		:: :. ** **	***. :. *	. * :	. * :	. * :			

ภาพที่ 26 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนซึ่งได้จากการแปลรหัสยีน VP1

โดยแบ่งโปรตีนโครงสร้างทุติยภูมิออกเป็น ส่วน loop และ β -stand ตามการจัดเรียงตัวของโครงสร้าง ระบุด้วยชื่อเหนือลำดับกรดอะมิโน กำหนดให้ ก่อ่งสีเทา แสดงส่วนสำคัญของโปรตีน capsid VP1 แบ่งออกเป็น 10 motif ตามผลการทำ x-ray crystallography ซึ่งพบว่าเป็น motif ที่มีลักษณะร่วมของทั้ง HRV-A และ B

ตัวอักษรสีขาว แทนบริเวณที่พบ substitution ใน motif ของโปรตีน VP1 ของ HRV-C ซึ่งแตกต่างจาก A และ B

สัญลักษณ์ (*) แทนกรดอะมิโนที่พบเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ HRV (amino acid identity, fully conserve), (.) แทนกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน (amino acid similarity, stringly conserve), (.) แทนกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเหมือนกันเพียงเล็กน้อย (weakly conserve), M แทน major group HRV (ICAM-1), m แทน minor group HRV (LDL-R) และ ▲ แทนตำแหน่งที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ pleconaril susceptibility

ตัวอักษรเอียงและขีดเส้นใต้ แทนกรดอะมิโนส่วนสำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยากับ minor receptor (LDL-R)

ตามผลการศึกษาของ Thompson และคณะ⁵⁷ จะพบว่า HRV-B ประกอบด้วย conserve motif ทั้งสิ้น 24 motif ในขณะที่ HRV-A พบ 18 motif โดยว่ามี 10 motif ที่แสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันระหว่างทั้ง 2 สายพันธุ์ (แทนด้วยกล่องสี่เหลี่ยมในภาพที่ 26) โดยเกินกว่าครึ่งของ conserve motif พบอยู่ในโครงสร้าง β stand มากกว่าโครงสร้าง loop ลักษณะทั่วไปของ conserve motif ของสายพันธุ์ B นั้น จะมีความยาว ของ motif มากกว่าในสายพันธุ์ A เล็กน้อย สามารถสรุปลักษณะร่วมของ conserve motif ของไวรัส HRV ทั้ง 100 serotype ได้ดังตารางที่ 14

จากผลการศึกษาทางด้าน x-ray crystallography ของ HRV-14 และ 16 ในงานวิจัยก่อนหน้านี้⁵⁸⁻⁵⁹ ได้สรุปความสัมพันธ์ของ conserve motif ทั้ง 10 motif และโครงสร้างโปรตีน capsid ของอนุภาคไวรัส พบว่า motif ที่ 1 และ 2 ซึ่งอยู่ในส่วนปลาย N ของโปรตีน VP1 คือ ส่วนของโปรตีนจัดเรียงตัวอยู่ภายใต้โครงสร้างของโปรตีน capsid VP3 และเชื่อว่าเป็นบริเวณสำคัญที่เชื่อมต่อกับสาย RNA ของไวรัส ในขณะที่ motif ที่ 3 ซึ่งพบในส่วนปลาย N นั้น อยู่ใกล้กับโครงสร้าง β B stand มากกว่าส่วนอื่น motif เมื่อพิจารณาผลเปรียบเทียบกับลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้าง capsid แล้ว พบว่าเป็นส่วนโปรตีนที่ถูกประกอบเข้าเป็น pentamer subunit โดยมี motif 5, 6 และ 10 จัดเรียงตัวอยู่บริเวณผิวหน้าของอนุภาคไวรัส ในขณะที่ motif 9 ซึ่งมีลักษณะอนุรักษ์ในทุกสายพันธุ์นั้น พบ การจัดเรียงตัวอยู่ที่ผิวหน้าของอนุภาคไวรัส HRV-14 แต่กลับมีลักษณะการเรียงตัวที่แตกต่างไปใน HRV-16

โปรตีน VP1 ของ HRV สายพันธุ์ C มีขนาดเฉลี่ย 273 aa ซึ่งเล็กกว่าโปรตีน VP1 ของสายพันธุ์อื่น และยังพบลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างจากสายพันธุ์ อื่นด้วย เนื่อง มาจากเกิด deletion ที่โปรตีน VP1 บางส่วน โดยเฉพาะส่วน BC loop และ DE loop เป็นส่วนที่พบ deletion มากกว่าบริเวณอื่น เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ conserve motif ทั้ง 10 ตำแหน่ง ซึ่งมีลักษณะอนุรักษ์ร่วมของทั้งสายพันธุ์ A และ B พบว่าใน HRV-C มีลักษณะของกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง แสดงลักษณะ อนุรักษ์ร่วมกับสายพันธุ์อื่น เช่น ใน motif 9 มีลำดับกรดอะมิโน คือ FYDGY เหมือนกันทุกสายพันธุ์ ในขณะที่บาง motif ของ HRV-C มี amino acid substitution ที่จำเพาะ แตกต่างจากอีก 2 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 6 motif ตัวอย่างเช่น

motif 1 : E(IV)G พบว่า HRV-C เกือบทุก strain พบการเปลี่ยนแปลงจาก T เป็น I ยกเว้น N10 เปลี่ยนแปลงจาก I เป็น V ในขณะที่ HRV-A และ B ทุก serotype แสดงลักษณะของกรดอะมิโนร่วมกัน คือ ETG

motif 4 : RFD(ML) พบลักษณะของ amino acid substitution ใน HRV-C แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ strain N4, N10, NAT045, C024 และ CU072 พบการเปลี่ยนแปลงจาก S เป็น M ในขณะที่ strain QCE, C025, C026, NAT001 และ CU184 พบ substitution ด้วย L แทน S

motif 7 : RFTIPF ทุก strain ของสายพันธุ์ C พบการเปลี่ยนแปลงจาก S เป็น T และมีลักษณะอนุรักษ์ในทุก strain แตกต่างจากในสายพันธุ์ A และ B : (KR)(FI)(ST)(ILV)P(FY) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนมาก

motif 8 : (GL)(GSA)(SI)(SA)Y พบว่ามากกว่า 8 strain จากทั้งหมด 10 strain มีลักษณะกรดอะมิโนร่วมกัน คือ LGSAY ในขณะที่ CU072 มีกรดอะมิโนลักษณะที่แตกต่างไปจาก strain อื่นๆ คือ GSISY และพบว่า strain N4 มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้คล้ายกับที่พบในสายพันธุ์ A และ B มากกว่า

นอกจากนี้พบว่าในบาง motif บนโปรตีน capsid VP1 ของ HRV-C แสดงลักษณะ amino acid substitution ที่มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์ด้วยตัวเอง เช่นตัวอย่างที่พบใน motif 6 แต่อย่างไรก็ดี เนื่องจากผลการศึกษานุภาคไวรัส HRV-C ยังมีอยู่อย่างจำกัด จึงทำให้ไม่สามารถทำนายบทบาทที่แน่ชัดของแต่ละ motif ต่อการกำหนดหน้าที่ของโปรตีน capsid VP1 ของไวรัสได้

ตารางที่ 16 ลักษณะทั่วไปของ conserve motif ของ HRV-A และ B เทียบกับ HRV-C

motif	location in VP1	position ^a	conserve amino acid sequence ^b	
			HRV-A, B	HRV-C
1	amino terminal	38-40	ETG	E(IV)G
2	amino terminal	51-54	(ILMV)ETR	IETR
3	amino terminal	69-74	FLGR(AS)	FLGRS
4	β D stand	123-126	RF(DN)SE	RFD(ML)
5	β E stand, EF loop	153-156	(IV)PPG	(IV)PPG
6	EF loop	168-170	W(EQ)(ST)	W(NDQ)(TAGS)
7	β G stand	186-191	(KR)(FI)(ST)(ILV)P(FY)	RFTIPF
8	β G stand	194-198	(ILV)(AT)SAY	(GL)(GSA)(SI)(SA)Y
9	GH loop	201-205	FYDGY	FYDGY
10	β H stand, HI loop	228-230	R(ILMV)(IV)	R(AT)LP

^a ตำแหน่งของกรดอะมิโนอ้างอิงจากผลการทำ amino acid sequence alignment โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ HRV-16 และ HRV-14 ในการเปรียบเทียบตำแหน่ง

^b ความหลากหลายของกรดอะมิโนที่พบระหว่าง serotype ในตำแหน่งที่ทำการวิเคราะห์ แสดงในวงเล็บ

2.5.2 ชนิดของ Receptor ที่ไวรัสใช้ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ในการทำนายชนิดของ receptor ที่อนุภาคไวรัสใช้จับเพื่อรุกรานเซลล์เจ้าบ้านนั้น พิจารณาได้จากลำดับกรดอะมิโนซึ่งแสดงลักษณะจำเพาะของบนโปรตีน capsid ของไวรัส โดยทั่วไป เชื้อไวรัส HRV ใช้ receptor 2 ชนิดหลักในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ receptor หลัก คือ ICAM-1 (HRV-A = 64, HRV-B = 25) และ receptor รอง คือ LDL-R (HRV-A = 10) จากลักษณะสำคัญของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง receptor และโครงสร้างโปรตีน capsid ของอนุภาคไวรัส พบว่าในไวรัสกลุ่มหลัก จะอาศัยการจับกันระหว่างส่วนปลาย N หรือ D1 domain ของ ICAM-1 receptor กับบริเวณ canyon floor บน icosahedral capsid ของอนุภาคไวรัส จากผลการศึกษาใน HRV-14 และ HRV-16 พบว่าทั้งสอง serotype ใช้ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ canyon floor ซึ่งอยู่ในส่วนปลายของโปรตีน capsid VP3 และโปรตีน capsid VP1 เพื่อจับกับ ICAM-1 receptor ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน และแสดงลักษณะจำเพาะภายในสายพันธุ์ และด้วยลักษณะที่แตกต่างกันนี้ จึงมีการนำ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนมาใช้ประโยชน์เพื่อการจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัส HRV ได้

สำหรับ HRV-A ซึ่งส่วนมากใช้ ICAM-1receptor เป็นหลัก (HRV-A/ major) พบว่ามีกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการจับกับ receptor ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ได้แก่ T3179, P3180, D3181, T3182, S3185, G1148, I1151, R1205, V1209 และ P1213 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายใน HRV-A ซึ่งใช้ receptor ที่แตกต่างชนิดกัน พบว่า HRV-A กลุ่มที่ใช้ ICAM-1 เป็น receptor จะแสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกัน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ T3179, P3180, D3181 และ G1148 ในขณะที่กรดอะมิโนในบริเวณนี้ของ HRV-A ที่ใช้ LDL-R เป็น receptor จะแสดงลักษณะอนุรักษ์ร่วมกันภายในกลุ่มรอง (HRV-A/ minor) และพบว่าแสดงลักษณะร่วมกับกลุ่ม HRV-A/ major เพียงตำแหน่งเดียว คือ G1148 นอกจากนี้ในตำแหน่ง 1185 ของ HRV-A/ minor พบ deletion ใน serotype 2, 23, 30 และ 49 และพบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่ง 1205 และ 1209 มีความหลากหลายมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ ในส่วนที่ทำการวิเคราะห์นี้

สำหรับสายพันธุ์ B ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญ 9 ตำแหน่ง (อ้างอิงจาก HRV-14) ได้แก่ D3177, P3178, D3179, T3180, Q3226, P1155, N1159, H1206 และ V1217 โดย HRV-B จะแสดงลักษณะอนุรักษ์ภายในสายพันธุ์เดียวกันมากกว่าภายในสายพันธุ์ A จากผลการศึกษาของ Laine และคณะในปี 2006 ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนของ HRV-B ทุก serotype ในตำแหน่งที่สำคัญต่อการจับกับ ICAM-1 receptor เหล่านี้ พบว่า HRV-B

17 serotype จากทั้งหมด 25 serotype แสดงลักษณะอนุรักษร่วมกันในทุกตำแหน่ง ในขณะที่อีก 8 serotype พบ amino acid substitution เพียง 1 ตำแหน่งที่แตกต่างไป กล่าวคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย serotype 35, 79, 83 และ 92 มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 3178 เป็น K ในขณะที่ส่วนใหญ่เป็น P และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย serotype 27, 84, 93 และ 97 มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 3226 เป็น S แตกต่างจาก HRV-B ส่วนใหญ่ที่เป็น Q แต่อย่างไรก็ตามใน serotype ที่พบความแตกต่างที่นี้ยังคงใช้ ICAM-1 เป็น receptor เช่นเดียวกัน HRV-B อื่นๆ

ตารางที่ 17 ลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญบนโปรตีน capsid VP1 และส่วนปลาย C ของโปรตีน capsid VP3 ของ HRV แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งใช้ในการจับกับ ICAM-I receptor

species/ receptor	conserved amino acid sequences									
	3179	3180	3181	3182	1148	1151	1213			
A/ major	T	P	D	A/I/K/M/N/S/T	G	A/F/K/I/L/T/V	A/D/H			
A/ minor	A/S	D/K/N/P/R/S	D/G/N	E/K/P/T	G	I/V	D/N/R			
C	K/R	A/K/S/G	D/S	N/D/E/K	G	A/P/S/V	D/G			
	3177	3178	3179	3180	3226	1155	1159	1206	1217	
B/ major	D	K/P	D	T	Q/P	P	N	H	V	
C	K/R	A/K/S/G	D/S	N/E/K/D	P/H	P				

ตารางที่ 17 ดัดแปลงจากผลการศึกษาของ Lau และคณะ^[11]

การระบุตำแหน่งของกรดอะมิโน อ้างอิงจากผลการศึกษา ICAM-1 footprint ของ HRV-16 และ 14 ตามรายงานของ Kolatkar และคณะ^[60]

จากผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของ HRV-B ทั้ง 2 strain ซึ่งแยกได้จากการศึกษาวิจัยนี้ พบว่า CU003 ยังคงแสดงลักษณะอนุรักษของกรดอะมิโนในตำแหน่งเหล่านี้สอดคล้องกับ HRV-B ส่วนใหญ่ จึงน่าจะใช้ ICAM-1 เป็น receptor ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ในขณะที่ CU211 พบ amino acid substitution แตกต่างไปจาก prototype ในบางตำแหน่งซึ่งโดยทั่วไปจะพบลำดับกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะภายใน HRV-B ได้แก่ ตำแหน่ง 3177 พบการเปลี่ยนแปลงจาก D3177 เป็น E3177 และตำแหน่ง 1159 เปลี่ยนจาก N1159 เป็น S1159

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ HRV สายพันธุ์ C ในตำแหน่งที่สำคัญต่อการเกิดอันตรกริยากับ ICAM-1 receptor พบว่ามีตำแหน่งที่แสดงลักษณะอนุรักษร่วมกับ HRV-A/

major ทั้งหมด 5 ตำแหน่งจาก 9 ตำแหน่ง โดยพบว่าใน HRV-C ทุก strain ยังคงแสดงลักษณะอนุรักษ์ของกรดอะมิโน G1148 ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญในสายพันธุ์ A ทุก serotype และพบลักษณะร่วม 4 ตำแหน่งจากทั้งหมด 7 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ B (HRV-B/ major) จากรายงานผลการศึกษาของ Vlasak และคณะในปี 2003^[61] พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่สำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคของไวรัสและ minor receptor LDL-R นั้น คือ Lysine ใน TEK motif ซึ่งตรงกับตำแหน่ง 224 (K224) ใน HI loop บนโปรตีน capsid VP1 อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ HRV-C ทุก strain รวมทั้ง CU072 และ CU184 ไม่พบกรดอะมิโน K224 หรือ TEK motif บนโปรตีน capsid VP1 จึงสามารถสรุปได้ว่า HRV-C ไม่ได้ใช้ LDL-R เป็น receptor ในการรุกรานเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน หรืออาจใช้ ICAM-1 เช่นเดียวกับ HRV-A และ B ส่วนมาก แต่อาจจะมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่สำคัญต่อการ จับกับ receptor เปลี่ยนแปลงไป หรือ HRV-C อาจจะใช้ receptor ชนิดอื่นแตกต่างไปจากอีกสองสายพันธุ์ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

		G1148					
		▼					
HRV-A	HRV_16 (M)	TPDTS	GIRVD	HRV-B	HRV_14 (M)	DPDTQ	PNHV
	CU107-Ju106	TPDTK	GLPVD		HRV_93 (M)	DPDTS	PNHV
	CU150-Sep06	TPDTS	GIRVD		HRV_83 (M)	DKDTQ	PNHV
	HRV_25 (m)	SRDEA	GLRTR		CU003-Feb06	DPDTQ	PNHV
	HRV_1 (m)	ANDKM	GIKID		CU211-Sep06	EKDTQ	PSHV
	HRV_2 (m)	SPGT-	GVNAN		QPM (M)	RKDN	PPPG
HRV_23 (m)	SPDT-	GIHVN	C024 (M)	KADN	PPAVS		
HRV-C	QPM (M)	RKDNE	GPNSD	HRV-C	C025 (M)	KADN	PPPKV
	C024 (M)	KADNQ	GAVTD		C026 (M)	RKDN	PPAGL
	C025 (M)	KADNE	GPTSD		N4 (M)	KSDE	PPPTP
	C026 (M)	RKDNE	GANSD		N10 (M)	KADK	PPSES
	N4 (M)	KSDEH	GPKSD		NAT001 (M)	KKDD	PPVGE
	N10 (M)	KADKS	GSSSSG		NAT045 (M)	KGSN	PPAEA
	NAT001 (M)	KKDDE	GVNSD		CU072-Ju106	KADN	HPPTP
	NAT045 (M)	KGSNS	GATSD		CU184-Sep06	KKDD	PPAGE
	CU072-Ju106	KADNE	GPTSD				
	CU184-Sep06	KKDDE	GANSD				

ภาพที่ 27 ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณส่วนปลาย N ของโปรตีน capsid VP3 และ capsid VP1

ที่สำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคไวรัส HRV กับ ICAM-1

2.5.3 ผลการทำนายการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส

การทำนายแนวโน้มการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส pleconaril นั้น ใช้เกณฑ์การพิจารณา ลำดับกรดอะมิโนซึ่งอยู่ในบริเวณ drug binding pocket ของไวรัส HRV โดยอ้างอิงจากผลการศึกษาของ Ledford และคณะ^[9, 62] ซึ่งทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ของ HRV ทั้ง 100 serotype ต่อความสามารถในการตอบสนองต่อยา pleconaril พบว่า HRV-A ทั้งหมด 75 serotype ไม่ต้านทานต่อยาชนิดนี้ สำหรับ HRV-B มี 18 serotype จากทั้งหมด 25 serotype ที่ไม่ต้านต่อยา pleconaril (susceptible strain) เมื่อใช้ความเข้มข้นของยาต่ำในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีค่าความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50% หรือค่า 50% effective concentration (EC_{50}) อยู่ระหว่าง 0.02-6.68 μ M ในขณะที่อีก 7 serotype ที่ต้านทานต่อยา pleconaril ซึ่งกำหนดโดยธรรมชาติของไวรัสเอง (natural resistant serotype) ได้แก่ serotype 4, 5, 42, 84, 93, 97 และ 99 โดยมีค่า EC_{50} มากกว่า 12.5 μ M และพบว่าเมื่อพิจารณา ลำดับกรด อะมิโนของ natural resistant serotype เหล่านี้ มีลักษณะบางประการที่แสดงเอกลักษณ์เฉพาะ แตกต่างไปจากกลุ่มที่ไม่ต้านต่อยา pleconaril

ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบ ลำดับกรดอะมิโนของ เชื้อไวรัส HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์ เพื่อทำนายแนวโน้มการตอบสนองต่อยา pleconaril โดยเลือกใช้ serotype 1 และ 16 เป็นตัวแทนของ HRV-A และ serotype 14 เป็นตัวแทนของ HRV-B เนื่องจาก serotype เหล่านี้ ได้มีรายงานผลการศึกษาโครงสร้าง capsid ของอนุภาคไวรัสด้วยวิธี X-ray crystallography แล้ว และจัดเป็น prototype ของเชื้อ HRV โดยพบว่าบริเวณ drug binding pocket ของไวรัสเหล่านั้น มีกรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญต่อการจับกับยาต้านไวรัสหรือโมเลกุลขนาดเล็กชนิดอื่นๆ ทั้งสิ้น 25 residue ซึ่งตำแหน่งของกรดอะมิโนใน HRV-A และ HRV-B สรุปได้ดังตารางที่ 18 จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ drug binding pocket นี้ แสดงให้เห็นว่า ลำดับกรดอะมิโนของ HRV-A มีความหลากหลายค่อนข้างมาก โดยมีเพียง 8 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 25 ตำแหน่ง ที่มีลักษณะเหมือนกันในทุก serotype ได้แก่ ตำแหน่ง 118, 120, 143, 167, 190, 192, 212 และ 214 พบกรดอะมิโน 10 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างของกรดอะมิโนระหว่าง serotype แค่เพียงสองชนิดเท่านั้น⁹ ในขณะที่เชื้อ HRV-B พบว่าโดยทั่วไปลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ drug binding pocket มีความหลากหลายน้อยกว่า HRV-A โดยพบว่ามีกรดอะมิโน 17 ตำแหน่งจากทั้งหมด 25 ตำแหน่ง ที่แสดงลักษณะอนุรักษ์ในสายพันธุ์ B

เมื่อทำการวิเคราะห์ ภายในสายพันธุ์ HRV-B เปรียบเทียบระหว่าง pleconaril susceptible serotype และ natural pleconaril resistant serotype ตัวอย่างเช่น serotype 5 และ 42 พบว่ามีกรดอะมิโนส่วนมากที่แสดงคุณสมบัติเหมือนกรดอะมิโนของ serotype อื่นๆ ในสายพันธุ์ B ทุกประการ ในขณะที่บางตำแหน่งจะแสดงลักษณะเฉพาะของ pleconaril resistant serotype และแตกต่างจาก susceptible serotype อย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ ในตำแหน่งที่ 152 และ 191 นั้น ใน HRV สายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อยา pleconaril จะมีลำดับกรดอะมิโนหลัก เป็น Y152 และ V191 ในขณะที่ resistant serotype มีกรดอะมิโนเป็น F₁₅₂ (Y152F) และ L₁₉₁ (V191L) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อพิจารณา serotype 5 และ 42 เปรียบเทียบกับ resistant serotype อื่นๆ และ HRV-14 ซึ่งใช้เป็นไวรัสต้นแบบของสายพันธุ์ B พบความแตกต่างของกรดอะมิโนในบริเวณ drug binding pocket แค่เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของ serotype 26 พบว่ามีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 191 แตกต่างไปเพียงตำแหน่งเดียว (V191L) เมื่อพิจารณาใน susceptible serotype อื่นๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในทั้งสองตำแหน่งนี้ได้เช่นกันแต่จะไม่มีลำดับเป็น F₁₅₂ และ L₁₉₁ นอกจากนี้มีรายงานว่าถ้าหากเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง 152 แค่เพียงตำแหน่งเดียวนั้น จะไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไวรัส

นอกจากนี้ได้มีผลการศึกษา มากมายที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง 152 และ 191 ซึ่งส่งผลสำคัญต่อ drug susceptibility ของไวรัส อาทิเช่น ผลการศึกษาของ Ledford และคณะ^[62] ซึ่งได้ทำการศึกษา pleconaril susceptibility ของไวรัส HRV-14 ด้วยการทำ mutagenesis ทั้งสองตำแหน่งนี้ และพบว่าให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ก่อนหน้า คือ HRV-14 mutant ซึ่งมีกรดอะมิโนใน drug binding pocket เป็น F₁₅₂ และ L₁₉₁ นั้นมีค่า EC₅₀ มากกว่า 10 μ M และผลที่ได้แตกต่างจาก HRV-14 wild type หรือ HRV-14 mutant ที่ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนแค่เพียงตำแหน่งเดียว เป็นอย่างมาก และพบว่าการเกิด amino acid substitution ที่ตำแหน่ง 191 มีความสำคัญมากกว่าตำแหน่ง 152 ตัวอย่างเช่น ถ้าหากพบการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง นี้เป็น T₁₉₁ จะส่งผลให้ไวรัสมีค่า EC₅₀ สูงขึ้น หรือกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของยามากขึ้นจึงจะยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 50% ซึ่งค่าความเข้มข้นที่มากเกินไป อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์เจ้าบ้านได้ จึงสรุปได้ว่าตำแหน่ง 191 ถือเป็นตำแหน่ง สำคัญ และใช้ ทำนายแนวโน้มการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส ได้ และถ้าหากพบการเปลี่ยนทั้ง 2 ตำแหน่ง ไวรัสสายพันธุ์นั้นอาจเกิดการต้านทานต่อยา pleconaril ได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนใน drug binding pocket ทั้ง 25 residue ของเชื้อ HRV-A และ B

HRV-A																									
amino acid position	98	99	100	101	118	120	122	124	142	143	144	166	167	168	179	181	184	190	192	208	212	214	217	238	260
majority sequence (HRV-16)	I	N	L	Q	E	S	I	L	Y	M	Y	A	S	V	F	L	L	Y	M	T	N	M	L	H	H
1	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	I	-	-	-	-	-	S	-	-	I	-	-
45 (clade D)	-	S	-	-	-	-	-	I	-	-	F	-	-	-	-	I	S	-	-	V	-	-	I	L	Y
CU107-	V	K	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
CU150-	V	S	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

HRV-B																									
amino acid position	104	105	106	107	124	126	128	130	150	151	152	174	175	176	186	188	191	197	199	215	219	221	224	245	267
majority sequence (HRV-14)	I	N	L	S	E	S	Y	I	A	M	Y	P	S	V	E	V	V	Y	C	I	N	M	M	H	G
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-
CU003-Feb06	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	I	-	-
CU211-Oct06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-

กำหนดให้ majority sequence คือ กรดอะมิโนใน drug binding pocket ประกอบด้วย 25 residue สำคัญ โดยใช้ HRV serotype 16 และ 14 เป็นตัวแทนของ HRV-A และ B ตามลำดับ การระบุตำแหน่ง ใช้การระบุตัวเลขตามผลการทำ amino acid sequence alignment โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ serotype ตัวแทนเป็นเกณฑ์ สัญลักษณ์ '-' แทนกรดอะมิโนที่เป็นมีลักษณะเหมือนกับ majority sequence ทุกประการ, ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ แทนกรดอะมิโนที่พบเหมือนกันในทุก serotype

สำหรับ HRV-C เป็นไวรัส HRV สายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีผลการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีน capsid ของไวรัสด้วยวิธี X-ray crystallography จึงใช้การทำนายแนวโน้มการตอบสนองต่อยา pleconaril โดยการพิจารณา amino acid substitution ในตำแหน่งที่สำคัญทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ พบว่าที่กรดอะมิโนในตำแหน่ง 152 ของ HRV-C ส่วนมาก มีกรดอะมิโนเป็น F₁₅₂ คล้ายกับ natural resistant serotype ยกเว้น HRV-C N10, NAT045 และ C025 ที่พบกรดอะมิโนเป็น Y₁₅₂ และใน ตำแหน่ง 191 นั้น พบว่า HRV-C ทุก strain มีลำดับกรดอะมิโนเป็น T₁₉₁ จึงทำนายได้ว่า HRV-C ทุก strain ที่มีรายงานข้อมูล coding sequence รวมทั้ง CU072 และ CU184 ซึ่งเป็น strain ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ มีแนวโน้มต้านทานต่อยา pleconaril

2.6 ผลการวิเคราะห์โอกาสในการเกิด Recombination ของ Human Rhinovirus

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน coding sequence ของ HRV ทั้ง 6 strain ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ด้วยวิธี bootscan, similarity plot และวิเคราะห์แนวโน้มการเกิด recombination ด้วยโปรแกรม RDP3 เปรียบเทียบ strain ที่สนใจกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ prototype ที่มีรายงานในฐานข้อมูลทั้งหมด พบว่า CU211 ซึ่งจัดเป็น HRV-B ที่พบลักษณะ recombination ระหว่างเชื้อ HRV-B 2 serotype จากการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CU211 มีลักษณะโดยรวมคล้ายกับ HRV-35 โดยครอบคลุมความยาวกว่า 80% ของ ORF และมีค่า %pairwise identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 84% และ 92% ตามลำดับ ในขณะที่ตำแหน่งที่ 766-1,590 nt ซึ่งตรงกับส่วนปลาย 3' ของยีนควบคุมการสร้างโปรตีน capsid VP2 และ VP3 แสดงผลการวิเคราะห์ให้ค่า bootstrap ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับ HRV-69

2.7 ผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการของเชื้อ CU072 เปรียบเทียบกับ N4 โดยพิจารณาผลการเปลี่ยนแปลงในโปรตีนส่วนต่างๆ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CU072 ด้วยการทำ bootscan analysis (ภาพที่ 28) พบว่าลักษณะทั่วไปของ ORF ของ CU072 มีความคล้ายคลึงกับ N4 โดยมีค่า % identity เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 73% และ 78% ตามลำดับ และพบว่า CU072 แสดงค่า %pairwise identity ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ 3D กับ strain อื่นๆ ในสายพันธุ์ HRV-C โดยมีค่าเฉลี่ย %identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบภายในสายพันธุ์เท่ากับ 66% และ 69%

ตามลำดับ สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ phylogenetic analysis ในบริเวณ 3D (ภาพที่ 29) ซึ่ง CU072 แสดงผลการจัดตำแหน่งบน phylogenetic tree เป็นเอกลักษณ์แยกจาก strain อื่นๆ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ CU072 เปรียบเทียบกับ N4 ซึ่งเป็น strain ที่มีค่า %pairwise sequence identity สูงที่สุดและมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันมากกว่า strain อื่นๆ พบว่าความหลากหลายในยีนแต่ละส่วนของทั้ง 2 strain นี้มีค่าแตกต่างกันไป ขึ้นกับส่วนของยีนที่ทำกรวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์ความแตกต่างเชิงโมเลกุลของ CU072 และ N4 ในบริเวณ coding sequence เพื่อทำนายลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเปรียบเทียบกันนั้น ได้แบ่งรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นออกเป็น 2 รูปแบบสำคัญ^[63] ได้แก่

(1) การเปลี่ยนแปลงแบบ synonymous (S) คือ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป แต่การเปลี่ยนแปลงนั้นไม่ส่งผลต่อการลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งนั้น

(2) การเปลี่ยนแปลงแบบ nonsynonymous (NS) คือ การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป แล้ว ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนนั้นๆ และถ้าหากการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในตำแหน่งที่สำคัญ ย่อมส่งผลกระทบต่อการทำงานหรือหน้าที่ของโปรตีนได้ ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนแบบ NS ที่เกิดขึ้นนั้น ได้แบ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่พบ NS แบบ non-conservative (NS-NC) คือ กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นมีสภาพขั้ว (polarity) แตกต่างไปจากเดิม และกลุ่มที่พบ NS แบบ conservative (NS-C) คือ พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน แต่กรดอะมิโนยังคงมีสภาพขั้วเหมือนเดิม แสดงผลสรุปการวิเคราะห์ข้อมูลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CU072-Jul06 และ N4 ในส่วน viral protein

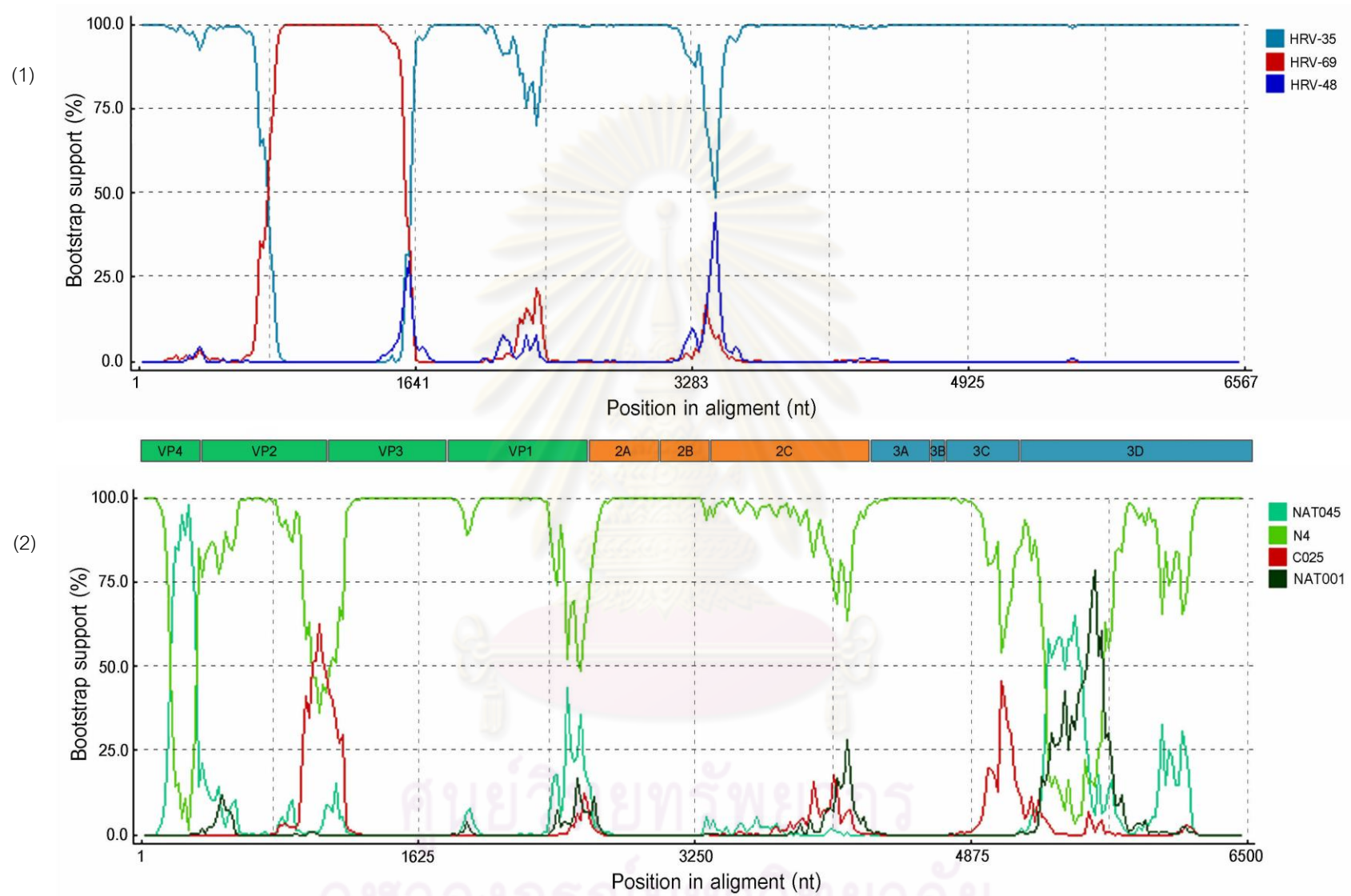
Viral protein	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
variation (nt)	55	209	176	213	81	63	316	59	20	139	397
variation (nt%)	27	26	25	26	19	21	32	26	30	25	29
variation (aa%)	14	31	25	23	16	19	26	12	23	16	24
NS variation (aa)	9	80	56	63	23	19	34	9	5	29	70
NS variation (%)	19	58	42	44	41	43	19	20	36	25	30
NS-NC variation (%NC)	33	40	38	29	48	21	44	33	40	14	30

NS = nonsynonymous, NC = nonconservative amino acid

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ยีน 2C คือ ส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 32% หรือ 26% เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และในส่วนของยีน 2A ขนาด 426 nt พบความแตกต่างระหว่างทั้งสอง strain น้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 19% หรือ 16% เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนตามลำดับ ในขณะที่โปรตีน capsid VP2 ซึ่งมีความแตกต่าง ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ ปานกลาง (26%) กลับพบความหลากหลาย ของกรดอะมิโนเท่ากับ 31% สูงกว่าโปรตีนส่วนอื่น และคิดเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ NS เท่ากับ 58% โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่เป็น NS-NC เท่ากับ 40% โปรตีนส่วนที่มีค่า %NS รองลงมา ได้แก่ โปรตีน capsid VP1, 2B, VP3 และ 2A ตามลำดับ สำหรับโปรตีน 2C ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบว่ามีความแตกต่างจาก N4 ค่อนข้างมากนั้น (26%) กลับพบว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น NS น้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 19% และมีอัตราส่วนของ NS-NC และ NS-C ใกล้เคียงกัน

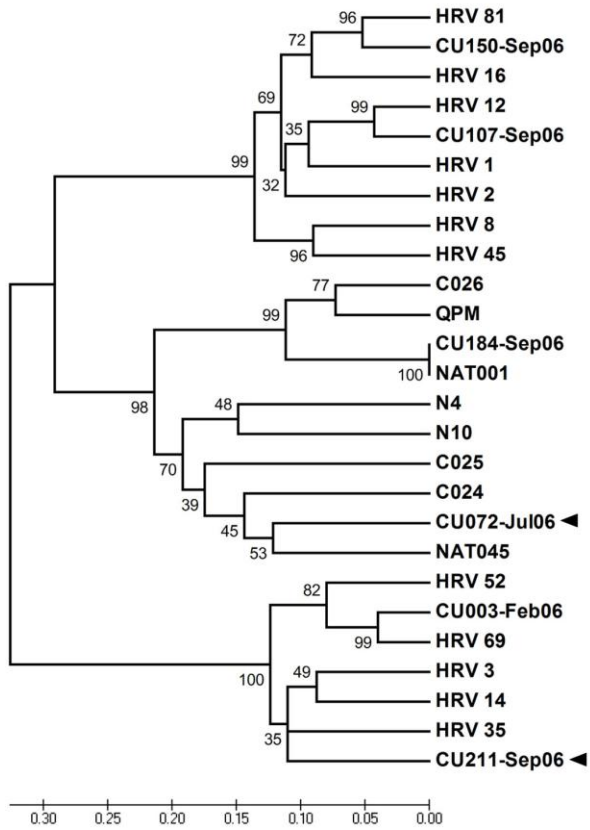
เมื่อพิจารณา ลักษณะ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นพบว่าโปรตีน 2A เป็นส่วนที่พบการเปลี่ยนแปลงแบบ NS-NC มากกว่าส่วนอื่นๆ ในขณะที่โปรตีน 3C ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงแบบ NS ในระดับปานกลาง (25%) มีลักษณะแปลงแบบ NS-NC น้อยที่สุด ในส่วนโปรตีน 3D พบว่า CU072 ยังคงรักษาลักษณะโดยรวมของโปรตีนคล้ายกับ N4 โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนแบบ NS เท่ากับ 30% และพบว่ามีเพียง 30% ของการเปลี่ยนแปลงแบบ NS ที่เป็นรูปแบบ NS-NC ในส่วนของโปรตีน capsid VP4 ซึ่งมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับ N4 แต่เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนพบความหลากหลายน้อย สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่พบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงแบบ NS น้อยที่สุด (19%) สามารถสรุปได้ว่าโอกาสที่จะพบการเปลี่ยนแปลงในส่วนใดส่วนหนึ่งนั้นไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของยีน นอกจากนี้ในโปรตีน capsid VP2 ยังพบ insertion ของกรดอะมิโน 3 residue ตำแหน่งที่ 158-160 โดยมีลำดับของกรดอะมิโนคือ G,P และ N ตามลำดับ และโปรตีน capsid VP3 และ VP1 พบ deletion ของกรดอะมิโน 1 residue ทำให้ polyprotein ของ CU072 มีขนาดแตกต่างจาก N4 เล็กน้อย

จากการพิจารณาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ NS นั้น มักไม่พบในตำแหน่งที่สำคัญต่อการกำหนดหน้าที่ของโปรตีน เช่น motif ต่างๆ หรือ receptor binding site แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ไวรัสจะอาศัยการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งหรือใช้กลไก recombination ระหว่างยีน เพื่อการพัฒนาวิวัฒนาการของไวรัส แต่จะยังคงรักษาลักษณะอนุรักษ์บางประการที่สำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ของไวรัสเอาไว้

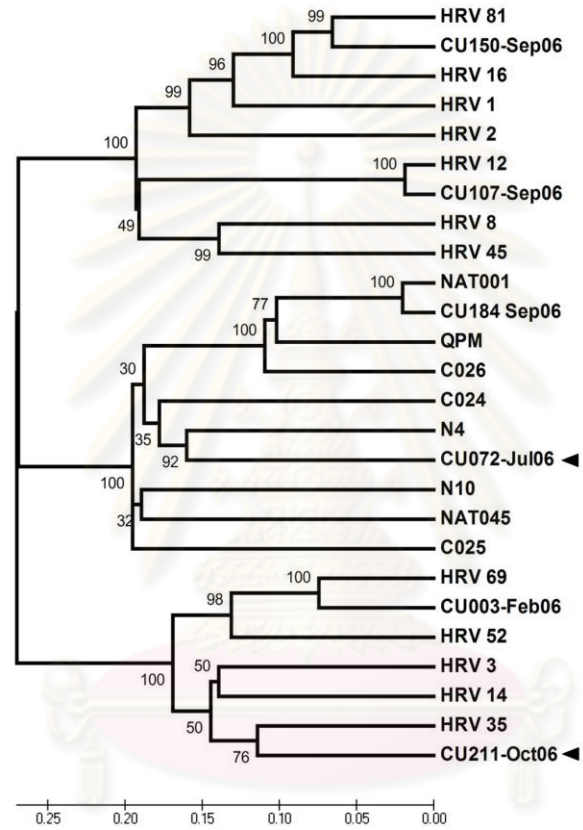


ภาพที่ 28 ผลการทำ Bootstrap plot เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CU072-Jul06 และ CU211-Sep06 กับ serotype อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยพบว่า (1) CU211-Sep06 แสดงลักษณะร่วมของ HRV-35 และ HRV-69 และ (2) CU072-Jul06 แสดงลักษณะร่วมระหว่างสายพันธุ์ N4, NAT001 และ NAT045

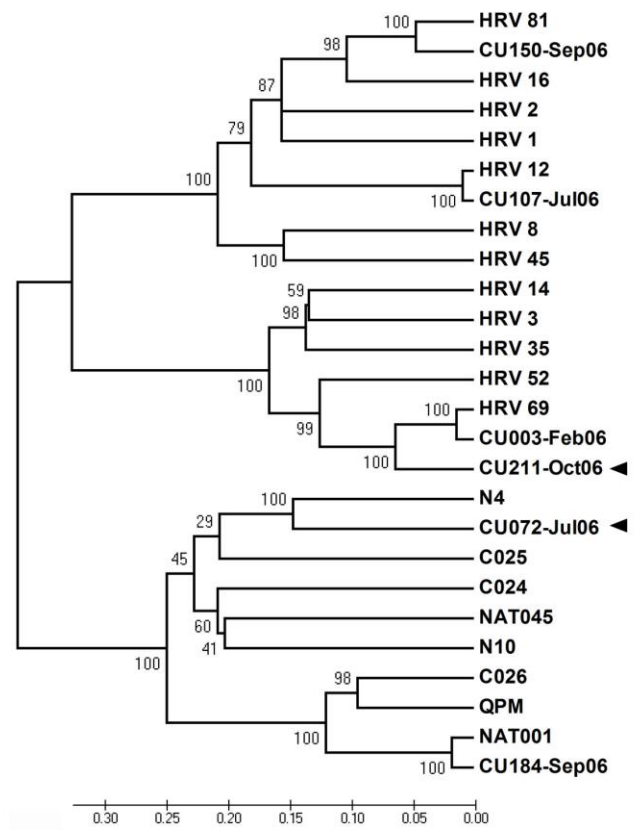
VP4



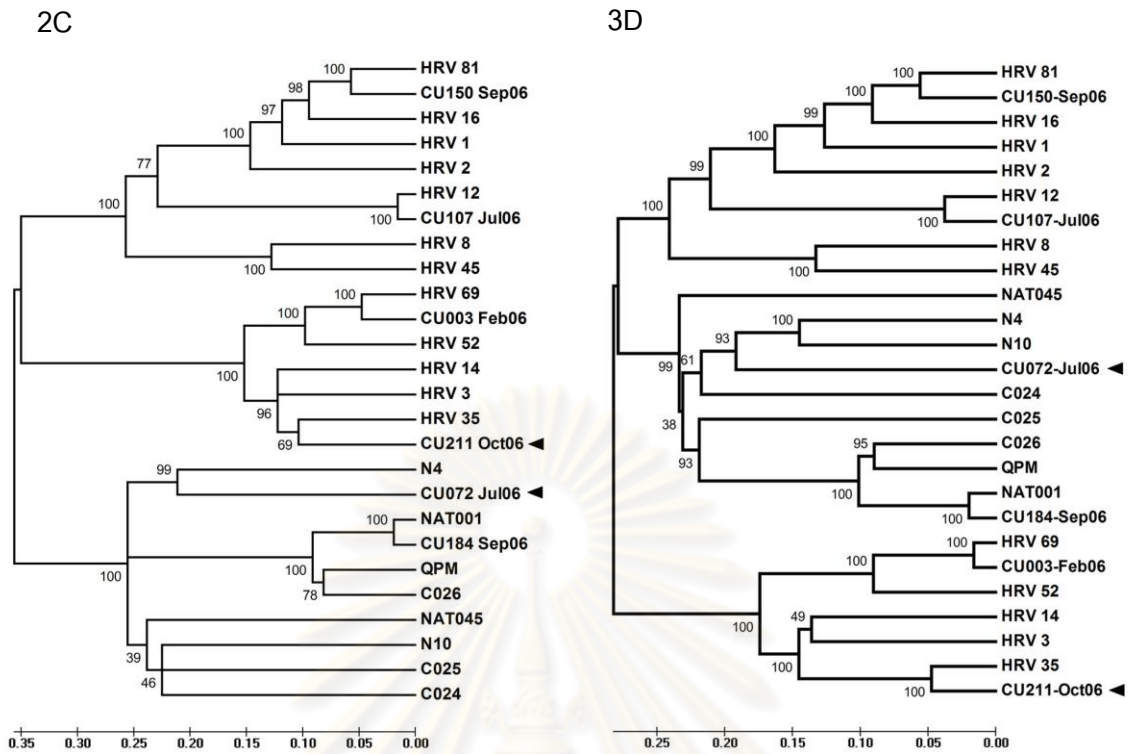
VP2



VP3



ภาพที่ 29 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ viral protein ของเชื้อ HRV ในตัวอย่างที่ทำการศึกษา กำหนดให้ลูกศรสีดำแสดงตัวอย่างที่พบ recombination ในส่วน coding sequence ส่วนต่างๆ โดย CU211-Sep06 พบ recombination ในส่วน VP2 และ VP3



ภาพที่ 29 (ต่อ) Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ viral protein ของเชื้อ HRV ในตัวอย่างที่ทำการศึกษา กำหนดให้ลูกศรสีดำแสดงตัวอย่างที่พบ recombination ในส่วน coding sequence ส่วนต่างๆ โดย CU211-Sep06 พบ recombination ในส่วน VP2 และ VP3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

นับตั้งแต่มีการแยกวิเคราะห์เชื้อ HRV ได้ครั้งแรกในปี 1953 จากตัวอย่างน้ำล้างจมูกของผู้ป่วยโรคไข้หวัดนั้น เชื้อ HRV ได้ถูกค้นพบอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มการระบาดของเชื้อไวรัสเพิ่มสูงขึ้นในทุกปี เชื้อ HRV มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์ค่อนข้างมาก สามารถจัดจำแนกไวรัสที่ค้นพบด้วยวิธีทาง serology ได้กว่า 100 serotype โดยจัดจำแนกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ HRV-A และ HRV-B จนกระทั่งในปี 2007 ได้มีรายงานการค้นพบเชื้อ HRV-C ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ พบในผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ซึ่งตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคด้วยวิธี MassTag PCR^[10] และในทารกซึ่งป่วยด้วยโรคหอดลมอักเสบ^[12] โดยข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้ แสดงความแตกต่างจากสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด ทั้งข้อมูลของสารพันธุกรรมและผลจากการวิเคราะห์ทาง phylogenetic analysis แต่อย่างไรก็ตามนับตั้งแต่ค้นพบเชื้อ HRV-C จนถึงปัจจุบัน นักวิจัยยังไม่สามารถเพาะเลี้ยง เชื้อไวรัส ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อใดๆ ได้ทำให้ข้อมูลต่างๆ รวมทั้งบทบาทของไวรัสต่อการก่อโรคยังมีอยู่อย่างจำกัด

ผลจากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HRV ในประชากรไทยในปี 2006-2007 ด้วยวิธี semi-nested PCR พบว่ามีค่าความชุกของเชื้อ HRV เท่ากับ 30% สูงกว่าค่าความชุกของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ และมีค่าสูงกว่าของเชื้อ RSV (16%) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่ตรวจพบได้ทั่วไป และทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่มี อาการรุนแรง ผลจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HRV ด้วยการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนควบคุมการสร้างโปรตีน capsid VP4 และกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสได้จากยีนส่วนนี้ พบว่า HRV-C เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าความชุกของเชื้อสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 58% ในขณะที่ HRV-A และ HRV-B มีค่าเท่ากับ 33% และ 9% ตามลำดับ และพบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสซึ่งได้จากการถอดรหัส สารพันธุกรรมในงาน ศึกษาวิจัยนี้ มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ คล้ายกับ HRV strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ผลการวิเคราะห์ค่า %identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ในสายพันธุ์ HRV-C นั้น มีค่าตั้งแต่ 63%-99% แสดงให้เห็นว่าถึงความหลากหลายภายในสายพันธุ์ของไวรัส อัตราระบาดของไวรัสที่พบในกลุ่มประชากรไทยนี้ มีค่าแตกต่างไปจากผลการศึกษาของประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งโดยทั่วไป

มักพบว่า HRV-A เป็นสายพันธุ์หลักที่ระบาดในกลุ่มประชากร หรือมีอัตราส่วนของ HRV-A และ HRV-C ใกล้เคียงกัน ลักษณะการระบาดของเชื้อ HRV-C และ HRV-A พบได้เกือบทั้งปี แต่มีความชุกมากในฤดูฝน (เดือนพฤษภาคม -ตุลาคม) และช่วงต้นฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน -มกราคม) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลสามารถสรุปได้ว่า HRV-C เป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดมากในประเทศไทยในช่วงปี 2006-2007 และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ strain อื่น ซึ่งพบการระบาดในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก ลักษณะการระบาดของเชื้อ HRV มีความสัมพันธ์กับฤดูกาลคล้ายกับเชื้อ Influenza virus แต่มีรูปแบบแตกต่างกันไป โดยในไวรัส HRV นั้น ไม่พบการระบาดที่มีเป็นลักษณะของลูกคลื่น (wave) หรือการระบาดในวงกว้าง (outbreak) ของสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง หรือ serotype ได้อย่างมีนัยสำคัญ แตกต่างจากเชื้อ Influenza virus

ถึงแม้ว่า HRV-C จะมีรายงานการค้นพบครั้งแรกในปี 2007 แต่เมื่อพิจารณาจากช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาของงานวิจัยอื่นๆ ประกอบกับผลการทำ phylogenetic analysis พบว่าจากการศึกษา HRV-C น่าจะพบการระบาดมาตั้งแต่ก่อนปี 2007 โดยผลจากการศึกษาของ Arden และคณะ^[64] ได้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี 1998-1999 ในประเทศเบลเยียมและปี 2001-2002 ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งข้อมูลนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน VP4/ VP2 ที่ค้นพบนั้น ได้ถูกจำแนกเป็น HRV-A กลุ่มย่อยหรือ HRV-A2 เนื่องจากมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ HRV-A มากกว่า HRV-B แสดงให้เห็นว่า HRV-C นั้นไม่ใช่เชื้อไวรัสอุบัติใหม่ (*de novo*) และมีการระบาดมาเป็นระยะเวลาหนึ่ง แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ รวมทั้งบริเวณที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อทำ phylogenetic analysis นั้นมีผลต่อการจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหาก ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5'UTR ในการจัดจำแนก จะไม่สามารถแยก HRV-C บาง strain ออกจาก HRV-A ได้อย่างชัดเจน^[55] เนื่องจากในบริเวณนี้มีลักษณะอนุรักษ์ร่วมระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ HRV ซึ่ง HRV-C มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันกับ HRV-A ค่อนข้างมาก

ในการศึกษาระบาดวิทยาและความสัมพันธ์ของเชื้อ HRV ต่อการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามี แนวโน้ม การตรวจพบการติดเชื้อ HRV-C ได้มากในผู้ป่วยเด็กเล็ก โดยเฉพาะกลุ่มที่มีอายุระหว่าง 6-59 เดือน มากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ อาการที่พบโดยทั่วไปคือ ภาวะหลอดลมตีบและหอบหืด สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Miller และคณะ^[52] ซึ่งเลือกศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีที่มีการติดเชื้อใน

ระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเช่นกัน จึงสามารถสรุปได้ ว่าโอกาสในการติดเชื้อ HRV-C ในผู้ป่วย ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดโรคทางเดินหายใจที่มีอาการรุนแรงมากขึ้นหรือการพัฒนาเป็นโรคเรื้อรังนั้น มีความสัมพันธ์กับช่วงอายุของผู้ป่วย มากกว่า HRV สายพันธุ์อื่น แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ อัตราส่วนของผู้ป่วย ในแต่ละช่วงวัยและสายพันธุ์ ของเชื้อ HRV ที่ตรวจพบนั้นจะมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่ก็ไม่ได้แสดง ค่าความสำคัญทางนัยสถิติ ดังนั้นเพื่อ ให้การทำนายแนวโน้ม ความสัมพันธ์ของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์ต่อการก่อโรคทางเดินหายใจเรื้อรังมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น อาจจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้กลุ่มตัวอย่างจำนวนมากขึ้น และอาจเพิ่มกลุ่ม ประชากรศึกษา ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ HRV แต่แสดงอาการไม่รุนแรง เช่น เป็นโรค ใช้หวัดธรรมดา หรือกลุ่มคนสุขภาพปกติ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการเปรียบเทียบความรุนแรง ของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ HRV

ในการศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของเชื้อ HRV นั้น Palmenberg และคณะ^[65] ได้ทำการ วิเคราะห์ข้อมูลสารพันธุกรรมของเชื้อ HRV ทั้ง 100 serotype และ HRV-C พบว่า HRV ทุกสาย พันธุ์มีค่าเฉลี่ยของนิวคลีโอไทด์ส่วนประกอบในจีโนมไม่แตกต่างกัน ลักษณะ จีโนมซึ่งเป็น RNA สายเดี่ยวขั้ววงนั้น ประกอบด้วยเบส adenine (A) เป็นหลัก คิดเป็น 31-34% ขององค์ประกอบ ทั้งหมด และมี uridine (U) เฉลี่ย 25-30% ในขณะที่เบส guanine (G) และ cytosine (C) มี ค่าเฉลี่ยต่ำกว่า โดยมีค่าระหว่าง 19-22% และ 18-22% ตามลำดับ และพบว่านิว คลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 3 ใน codon เป็นตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ผลจากการจัดจำแนกสาย พันธุ์ของเชื้อ HRV ทั้ง 6 strain ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่า CU107 และ CU150 ถูกจัดเป็นสมาชิกของสายพันธุ์ A, CU003 และ CU211 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์ B และ CU072 และ CU184 จัดเป็นสมาชิกของสายพันธุ์ C โดยผลที่ได้จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสร้าง capsid VP4 นั้นให้ผลที่สอดคล้องกับการ จัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยข้อมูลของ coding sequence จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ข้อมูลของ โปรตีน capsid ในการตรวจหาการติดเชื้อและการจำแนกสายพันธุ์ของ HRV นั้น ให้ข้อมูลที่ ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic analysis ของส่วน coding sequence ยังแสดงให้เห็นการจัดกลุ่มย่อยภายในสายพันธุ์ HRV-A ซึ่งแสดงตำแหน่งบน phylogenetic tree แยกออกจาก serotype อื่นๆ อย่างชัดเจน โดยทั้ง 3 serotype นี้ (8, 45 และ 95) ถูกเสนอให้เป็นกลุ่มใหม่ คือ HRV clade D

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HEV และ HRV โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัส Tapparel และคณะ^[66] ได้สรุปว่าเชื้อ HRV-B มีบรรพบุรุษร่วมกับเชื้อ HEV เนื่องจากพบโครงสร้าง *cre* ในส่วนยีน 2C คล้ายกับใน HEV ซึ่งไม่พบโครงสร้างนี้ใน HRV-A โดยโครงสร้าง *cre* นั้นมีลักษณะเป็น hairpin loop ประกอบด้วย motif $R_1NNNAAR_2NNNNNR_3$ (R= เบส purine, A= adenine, N = nucleotide triphosphate) โดยเบส A ทั้ง 2 ตำแหน่งที่พบใน motif เป็นบริเวณสำคัญที่ทำหน้าที่เสมือนเป็น template สำหรับกระบวนการ VPg uridylylation โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ polymerase และโปรตีน VPg ที่ได้จะทำหน้าที่เป็นโปรตีนไพรมอร์สำหรับกระบวนการจำลองสาย RNA สายบวกต่อไป ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นว่า HRV-B มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ HEV มากกว่า HRV-A และเชื้อ HRV จึงไม่จัดเป็นเชื้อที่มีลักษณะเป็น monophyletic นอกจากนี้ส่วนของยีนควบคุมการสร้างโปรตีน capsid ของเชื้อ HRV-B นั้น มีวิวัฒนาการมาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะในส่วนยีน capsid VP1 จากเชื้อ HRV-A ทำให้ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ HRV-B เช่น บริเวณเนื้อเยื่อจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อไวรัส (tissue tropism) และความสามารถในการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ มีความคล้ายคลึงกับ HRV-A มากกว่า HEV และถ้าหากจัดจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสโดยใช้การทำ phylogenetic analysis, การทดสอบทาง serology หรือแม้แต่การวิเคราะห์การตอบสนองต่อยาต้านไวรัสนั้นๆ ล้วนแต่อาศัยข้อมูลส่วน capsid ของไวรัสเป็นเกณฑ์ จึงทำให้ HRV-B ถูกจำแนกอยู่ในกลุ่มเดียวกับ HRV-A แทน HEV ซึ่งทั้งหมดเป็นสมาชิกใน genus *Enterovirus* ร่วมกัน

ผลจากการวิเคราะห์ค่า %GC content ของ HRV แต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกัน พบว่าเชื้อ HRV-B มีค่าเฉลี่ยต่ำที่สุด แต่ยังคงใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของ HRV-A ในขณะที่ HRV-C มีค่าเฉลี่ย %GC content แตกต่างไปจากสายพันธุ์อื่นมาก ค่าเฉลี่ย %GC content ที่ใกล้เคียงกันของ HRV-A และ HRV-B นั้น ส่งผลให้ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ HRV ทั้ง 2 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกันมากกว่าเชื้อ HRV-C จากรายงานการศึกษาของ Tapparel และคณะ^[66] ระบุว่าค่าเฉลี่ย %GC content มีความสัมพันธ์กับบริเวณและสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไวรัส การที่เชื้อ HRV-A และ HRV-B ที่มีค่าเฉลี่ย %GC content ต่ำ ทำให้เชื้อ สามารถเจริญได้ดีในทางเดินหายใจส่วนบน ซึ่งมีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำกว่าในทางเดินหายใจส่วนล่าง (~33°C) แตกต่างกับเชื้อ HEV ซึ่งมีค่า %GC content สูงกว่ามาก ทำให้เชื้อ HEV สามารถปรับตัวเพื่อเจริญใน

สภาวะอื่นๆ ในร่างกายได้ดีกว่า จึงพบว่าเชื้อ HEV สามารถทนต่อสภาพเป็นกรดสูงได้และแพร่กระจายไปยังระบบต่างๆ ของร่างกายได้มากกว่า เชื้อ HRV ทั้งในระบบทางเดินหายใจ, ทางเดินอาหารและระบบประสาท สำหรับเชื้อ HRV-C นั้น ในปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์ได้จึงทำให้ข้อมูลทางกายภาพของเชื้อสายพันธุ์นี้มีอยู่อย่างจำกัด และแสดงให้เห็นว่าเชื้อ HRV-C อาจมีลักษณะจำเพาะบางประการที่แตกต่างไปจาก HRV-A และ HRV-B อีกทั้งผลจากการพิจารณาค่า %GC content ของเชื้อ HRV-C พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ HEV มากกว่า สอดคล้องกับแนวโน้มที่พบว่าเชื้อ HRV-C พบการระบาดมากในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (~37°C) และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคหอบหืดมากกว่า HRV สายพันธุ์อื่น

จากผลการวิเคราะห์โปรตีน capsid VP1 ของ HRV ทั้ง 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกัน พบว่าไวรัสต่างสายพันธุ์ที่ใช้ ICAM-1 เป็น receptor นั้นมีความหลากหลายในระดับกรดอะมิโนต่ำกว่าพวกที่ใช้ LDL-R โดยทั่วไปจะมีกรดอะมิโนเป็นลักษณะ hydrophilic negative charge และนอกจากนี้ไวรัสที่ใช้ LDL-R เป็น receptor นั้นพบ deletion ของโปรตีน VP1 ในหลายบริเวณสำคัญแตกต่าง จากไวรัสกลุ่มหลัก จึงสันนิษฐานว่าบริเวณเหล่านี้ น่าจะมีส่วนต่อการกำหนด receptor specificity ของไวรัส HRV ได้ และความจำเพาะของสายพันธุ์ไวรัสต่อชนิดของ receptor ที่เลือกใช้นั้น พบเฉพาะใน HRV-A minor เท่านั้น โปรตีน VP1 ของสายพันธุ์ HRV-C มีลักษณะที่แตกต่างจากอีก 2 สายพันธุ์อย่างเห็นได้ชัด คือ เกิด deletion ในบริเวณ BC loop และ DE loop บทบาทสำคัญของ loop ทั้ง 2 ส่วนจากผลการศึกษา X-ray crystallography พบว่าเป็นส่วนหนึ่งของ antigenic epitope ของไวรัส การพบ deletion ในบริเวณ antigenic epitope บนอนุภาคไวรัส นั้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง antigenicity หรือคุณสมบัติในการเกิด neutralization กับ Ab และสันนิษฐานว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงนี้ น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดเป็น HRV-C สายพันธุ์ใหม่ภายใต้การควบคุมที่เรียกว่า serological selection^[11]

ในการทำนายการตอบสนองต่อยาด้านไวรัส ของเชื้อ HRV สายพันธุ์ใหม่ โดยอ้างอิงจากการพิจารณาลำดับของกรดอะมิโนบนโปรตีน capsid VP1 ในตำแหน่ง 152 และ 191 ซึ่งสำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของยา pleconaril พบว่าใน HRV-C เกิด amino acid substitution ในตำแหน่งที่ 152 เป็น F เหมือนกับ resistant strain ในขณะที่ตำแหน่ง 191 มีกรดอะมิโนเป็น T ซึ่งมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ส่งผลต่อการตอบสนองต่อยาด้านไวรัสได้ จึงทำนายได้ว่า HRV-C น่าจะต้านทานต่อยา pleconaril คล้ายกับ HRV-B บาง serotype

จากรายงานการศึกษาแนวโน้มการเกิด recombination ต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไวรัสโดย Lukashev และคณะ^[67] ระบุว่าเชื้อ HEV อาศัยกลไกนี้เป็นหลักเพื่อการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ผลการศึกษาใน HEV และ HRV ของ Tapparel และคณะ^[6] ระบุว่าโอกาสในการเกิด recombination มักพบในส่วน nonstructural gene หรือบริเวณรอยต่อระหว่าง 5' UTR กับส่วน structural gene มากกว่าที่จะพบใน structural gene จึงสรุปว่าบริเวณสำคัญต่อการเกิด recombination ถูกจำกัดเฉพาะในบางบริเวณของจีโนม และยังไม่มียางานการค้นพบ recombination ในส่วน structural gene แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโอกาสในการเกิด recombination ของเชื้อ HRV ไม่ได้ถูกจำกัดเฉพาะในบริเวณดังกล่าวเท่านั้น เนื่องจาก CU211 ซึ่งจัดอยู่ในสายพันธุ์ HRV-B พบว่ามี recombination ระหว่าง major parental strain คือ HRV-35 และ minor parental strain คือ HRV-69 โดยมี breakpoint อยู่ในส่วนปลาย C ของโปรตีน capsid VP2 และ VP3 ผลที่ได้จากการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่าการเกิด recombination นี้เป็นกลไกสำคัญต่อวิวัฒนาการของเชื้อ HRV เช่นเดียวกับ HEV ซึ่งโอกาสในการเกิด recombination สามารถพบได้ในทุกบริเวณของจีโนม

จากผลการวิเคราะห์พิจารณาความคล้ายคลึงของข้อมูลทางพันธุกรรมของ CU072 strain เปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูลและพบว่ามีค่า %identity ต่ำกว่า 70% โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ N4 มากที่สุดนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำนายว่า CU072 คือ strain ใหม่ของสายพันธุ์ HRV-C และผลจากการวิเคราะห์โปรตีนส่วนต่างๆ ของ CU072 เทียบกับ N4 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของทั้ง 2 strain เปรียบเทียบกันนั้น พบว่าบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนแบบ nonsynonymous มากที่สุดอยู่ในส่วนของโปรตีน capsid VP2 ในขณะที่โปรตีน capsid VP3 และ VP4 ก็มีค่าของ %NS อยู่ในระดับปานกลาง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของความหลากหลายแบบ NS ของส่วน structural gene มีค่าสูงกว่า non-structural gene และจากการพิจารณาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ NS นั้น มักไม่พบในตำแหน่งที่สำคัญต่อการกำหนดหน้าที่ของโปรตีน เช่น motif ต่างๆ หรือ receptor binding site แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ไวรัสจะอาศัยการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งเพื่อวิวัฒนาการของไวรัส แต่จะยังคงรักษาลักษณะอนุรักษ์บางประการที่สำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ของไวรัสเอาไว้

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบระบาดวิทยาของเชื้อ HRV โดยเฉพาะเชื้อ HRV-C ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีแนวโน้มการระบาดเพิ่มสูงขึ้นทุกปี พบการระบาดมากในช่วง

ฤดูฝนและต้นฤดูหนาว การติดเชื้อไวรัส HRV ในเด็กเล็กอาจส่งผลให้เกิดอาการที่รุนแรงมากขึ้น และอาจมีความเกี่ยวข้องกับ การพัฒนาของโรค หอบหืด ซึ่งเป็นโรคที่แสดงอาการเรื้อรัง ในระบบทางเดินหายใจ อีกทั้งเชื้อ HRV-C มีแนวโน้มที่จะต้านทานต่อยาต้านไวรัส pleconaril ซึ่งเป็นยาที่ใช้เพื่อการรักษาอาการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส HRV อาจยึดกลไกการเกิด recombination เพื่อการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสไม่แตกต่างจากเชื้อ HEV หรือเชื้อชนิดอื่นๆ ในตระกูล *Picornaviridae* ข้อมูลที่ได้นี้จะทำให้เกิดประโยชน์ในการวางแผนป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัส HRV รวมทั้งการวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เชิงโมเลกุลของเชื้อ HRV แต่ละสายพันธุ์เทียบกันนั้น จะถูกใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาทางด้านไวรัสวิทยาและใช้เพื่อการออกแบบยาต้านไวรัสชนิดนี้ต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Jartti, T., et al. Respiratory Picornaviruses and Respiratory Syncytial Virus as Causative Agents of Acute Expiratory Wheezing in Children. Emerg Infect Dis 10 (June 2004): 1095-1101.
- [2] Samransamruajkit, R., et al. Prevalence, Clinical Presentations and Complications among Hospitalized Children with Influenza Pneumonia. J infect Dis 61 (November 2008): 446-449.
- [3] Samransamruajkit, R., Thanasugarn, W., Prapphala, N., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. Human metapneumovirus in infants and young children in Thailand with lower respiratory tract infections; molecular characteristics and clinical presentations. J Infect 52 (April 2006): 254-263.
- [4] Puzelli, S., et al. Viral causes of influenza-like illness: Insight from a study during the winters 2004-2007. J Med Virol 81 (December 2009): 2066-2071.
- [5] Kistler, A., et al. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. J Infect Dis 196 (September 2007): 817-825.
- [6] Tapparel, C., et al. New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. Emerg Infect Dis 15 (May 2009): 719-726.
- [7] Hayden, FG., et al. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. Clin Infect Dis 36 (June 2003): 1523-1532.
- [8] Daniel, CP., Frederick, GH., Tina, MD., Linda, RB., Mark, AM., and Marc, SC. Relationship of Pleconaril Susceptibility and Clinical Outcomes in Treatment of Common Colds Caused by Rhinoviruses. Antimicrobial agents and Chemotherapy 49 (November 2005): 4492-4499.

- [9] Ledford, RM., Collett, MS., and Pevear, DC. Insights into the genetic basis for natural phenotypic resistance of human rhinoviruses to pleconaril. Antiviral Res 68 (December 2005): 135–138.
- [10] Lamson, D., et al. MassTag polymerase-chain reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. J Infect Dis 194 (November 2006): 1398-1402.
- [11] Susanna, KPL., et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (hrv) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. J Clin Microbiol 45 (November 2007): 3655-3664.
- [12] McErlean, P., Shackleton, LA., Lambert, SB., Nissen, MD., Sloots, TP., and Mackay IM. Characterisation of a newly identified human rhinovirus,HRV-QPM discovered in infants with bronchiolitis. J Clin Virol 39 (June 2007): 67-75.
- [13] Brownlee, JW., and Turner, RB. New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections. Curr Opin Pediatr 20 (February 2008): 67-71.
- [14] Pitkäranta, A., Arruda, E., Malmberg, H., and Hayden, FG. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 35 (July 1997): 1791-1793.
- [15] Chantzi, FM., et al. Human rhinoviruses in otitis media with effusion. Pediatr Allergy Immunol 17 (November 2006): 514-518.
- [16] Imakita, M., Shiraki, K., Yutani, C., and Ishibashi-Ueda, H. Pneumonia caused by rhinovirus. Clin Infect Dis 30 (March 2000): 611-612.
- [17] Jartti, T., et al. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. Emerg Infect Dis 10 (June 2004): 1095-1101.
- [18] Lemanske, RF., et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. J Allergy Clin Immunol 116 (September 2005): 571-577.

- [19] Leigh, R., et al. Human rhinovirus infection enhances airway epithelial cell production of growth factors involved in airway remodeling. J Allergy Clin Immunol 121 (May 2008): 1238-1245.
- [20] Miller, EK., et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. J of Infect Dis 195 (March 2007): 773-781.
- [21] Papadopoulos, NG., Papi, A., Psarras, S., and Johnston, SL. Mechanisms of rhinovirus-induced asthma. Paediatr Respir Rev 5 (September 2004): 255-260.
- [22] Mackay, IM. Human rhinoviruses: The cold wars resume. J of Clin Virol 42 (August 2008): 297-320.
- [23] Jackson, RJ., and Kaminski, A. Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. RNA 1 (December 1995): 985-1000.
- [24] Dorsch-Hasler, K., Yogo, Y., and Wimmer, E. Replication of picornaviruses. I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly(A) of the poliovirus genome is genetically coded. J. Virol. 16 (December 1975): 1512-1517.
- [25] Ooij, M., et al. Polyadenylation of genomic RNA and initiation of antigenomic RNA in a positive-strand RNA virus are controlled by the same cis-element. Nucleic Acids Research 34 (May 2006): 2953-2965.
- [26] Smith, TJ. Antibody interactions with Rhinovirus. In: E. Wimmer (ed.), Molecular biology of picornaviruses, pp 39-49 Washington (DC) : ASM Press, 2002.
- [27] Vlasak, M., et al. The minor receptor group of human rhinovirus (HRV) includes HRV23 and HRV25, but the presence of a lysine in the VP1 HI Loop Is Not Sufficient for Receptor Binding. J Virol 79 (June 2005): 7389-7395.
- [28] Hayden, FG., Andries, K., and Janssen, P. Safety and Efficacy of Intranasal Pirodavir (R77975) in Experimental Rhinovirus Infection. Antimicrob Agents Chemother 36 (April 1992): 727-732.
- [29] Wang, L., and Smith, D. Capsid structure and dynamics of a human rhinovirus probed by hydrogen exchange mass spectrometry. Protein Science 14 (June 2005): 1661-1672.

- [30] Lewis-Rogers, N., Bendall, ML., and Crandall, KA. Phylogenetic Relationships and Molecular Adaptation Dynamics of Human Rhinoviruses. Mol Biol Evol 26 (May 2009): 969-981.
- [31] Spector, DH., and Baltimore, D. Polyadenylic acid on poliovirus RNA IV. Poly(U) in replicative intermediate and double-stranded RNA. Virology 67 (October 1975): 498-505.
- [32] Carter, JB., and Saunders, VA. Chapter 14: Picornavirus (and other plus-strand RNA viruses). In Virology: Principles and applications, pp.157-172. England : John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- [33] Mosser, AG., et al. Similar Frequency of Rhinovirus-Infectible Cells in Upper and Lower Airway Epithelium. J Infect Dis 185 (March 2002): 734-743.
- [34] Xing, L., Casasnovas, JM., and Cheng, RH. Structural Analysis of Human Rhinovirus Complexed with ICAM-1 Reveals the Dynamics of Receptor-Mediated Virus Uncoating. J Virol 77 (June 2003): 6101-6107.
- [35] Kolatkar, PR., Bella, J., Olson, NH., Bator, CM., and Baker, TS., Rossmann MG. Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. EMBO J 18 (November 1999): 6249-6259.
- [36] Hewat, EA., et al. The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around the 5-fold axis and not in the canyon: a structural view. The EMBO J 19 (December 2000): 6317-6325.
- [37] Kelly, JT., and Busse, WW. Host immune responses to rhinovirus: Mechanisms in asthma. J Allergy Clin Immunol 122 (October 2008): 671-682.
- [38] Soile Blomqvist. Epidemiology of human rhinoviruses. Doctoral dissertation, Department of Biological Environmental Sciences Faculty of Biosciences University of Helsinki, 2004.
- [39] Ma, JD., Nafziger, AN., Rhodes, G., Liu, S., Gartung, AM., and Bertino, JS. The effect of oral pleconaril on hepatic cytochrome P450 3A activity in healthy adults

- using intravenous midazolam as a probe. J Clin Pharmacol 46 (January 2006): 103-108.
- [40] De Palma, AM., Vliegen, I., De Clercq, E., and Neyts, J. Selective inhibitors of picornavirus replication. Med Res Rev 28 (November 2008): 823-884.
- [41] Rotbart, HA. Treatment of picornavirus infections. Antiviral Res 53 (February 2002): 83-98.
- [42] Hayden, FG., and Gwaltney, JM. Intranasal interferon- α treatment of experimental rhinoviral colds. J Infect Dis 150 (August 1984): 174-180.
- [43] Couch, RB. The common cold: control? J Infect Dis 150 (August 1984): 167-173.
- [44] Patick, AK. Rhinovirus chemotherapy. Antiviral Res 71 (September 2006): 391-396.
- [45] Rollinger, J., Schmidtke, M. The human rhinovirus: human-pathological impact, mechanisms of antirhinoviral agents, and strategies for their discovery. Med Res Rev 27 (August 2009): 1-7.
- [46] Patick, AK., et al. In vitro antiviral activity and single-dose pharmacokinetics in humans of a novel, orally bioavailable inhibitor of human rhinovirus 3C protease. Antimicrob Agents Chemother 49 (June 2005): 2267-2275.
- [47] Turner, RB., et al. Efficacy of Tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection. JAMA 281 (May 1999):1797-1804.
- [48] Pevear, DC., Tull, TM., Seipel, ME., and Groarke, JM. Activity of pleconaril against enteroviruses. Antimicrob Agents Chemother 43 (September 1999): 2109-2125.
- [49] Schmidtke, M., et al. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. Virology 275 (September 2000): 77-88.
- [50] Schmidtke, M., et al. Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment. Antimicrob Chemother 56 (October 2005): 648-656.

- [51] Khetsuriani, N., Lu, X., Teague, WG., Kazerouni, N., Anderson, LJ., and Erdman, DD. Novel Human Rhinoviruses and Exacerbation of Asthma in Children. Emerg Infect Dis 14 (November 2008): 1793-1796.
- [52] Miller, EK., et al. A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. J Allergy Clin Immunol 123 (January 2009): 98-104.
- [53] Chieochansin, T., et al. Human bocavirus (HBoV) in Thailand: Clinical manifestations in a hospitalized pediatric patient and molecular virus characterization. J Infect 56 (February 2008): 137-142.
- [54] Bellau-Pujol, S., et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. J Virol Methods 126 (June 2005): 53-63.
- [55] Savolainen-Kopra, C., Blomqvist, S., Smura, T., Roivainen, M., and Hovi, T. 5' Noncoding Region Alone Does Not Unequivocally Determine Genetic Type of Human Rhinovirus Strains. J Clin Micro 47 (April 2009): 1278-1280.
- [56] McErlean, P., et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). PLoS ONE 3 (April 2008): e1847.
- [57] Thompson, JD., Gibson, TJ., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25 (December 1997): 4876-4882.
- [58] Arnold, E. and Rossmann, MG. The use of molecular replacement phases for the refinement of the human rhinovirus 14 structure. Acta Crystallogr A 44 (May 1988): 270-282.
- [59] Hadfield AT, et al. The refined structure of human rhinovirus 16 at 2.15 Å resolution: implications for the viral life cycle. Structure 5 (March 1997): 427-441.
- [60] Kolatkar, PR., Bella, J., Olson, NH., Bator, CM., Baker, TS., and Rossmann, MG. Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. EMBO J 18 (November 1999): 6249-6259.

- [61] Vlasak, M., Blomqvist, S., Hovi, T., Hewat, E., and Blaas, D. Sequence and structure of human rhinoviruses reveal the basis of receptor discrimination. *J Virol* 77 (June 2003): 6923-6930.
- [62] Ledford, RM., et al. VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: Insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds. *J Virol* 78 (April 2004): 3663–3674.
- [63] Rathe, JA., Liu, X., Tallon, LJ., Gern, JE., and Liggett, SB. Full-genome sequence and analysis of a novel human rhinovirus strain within a divergent HRV-A clade. *Arch Virol* 155 (February 2010): 83-87.
- [64] Arden, KE., McErlean, P., Nissen, MD., Sloots, TP., and Mackay, IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol* 78 (September 2006): 1232-1240.
- [65] Palmenberg, AC., et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveals structure and evolution. *Science* 324 (April 2009): 55-59.
- [66] Tapparel, C., et al. New complete genome sequences of human rhinoviruses shed light on their phylogeny and genomic features. *BMC Genomics* 8 (July 2007): 224.
- [67] Lukashev, AN. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol* 15 (May 2005):157-167.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base	54	g
Boric acid	27.5	g
EDTA (pH 8.0)	20	ml

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	g
1 x TBE	200	ml

เขย่าแล้วนำเข้าไปไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	μl
น้ำกลั่น	300	ml

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue	
40% (w/v) sucrose in water	

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4.0 °C

5. DEPC water

DEPC	0.1	ml
น้ำกลั่น	100	ml

เขย่าแล้วนำไป incubate ที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง แล้ว นำไป autoclave

6. LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plate

Agar	1.5	g
Tryptone	1.0	g
Yeast Extract	0.5	g
NaCl	0.5	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch², 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิ ลดลง จากนั้นเติม ampicillin 100 mg/ml 100 μ l เทใส่ plate ละ 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จน media แข็ง เติม IPTG 250 mg/ml 4 μ l และ X-Gal 50 mg/ml 15 μ l กระจายให้ทั่ว plate จนแห้ง

7. LB broth/ampicillin

Tryptone	1.0	g
Yeast Extract	0.5	g
NaCl	0.5	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch², 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น จากนั้นเติม ampicillin 100 mg/ml 100 μ l

8. Soc medium

Tryptone	2.0	g
Yeast Extract	0.5	g
1 M NaCl	1.0	g
1 M KCl	0.25	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch², 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็น จากนั้นเติมสารละลาย 2M Mg²⁺ 1 ml และ 2M glucose 1 ml

ภาคผนวก ข

รหัสของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank Accession Number)

species	serotype	strain name	accession no.	receptor	pleconaril susceptibility	protein length
HRV-A	HRV-1	20601-Ohio	AF343633	LDL-R	2	2157
HRV-A	HRV-2	HGP	X02316	LDL-R	2	2150
HRV-A	HRV-7	68-CV11	DQ473503	ICAM-1	2	2162
HRV-A	HRV-8	ATCC	FJ445113	ICAM-1	2	2154
HRV-A	HRV-9	211-CV13	AF343605	ICAM-1	2	2157
HRV-A	HRV-10	204-CV14	DQ473498	ICAM-1	2	2160
HRV-A	HRV-11	1-CV15	EF173414	ICAM-1	2	2153
HRV-A	HRV-12	181-CV16	EF173415	ICAM-1	2	2155
HRV-A	HRV-13	ATCC	FJ445117	ICAM-1	1	2160
HRV-A	HRV-15	1734- South Carolina/60	DQ473493	ICAM-1	2	2159
HRV-A	HRV-16	11757- Washington DC/60	L24917	ICAM-1	2	2153
HRV-A	HRV-18	ATCC	FJ445118	ICAM-1	2	2153
HRV-A	HRV-19	ATCC	FJ445119	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-20	ATCC	FJ445120	ICAM-1	2	2166
HRV-A	HRV-21	ATCC	FJ445121	ICAM-1	2	2157
HRV-A	HRV-22	ATCC	FJ445122	ICAM-1	2	2156
HRV-A	HRV-23	5124-CV24	DQ473497	ICAM-1	2	2149
HRV-A	HRV-24	5146-CV25	EF173416	ICAM-1	2	2154
HRV-A	HRV-25	ATCC	FJ445123	ICAM-1	2	2155
HRV-A	HRV-28	6101-CV29	DQ473508	ICAM-1	2	2161
HRV-A	HRV-29	ATCC	FJ445125	LDL-R	2	2154
HRV-A	HRV-30	106F	DQ473512	LDL-R	2	2149

HRV-A	HRV-31	ATCC	FJ445126	LDL-R	2	2157
HRV-A	HRV-32	ATCC	FJ445127	ICAM-1	1	2158
HRV-A	HRV-33	ATCC	FJ445128	ICAM	2	2155
HRV-A	HRV-34	ATCC	FJ445189	ICAM	2	2153
HRV-A	HRV-36	342H	DQ473505	ICAM	2	2161
HRV-A	HRV-38	ATCC	FJ445180	ICAM	2	2159
HRV-A	HRV-39	209-Maryland/62	AY751783	ICAM	2	2157
HRV-A	HRV-40	ATCC	FJ445129	ICAM-1	2	2159
HRV-A	HRV-41	56110- North Carolina/61	DQ473491	ICAM-1	2	2161
HRV-A	HRV-43	ATCC	FJ445131	ICAM-1	1	2158
HRV-A	HRV-44	71560- North Carolina/61	DQ473499	LDL-R	2	2154
HRV-A	HRV-45	ATCC	FJ445132	ICAM-1	2	2152
HRV-A	HRV-46	Crell – Baylor2-Texas/64	DQ473506	ICAM-1	2	2164
HRV-A	HRV-47	ATCC	FJ445133	LDL-R	2	2157
HRV-A	HRV-49	8213	DQ473496	LDL-R	2	2150
HRV-A	HRV-50	ATCC	FJ445135	ICAM-1	2	2153
HRV-A	HRV-51	ATCC	FJ445136	ICAM-1	2	2165
HRV-A	HRV-53	F01-3928	DQ473507	ICAM-1	2	2162
HRV-A	HRV-54	ATCC	FJ445138	ICAM-1	1	2158
HRV-A	HRV-55	Wis315EWisconsin-64	DQ473511	ICAM-1	2	2155
HRV-A	HRV-56	ATCC	FJ445140	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-57	fs ship#1	FJ445141	ICAM-1	2	2157
HRV-A	HRV-58	ATCC	FJ445142	ICAM-1	2	2160
HRV-A	HRV-59	611-CV35	DQ473500	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-60	ATCC	FJ445143	LDL-R	2	2159
HRV-A	HRV-61	ATCC	FJ445144	ICAM-1	2	2160
HRV-A	HRV-62	ATCC	FJ445145	LDL-R	2	2156
HRV-A	HRV-63	ATCC	FJ445146	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-64	6258-CV44	EF173417	ICAM-1	2	2156

HRV-A	HRV-65	ATCC	FJ445147	ICAM-1	2	2165
HRV-A	HRV-66	ATCC	FJ445148	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-67	ATCC	FJ445149	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-68	ATCC	FJ445150	ICAM-1	2	2166
HRV-A	HRV-71	ATCC	FJ445152	ICAM-1	2	2164
HRV-A	HRV-73	107E	DQ473492	ICAM-1	2	2160
HRV-A	HRV-74	328A	DQ473494	ICAM-1	2	2156
HRV-A	HRV-75	328F	DQ473510	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-76	H00062	DQ473502	ICAM-1	2	2155
HRV-A	HRV-77	ATCC	FJ445182	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-78	2030-65	EF173418	ICAM-1	2	2159
HRV-A	HRV-80	ATCC	FJ445156	ICAM-1	2	2160
HRV-A	HRV-81	ATCC	FJ445157	ICAM-1	1	2153
HRV-A	HRV-82	ATCC	FJ445160	ICAM-1	2	2155
HRV-A	HRV-85	50-525-CV54	AF343642	ICAM-1	2	2159
HRV-A	HRV-88	CVD 01-0165- Dambrauskas	DQ473504	ICAM-1	2	2160
HRV-A	HRV-89	ATCC	FJ445184	ICAM-1	2	2164
HRV-A	HRV-90	ATCC	FJ445167	ICAM-1	2	2153
HRV-A	HRV-94	SF-1803	EF173419	ICAM-1	2	2156
HRV-A	HRV-95	ATCC	FJ445170	ICAM-1	2	2154
HRV-A	HRV-96	ATCC	FJ445171	ICAM-1	2	2157
HRV-A	HRV-98	ATCC	FJ445173	ICAM-1	2	2158
HRV-A	HRV-100	ATCC	FJ445175	ICAM-1	2	2160
HRV-C	-	QPM	EF186077	ICAM	-	2143
HRV-C	-	NAT001	EF077279	ICAM	-	2142
HRV-C	-	C024	EF582385	ICAM	-	2144
HRV-C	-	C025	EF582386	ICAM	-	2152
HRV-C	-	C026	EF582387	ICAM	-	2142

HRV-C	-	NAT045	EF077280	ICAM	-	2144
HRV-B	HRV-3	FEB	DQ473485	ICAM	1	2178
HRV-B	HRV-4	16/60	DQ473490	ICAM	1	2177
HRV-B	HRV-5	ATCC	FJ445112	ICAM	1	2177
HRV-B	HRV-6	Thompson	DQ473486	ICAM	1	2179
HRV-B	HRV-14	1059- South Carolina/59	L05355	ICAM	1	2179
HRV-B	HRV-17	33342- North Carolina/59	EF173420	ICAM	1	2186
HRV-B	HRV-26	ATCC	FJ445124	ICAM	1	2176
HRV-B	HRV-27	ATCC	FJ445186	ICAM	1	2178
HRV-B	HRV-35	164A	DQ473487	ICAM	1	2182
HRV-B	HRV-37	151-1	EF173423	ICAM	1	2178
HRV-B	HRV-42	ATCC	FJ445130	ICAM	1	2177
HRV-B	HRV-48	1505	DQ473488	ICAM	1	2184
HRV-B	HRV-52	ATCC	FJ445188	ICAM	1	2183
HRV-B	HRV-69	ATCC	FJ445151	ICAM	1	2183
HRV-B	HRV-70	F02-2547-Treganza	DQ473489	ICAM	1	2186
HRV-B	HRV-72	ATCC	FJ445153	ICAM	1	2179
HRV-B	HRV-79	ATCC	FJ445155	ICAM	1	2182
HRV-B	HRV-83	ATCC	FJ445161	ICAM	1	2183
HRV-B	HRV-84	ATCC	FJ445162	ICAM	1	2177
HRV-B	HRV-86	ATCC	FJ445164	ICAM	1	2178
HRV-B	HRV-91	ATCC	FJ445168	ICAM	1	2186
HRV-B	HRV-92	ATCC	FJ445169	ICAM	1	2183
HRV-B	HRV-93	SF-1492	EF173425	ICAM	1	2178
HRV-B	HRV-97	ATCC	FJ445172	ICAM	1	2177
HRV-B	HRV-99	ATCC	FJ445174	ICAM	1	2177

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) : นางสาวปิยดา หลินสุวนนท์

เกิด : 21 พฤษภาคม 2528

สถานที่เกิด : กรุงเทพมหานคร

e-mail address : Piyada-l@hotmail.com

ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2547-2550 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2551-ปัจจุบัน เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วบ.ม.)

หลักสูตรวิทยาศาสตรจารย์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัยและการเสนอผลงาน :

1. นำเสนอผลงานวิจัยภายใต้หัวข้อ “Human Rhinovirus C Infection in Thai Children with Acute Respiratory Tract Diseases.” ณ งานประชุม 10th International Symposium on Respiratory Viral Infection. วันที่ 19-22 กุมภาพันธ์ 2552 ณ โรงแรม Royal Orchid Sheraton Hotel & Towers กรุงเทพมหานคร

2. Piyada Linsuwanon, Sunchai Payungporn, Rujipat Samransamruajkit, Apiradee Theamboonlers, Yong Poovorawan. Recurrent Human Rhinovirus (A and C) infection in infants with refractory wheezing. Emerging Infectious Diseases (2009). Vol. 15, No. 6

3. Piyada Linsuwanon, Sunchai Payungporn, Rujipat Samransamruajkit, Nawarat Posuwan, Jarika Makkoch, Apiradee Theamboonlers, Yong Poovorawan. High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. Journal of Infection (2009) 59, 115-121