

การศึกษาความชุกและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วย
เด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี พ.ศ. 2553-2557



นางสาวประภาพร คุณทา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Prevalence and molecular characterization of human rhinovirus in stool of Thai
children with acute gastroenteritis during 2010-2014

Miss Prapaporn Khoonta



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความชุกและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี พ.ศ. 2553-2557
โดย	นางสาวประภาพร คุณทา
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร)

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

ประภาพร คุณทา : การศึกษาความชุกและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี พ.ศ. 2553-2557 (Prevalence and molecular characterization of human rhinovirus in stool of Thai children with acute gastroenteritis during 2010-2014) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงกร, 86 หน้า.

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนแบบไม่รุนแรง งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความชุกและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของคนที่เป็นโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันและคนที่ไม่เป็นโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระจากคนที่เป็นโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันซึ่งส่วนใหญ่เป็นเด็กจากจังหวัดกรุงเทพมหานครและจังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 จำนวนทั้งสิ้น 1,294 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยโรคมือเท้าปากหรือโรค herpangina จำนวนทั้งสิ้น 591 ตัวอย่าง โดยใช้ผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นกลุ่มควบคุม เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่ได้เป็นโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน การตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสใช้วิธี semi-nested PCR ในส่วนปลาย 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสและการสร้าง phylogenetic tree ใช้ส่วนของยีน VP4 พบว่าในตัวอย่างอุจจาระของเด็กโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส 2.3% (30/1,294) โดยพบ HRV-A 47%, HRV-B 17% และ HRV-C 37% ในทางตรงกันข้ามพบว่า ตัวอย่างอุจจาระจากกลุ่มควบคุมให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเพียง 0.9% (5/591) โดยส่วนใหญ่เป็น HRV-C (60%) ในกลุ่มตัวอย่างจากโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันพบว่า เด็กอายุต่ำกว่า 2 ปีมีอัตราการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมากที่สุด (87%) และพบการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในเพศชายมากกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถพบได้ตลอดทั้งปีโดยไม่มีฤดูกาลที่แน่นอน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบว่ามีเกิดการเกิด recombination ภายใน 5'UTR ของจีโนมเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อวิวัฒนาการของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674044830 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HUMAN RHINOVIRUS (HRV) / PREVALENCE / CHILDREN / GASTROENTERITIS / STOOL / THAILAND

PRAPAPORN KHOONTA: Prevalence and molecular characterization of human rhinovirus in stool of Thai children with acute gastroenteritis during 2010-2014. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D., 86 pp.

Human rhinoviruses (HRV) are the most common causes of mild upper respiratory tract infection. This study investigated the prevalence and characterized HRV in stool samples from individuals with and without acute gastroenteritis in Thailand. 1,294 stool samples were collected mostly from children with acute gastroenteritis residing in Bangkok and Khon Kaen province between January 2010 and October 2014. In addition, 591 samples from hand-foot-mouth disease or herpangina patients who do not have gastroenteritis served as a control cohort. Samples were initially screened by semi-nested PCR for HRV 5'UTR through VP2 capsid region. HRV genotyping and phylogenetic tree construction were determined using the VP4/VP2 regions. Among children with acute gastroenteritis, HRV infection was found in 2.3% (30/1,294) of stool samples, which comprised 47% HRV-A, 17% HRV-B, and 37% HRV-C. In contrast, 0.9% (5/591) of the control group was HRV-positive in which HRV-C (60%) was the major species found. Among acute gastroenteritis samples, HRV was found mostly in samples from children ≤ 2 years of age (87%), and in more males than females ($p < 0.05$). HRVs were detected throughout the year with no seasonal clustering. In addition, this study found recombination in 5'UTR which play a role in evolutionary genetic diversification of HRV.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่มอบโอกาสในการเข้าศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิต และมอบทุนค่าเล่าเรียนแก่ผู้วิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนจบการศึกษา และได้ให้โอกาสในการทำงานวิจัย ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือเพียบพร้อมและทันสมัย มีผู้เชี่ยวชาญคอยแนะนำการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือ นอกจากนี้อาจารย์ยังกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อ งานวิจัยนี้มาโดยตลอดจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตย์ พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งคอยให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ แก่ผู้วิจัยทั้งในด้านการทำวิจัย การเรียน และ การดำเนินชีวิต อีกทั้งยังช่วยให้คำแนะนำและช่วยหาวิธีการแก้ปัญหาเมื่อผู้วิจัยเกิดปัญหาต่างๆ อยู่เสมอ

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร ชินชัย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่คอยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องและขัดเกลา สำนวนภาษาให้ถูกต้องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณสมาชิกในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในงานวิจัย พร้อมทั้งสอน วิธีการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยให้ถูกต้อง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวเป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสใน การศึกษาต่อระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต พร้อมทั้งสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ให้ความรัก ความ อบอุ่น และเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณค่ะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
สารบัญแผนภาพ.....	ฒ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
กรอบความคิดของโครงการวิจัย.....	5
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	6
คำสำคัญ.....	6
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย.....	6
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
การค้นพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส.....	8
ลักษณะทั่วไปของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส.....	8

การเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	12
ความแตกต่างของ Human Rhinovirus และ Human Enterovirus	13
การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	14
ระบาดวิทยาของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	15
การติดต่อ และอาการแสดงทางคลินิก	18
การป้องกันและการรักษา	19
การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	20
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
รูปแบบการวิจัย	24
ประชากรที่ศึกษา	24
1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย	24
2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง	25
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	25
1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	25
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	26
3. สารเคมีที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง	27
4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัด RNA (RNA extraction)	27
5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียม cDNA template โดยการทำให้ Reverse transcription	27
6. สารเคมีที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR	28
7. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis	28
8. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์	28

9. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ cloning	28
10. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดพลาสมิด	29
11. โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	29
วิธีดำเนินการวิจัย	29
1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	29
2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส.....	29
3. การทำ Reverse transcription	30
4. การตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสด้วยวิธี Semi-Nested PCR ในบริเวณยีน VP4/VP2.....	30
5. การเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสด้วยวิธี PCR ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม	33
6. การเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างที่เกิด recombination ด้วยวิธี semi-nested PCR ในบริเวณส่วนต้นของ 5'UTR ถึง ส่วนต้นของยีน VP2	35
7. การสกัดแยก PCR product ให้บริสุทธิ์	37
8. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์.....	38
9. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	38
10. การรวบรวมข้อมูล.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	41
- ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาระบาดวิทยาและการจัดจำแนกสายพันธุ์เชิงซีโมเลกุลของเชื้อฮิว แมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระในประเทศไทย.....	41
1. ผลการวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสด้วยวิธี semi-nested PCR ใน ส่วนของยีน VP4/VP2.....	41
2. ผลการวิเคราะห์อายุและเพศของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	44

3.	ผลการวิเคราะห์การระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสและความสัมพันธ์กับฤดูกาล รวมถึงปีที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	46
4.	ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree และการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	49
5.	ผลการวิเคราะห์การกระจายของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วย โรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี 2010-2014	53
6.	ผลการวิเคราะห์การตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสร่วมกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นใน ตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน	54
7.	ผลการวิเคราะห์ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่ ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	55
-	ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม	57
1.	ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบ phylogenetic tree บริเวณ 5'UTR และยีน VP4/VP2	57
2.	ผลการวิเคราะห์การเกิด recombination ภายใน 5'UTR ของจีโนมเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	60
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	64
	รายการอ้างอิง	71
	ภาคผนวก.....	79
	ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	80
	ภาคผนวก ข ข้อมูลของตัวอย่างที่มีเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสพร้อมรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์	82
	ภาคผนวก ค	85
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	86

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระในงานวิจัยของต่างประเทศที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้.....	17
ตารางที่ 2	แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 เพื่อตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจากตัวอย่าง	31
ตารางที่ 3	แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อส่งวิเคราะห์ผล sequencing.....	32
ตารางที่ 4	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	32
ตารางที่ 5	แสดง Thermal profile ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส.....	33
ตารางที่ 6	แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม	34
ตารางที่ 7	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม.....	34
ตารางที่ 8	แสดง Thermal profile ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม	35
ตารางที่ 9	แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม	36
ตารางที่ 10	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม	36
ตารางที่ 11	แสดง Thermal profile ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม	37
ตารางที่ 12	แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	43
ตารางที่ 13	แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ).....	44
ตารางที่ 14	แสดงความชุกและช่วงอายุของผู้ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	45
ตารางที่ 15	แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในแต่ละเดือน	48

ตารางที่ 16 แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในแต่ละปีที่ทำการศึกษา 49

ตารางที่ 17 แสดงสายพันธุ์และ strain ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระของกลุ่มผู้ป่วย
โรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันและอุจจาระของกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากหรือโรค
Herpangina..... 52

ตารางที่ 18 แสดงการกระจายตัวของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยในแต่ละปี 54

ตารางที่ 19 แสดงอัตราการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วย 55

ตารางที่ 20 ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่ตรวจพบเชื้อ
ฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระ..... 56

ตารางที่ 21 แสดงค่า p -values ของการเกิด recombination จาก 6 วิธีในโปรแกรม RDP 63



สารบัญรูป

รูปที่ 1	แสดงอนุภาคของฮิวแมนโรโนไวรัส	9
รูปที่ 2	แสดงจีโนม การจัดเรียงตัวของยีน และโปรตีนที่ encode จากยีนของ ฮิวแมนโรโนไวรัส	9
รูปที่ 3	แสดงโครงสร้างของโปรตีน icosahedral capsid, บริเวณ canyon และ drug binding pocket	10
รูปที่ 4	แสดงการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส	13
รูปที่ 5	แสดงบริเวณภายใน 5'UTR ของจีโนมที่พบการเกิด recombination มากที่สุด	21
รูปที่ 6	แสดงขั้นตอนในการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR.....	23
รูปที่ 7	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ในส่วน 5'UTR และส่วนต้นของยีน VP2.....	31
รูปที่ 8	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ ฮิวแมนโรโนไวรัสในส่วน 5'UTR ของจีโนม	34
รูปที่ 9	แสดงผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite.....	39
รูปที่ 10	แสดงผลการใช้โปรแกรม Seqman TM II ในการตรวจสอบและแก้ไขผลของลำดับ นิวคลีโอไทด์	39
รูปที่ 11	แสดงผลผลิตภัณฑ์ขนาด 538 bp ที่ได้จากการทำ semi-nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ ฮิวแมนโรโนไวรัส	42
รูปที่ 12	กราฟแท่งแสดงช่วงอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระ	45
รูปที่ 13	กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสต่อฤดูกาลในกลุ่ม ผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน.....	47
รูปที่ 14	Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในส่วนของ ยีน VP4/VP2	50
รูปที่ 15	แสดงสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระจากกลุ่มผู้ป่วยโรค ลำไส้อักเสบเฉียบพลันและกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากหรือโรค Herpangina	51

รูปที่ 16 แสดงการกระจายตัวของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้ อักเสบเฉียบพลันช่วงปี 2010-2014.....	53
รูปที่ 17 แสดงจีโนมบริเวณ 5'UTR และยีน VP4/VP2.....	57
รูปที่ 18 Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในส่วน ของยีน VP4/VP2 และ 5'UTR.....	59
รูปที่ 19 แสดงผลการวิเคราะห์การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส.....	61
รูปที่ 20 แสดงการ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างที่มีการเกิด recombination....	62



สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
------------------------------------	---



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
Ab	Antibody
AOM	Acute Otitis Media
bp	Base Pair
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CPE	Cytopathic Effect
C _t	Cycle Threshold
ERCs	ECHO 28-Rhinovirus-Coryzavirus
HAdV	Human Adenovirus
HBoV	Human Bocavirus
HNoV	Human Norovirus
HPeV	Human Parechovirus
HRV	Human Rhinovirus
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IRESs	Internal Ribosome Entry Sites
kDa	Kilodalton
LDLR	Low-Density Lipoprotein Receptor

คำย่อ	ความหมาย
ml	Mililiter
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nt	Nucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
P-value (p)	Probability Value
RdRp	RNA-Dependent RNA Polymerase
RDP	Recombination Detection Program
RLPs	Ribosome Landing Pads
rpm	Rounds Per Minute
HRoV	Human Rotavirus
RNA	Ribonucleic Acid
SimPlot	Similarity Plot
UTR	Untranslated Region
URTI	Upper Respiratory Tract Infection
μ l	Microliter
VP	Viral Capsid Protein

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน (acute respiratory tract infection) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตของเด็กทั่วโลก เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเป็นไวรัสสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน โดยสามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส (6) อาการที่พบบ่อยที่สุดซึ่งเกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส คือโรคหวัด (common cold) ผู้ป่วยจะมีอาการคัดจมูก น้ำมูกไหล จาม เจ็บคอ ปวดศีรษะ และไอ โดยพบว่าร้อยละ 30 ถึง 50 ของโรคหวัดที่เกิดในผู้ใหญ่ และร้อยละ 10 ถึง 25 ของโรคหวัดที่เกิดในเด็ก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส แม้ว่าการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจะแสดงอาการของโรคไม่รุนแรงและสามารถหายได้เอง แต่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจอย่างมาก เพราะต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล และต้องขาดงานทำให้สูญเสียรายได้ แต่อย่างไรก็ตามการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสยังสามารถก่อโรคที่รุนแรงได้ เช่น หูชั้นกลางอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute otitis media (AOM)) ในเด็กและไซนัสอักเสบ (sinusitis) ในผู้ใหญ่ (7) นอกจากนี้เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสยังสามารถก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคปอดบวม (pneumonia) (8), หายใจมีเสียงหวีดในเด็ก (wheezing) (9), การกำเริบของโรคหอบหืด (exacerbations of asthma) และโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) ในผู้ใหญ่ (10)

การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีความชุกมากในฤดูใบไม้ผลิ (เดือนเมษายน-พฤษภาคม) และฤดูใบไม้ร่วง (ช่วงเดือนกันยายน) (11) เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ทางการหายใจ หรือทางการสัมผัสโดยตรงกับเยื่อทางเดินหายใจ หลังจากร่างกายได้รับเชื้อไวรัสเข้าไป เชื้อไวรัสจะใช้เวลาฟักตัว 1-4 วัน จึงเริ่มแสดงอาการ และอาการจะรุนแรงที่สุดในช่วง 3-7 วันหลังติดเชื้อ และเนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสนี้คือ 33 °C (12) ดังนั้นไวรัสจึงมักเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุจมูก และอาจตรวจพบไวรัสในสารคัดหลั่งของช่องปากและลำคอ แต่จะพบในปริมาณน้อยกว่าไวรัสที่อยู่ในสารคัดหลั่งจากจมูก

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสถูกจัดอยู่ในวงศ์ (family) *Picornaviridae* สกุล(genus) *Enterovirus* โดยปัจจุบันมีการแบ่งเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสออกเป็น 3 species คือ species A (HRV-A), species B (HRV-B) และ species C (HRV-C) ซึ่งมีสมาชิกอยู่มากกว่า 100 serotypes โดย HRV-A ประกอบด้วย 80 serotypes, HRV-B ประกอบด้วย 32 serotypes และ HRV-C มีอย่างน้อย 54 serotypes (13)

แต่เดิมเชื่อว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไม่สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ เพราะเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด โดยพบว่าที่ pH < 5 และ pH > 9-10 จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation ใน capsid protein ของไวรัส ทำให้ไวรัสสูญเสีย VP4 subunit ไป และทำให้ไวรัสสูญเสีย infectivity (14) ดังนั้นไวรัสชนิดนี้จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนในกระเพาะอาหารที่มี pH เป็นกรดได้ จึงมักไม่พบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระ แต่เมื่อปี 2009 Blomqvist และคณะสามารถตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในสิ่งปฏิกูลได้เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอนเทอโรไวรัส โดยเชื่อว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบนั้นมาจากการปนเปื้อนสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจผ่านการใช้กระดาษ tissue หรือการปนเปื้อนในน้ำเสีย (15) แต่ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่มีรายงานการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระมากขึ้น และในปี 2012 Harvala และคณะสามารถตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันได้ในอัตราที่สูง โดยพบประมาณร้อยละ 10 และพบว่ามี viral load มาก โดยมีค่า C_t -values ที่ต่ำ ใกล้เคียงกับที่พบในเชื้อเอนเทอโรไวรัส (1)

แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระยังมีอยู่น้อยมาก และไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน รวมถึงยังไม่เคยมีการศึกษาในกลุ่มคนที่ไม่มีอาการของโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาระบาดวิทยาและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี 2010-2014 เปรียบเทียบกับอุจจาระของกลุ่มคนที่ไม่มีอาการของโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน โดยใช้กลุ่มของผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก และโรคเฮอร์แปงไจนา (Herpangina) เป็นกลุ่มควบคุม การตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสใช้วิธี semi-nested PCR และ DNA sequencing ในบริเวณส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 นอกจากนี้ยังได้นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไปวิเคราะห์การเกิดรีคอมบิเนชัน (Recombination) ภายในบริเวณ 5'UTR ของจี

โนม โดยคาดหวังว่าความรู้ที่ได้จะช่วยทำให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาและสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระในประเทศไทยมากขึ้น รวมถึงการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระด้วย และคาดหวังว่าความรู้ที่ได้จากการศึกษาคั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคและพัฒนาความรู้ไปสู่การผลิตวัคซีนต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

คำถามงานวิจัย

1. ความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี 2010-2014 เป็นอย่างไร มีความแตกต่างจากข้อมูลของประเทศอื่นๆ หรือไม่อย่างไร
2. ความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยที่มีอาการของโรคมือเท้าปากหรือโรค Herpangina ช่วงปี 2012-2014 เป็นอย่างไร มีความแตกต่างจากความชุกในอุจจาระผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันหรือไม่ อย่างไร
3. สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในช่วงที่ทำการศึกษามีสายพันธุ์อะไรบ้าง
4. สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระมีการเกิด recombination ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนมไวรัสหรือไม่

วัตถุประสงค์งานวิจัย

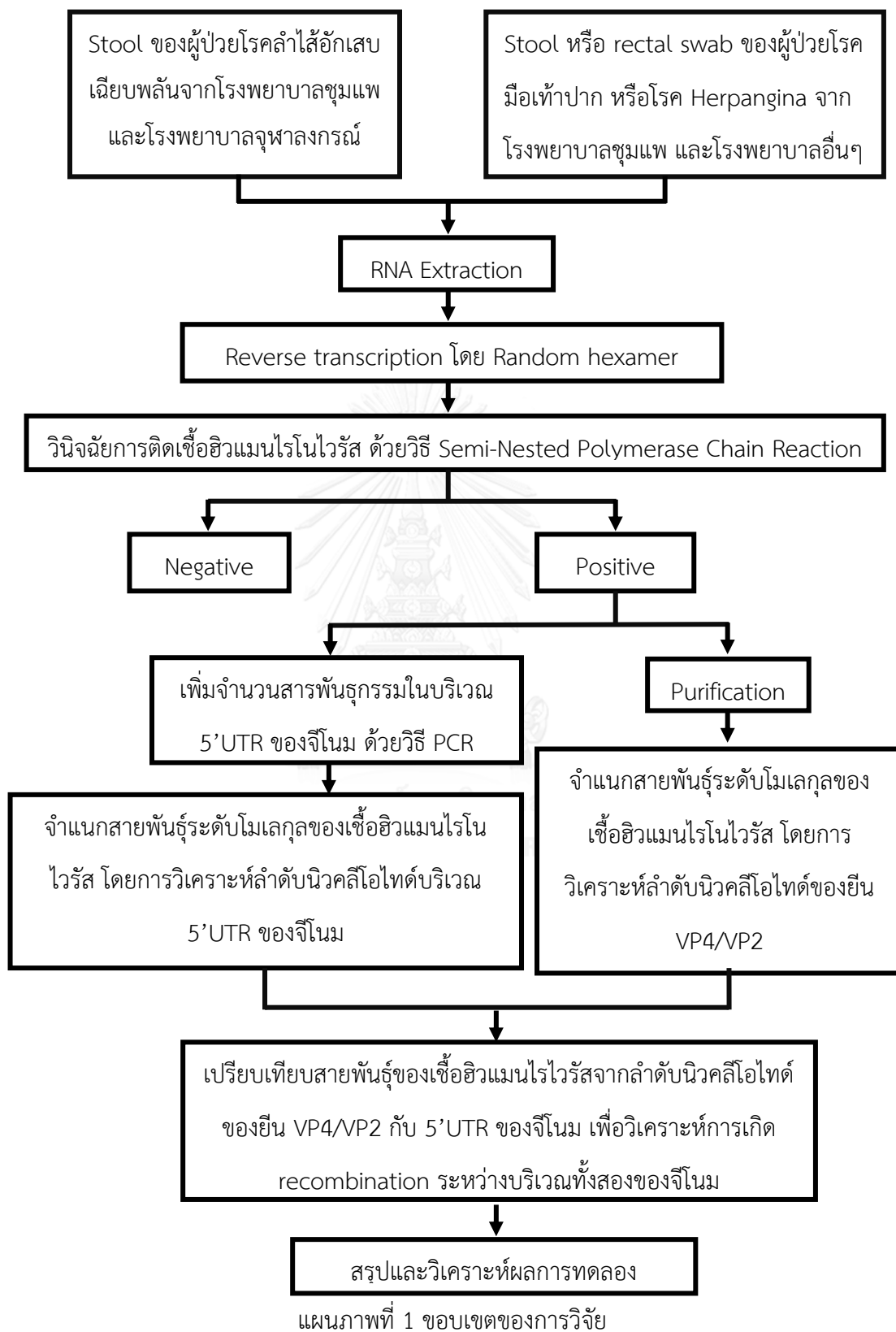
1. เพื่อศึกษาความชุกและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันช่วงปี 2010-2014 และในอุจจาระผู้ป่วยที่มีอาการของโรคมือเท้าปากหรือโรค Herpangina ช่วงปี 2012-2014
2. เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลความชุก และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยเด็กไทยที่ป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน และผู้ป่วยที่มีอาการของโรคมือเท้าปากหรือโรค Herpangina
3. เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลความชุก และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระที่พบในประเทศไทยกับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศ
4. เพื่อศึกษาการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในบริเวณ 5'UTR ของจีโนมไวรัส

สมมติฐานของการวิจัย

ข้อมูลการระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรค
ลำไส้อักเสบเฉียบพลันมีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก
และโรค Herpangina



กรอบความคิดของโครงการวิจัย



ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

คำสำคัญ

Human rhinovirus (HRV), Prevalence, Children, Gastroenteritis, Stool, Thailand

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย

1. Species คือ สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ซึ่งจำแนกโดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี serology test (antigen-antibody specific test) โดยเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถจำแนกได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ HRV-A, HRV-B และ HRV-C ไวรัสแต่ละชนิดที่ถูกจำแนกว่ามีความแตกต่างกันจะถูกแบ่งออกเป็น serotype สำหรับเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสประกอบด้วยไวรัสมากกว่า 100 serotypes
2. Strain คือ ฮิวแมนโรโนไวรัสซึ่งจัดอยู่ใน species เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์หรือมีลำดับกรดอะมิโนในบางตำแหน่งบนจีโนมต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree จะแสดงการจัดกลุ่มย่อยที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตต่าง strain แต่เป็น species เดียวกันนั้น กำหนดให้มี %nucleotide identity ตั้งแต่ 80% ขึ้นไป

ข้อจำกัดในการวิจัย

การใช้ตัวอย่างที่เหลือจากโครงการอื่นนั้น สารพันธุกรรมของสารตัวอย่างอาจมีไม่เพียงพอหรือสลายไป (degrade) จึงต้องทำการสกัดใหม่ในบางตัวอย่าง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระในประเทศไทย และสามารถนำข้อมูลนี้มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันควบคุมโรค และการผลิตวัคซีนในอนาคตต่อไป
2. ฝึกกระบวนการคิด การวิเคราะห์ และสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการทดลอง
3. ได้เรียนรู้และฝึกฝนการใช้เครื่องมือต่างๆ ตลอดถึงวิธีการใหม่ในการวิจัยทางอนุชีววิทยา

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะได้รับการเผยแพร่ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการอ้างอิงและศึกษาต่อยอดต่อไปในอนาคต
5. ผลงานวิจัยสามารถเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

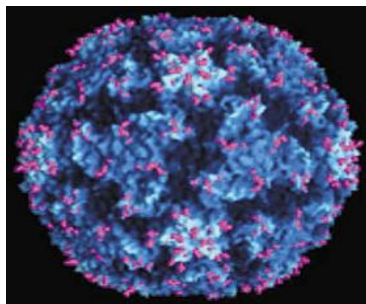
การค้นพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส (Human Rhinovirus, HRVs) ถูกจัดอยู่ในวงศ์ (family) *Picornaviridae* สกุล (genus) *Enterovirus* เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเป็นกลุ่มไวรัสขนาดใหญ่ที่มีมากกว่า 100 serotypes ปัจจุบันสามารถแบ่งเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้เป็น 3 species คือ HRV species A (HRV-A) ประกอบด้วย 80 serotypes, HRV species B (HRV-B) ประกอบด้วย 32 serotypes และ HRV species C (HRV-C) ที่มีอย่างน้อย 54 types แต่เดิมเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสถูกเรียกว่า coryzavirus, ECHO 28-rhinovirus-coryzavirus (ERCs), murivirus, nasal secretion agents, Salisbury strains หรือ enterovirus-like virus เนื่องจากมีลักษณะทั่วไปคล้ายกับเชื้อ enterovirus (3, 16-19) เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสถูกแยกได้ครั้งแรกในปี 1953 จากการศึกษาของ Andrews และคณะโดยการนำตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูกของผู้ป่วยโรคไข้หวัดมาเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ particular human embryo และถูกตั้งชื่อว่า HRV strain D.C. ซึ่งภายหลังผลการจัดจำแนกสายพันธุ์พบว่า HRV strain D.C. คือ HRV serotype 9 (HRV-9) นั่นเอง (17, 20)

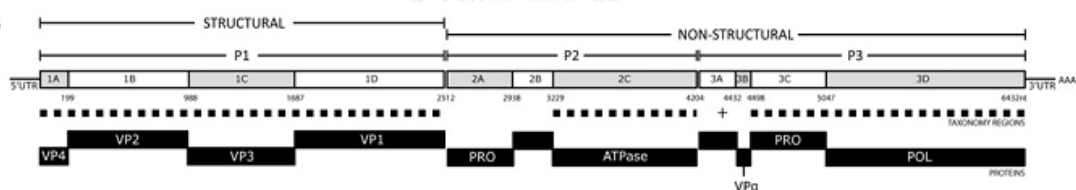
ลักษณะทั่วไปของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

ฮิวแมนโรโนไวรัสเป็นไวรัสไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) ดังรูปที่ 1 มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดบวกและเป็นเส้นตรง (positive single stranded RNA) มีขนาดจีโนมประมาณ 7,200 นิวคลีโอไทด์ จัดเป็นไวรัสขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 25-30 นาโนเมตร จีโนมของไวรัสจะบรรจุอยู่ในโปรตีน capsid ที่ประกอบกันเป็นรูปทรงกลมที่มีสามเหลี่ยมด้านเท่าจำนวน 20 ด้านประกอบกัน (icosahedral structure) และมีการจัดเรียงตัวของจีโนมอย่างต่อเนื่องเพียง 1 open-reading frame ซึ่งจะถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนสายยาว (polyprotein) 1 สายที่มีขนาดประมาณ 250 kDa จากนั้นจะถูกเอนไซม์ protease ตัดออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อย 11 โปรตีนต่อไป กระบวนการตัดสาย polyprotein จะเกิดควบคู่ไปกับกระบวนการแปลรหัส (co-translational cleavage) ทำให้ไม่พบสาย polyprotein ที่สมบูรณ์ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ การจัดเรียงตัวของจีโนมของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเริ่มจาก peptide สายสั้นๆ (VPg) เชื่อมกับ 5'UTR ตามด้วย capsid-

coding region (P1) ซึ่งถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่ประกอบกันเป็นโครงสร้างของไวรัส และตามด้วย P2 และ P3 region ซึ่งถูกแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัส และส่วนสุดท้ายของจีโนมไวรัสคือ short 3' non-coding region ที่มี poly-A tail อยู่ (21) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงอนุภาคของฮิวแมนโรโนไวรัส (21)



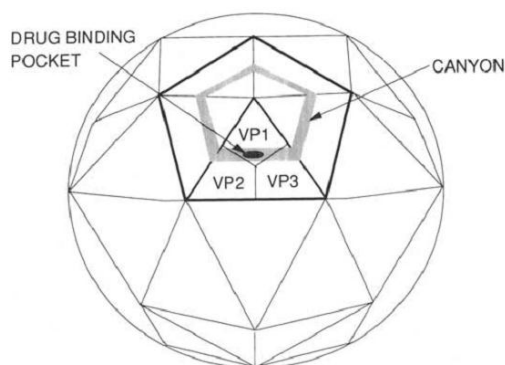
รูปที่ 2 แสดงจีโนม การจัดเรียงตัวของยีน และโปรตีนที่ encode จากยีนของฮิวแมนโรโนไวรัส (22)

โปรตีนของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสแบ่งได้ดังนี้

Structural protein: ยีนที่แปลรหัสให้ structural protein อยู่ในส่วนของ structural region หรือ P1 region จีโนมบริเวณนี้มีขนาดเฉลี่ย 2,500 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยยีนที่สร้างโปรตีน 4 ชนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัสหรือโปรตีน capsid ของไวรัส คือ VP4 (200 nt), VP2 (800 nt), VP3 (700 nt) และ VP1 (800 nt) ซึ่งมีน้ำหนัก 7-8 kDa, 27-30 kDa, 24-28 kDa และ 34-36 kDa ตามลำดับ (23) โดย VP1-VP3 ประกอบเป็นผิวด้านนอกของโปรตีน capsid ในขณะที่ VP4 ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่สุดจะอยู่ที่ผิวด้านในของอนุภาคเพื่อยึด RNA core และโปรตีน capsid เข้าด้วยกัน อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย 60 หน่วยย่อย (protomer) แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วยแต่ละ copy ของ VP1-VP4 ทำให้มีลักษณะคล้ายสามเหลี่ยมด้านเท่า โปรตีนหน่วยย่อยจะประกอบกันเป็นรูปทรงกลมที่มีสามเหลี่ยมด้านเท่าจำนวน 20 ด้านประกอบกัน

(icosahedral structure) การประกอบโครงสร้างของ icosahedral capsid เริ่มจาก 5 หน่วยย่อยของ protomer ประกอบกันเป็นโปรตีนหน่วยย่อย pentamer จากนั้นโปรตีน 12 pentamer จึงรวมกันเป็นโครงสร้างแบบ icosahedral โปรตีน VP1 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นบริเวณที่กำหนด antigenicity ของไวรัส โดยในส่วนของ VP1 และ VP3 มีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายร่องที่เรียกว่า canyon บริเวณ canyon นี้จะถูกจดจำด้วย neutralizing antibody (Ab) ของเจ้าบ้าน ที่มีความจำเพาะต่ออนุภาคของไวรัส นอกจากนี้ภายใน canyon ยังมีโครงสร้างที่สำคัญ คือ drug binding pocket (รูปที่ 3) ที่อยู่ลึกลงมาจาก canyon ประมาณ 2.5 nm ซึ่งเป็นบริเวณที่ไวรัสใช้จับกับ receptor บนผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน โดยเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 90 (major group) จะใช้ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) เป็น receptor ส่วนเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่วนน้อย (minor group) จะใช้ low-density lipoprotein receptor (LDLR) เป็น receptor นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่ใช้ ICAM-1 บางตัวยังสามารถใช้ heparan sulfate เป็น receptor ได้อีกด้วย (23) นอกจากนี้พบว่าบริเวณ drug binding pocket เป็นบริเวณที่นิยมออกแบบยาต้านไวรัส โดยยาต้านไวรัสจะเข้าจับกับ drug binding pocket ส่งผลให้โครงสร้างบริเวณ canyon บิดเบี้ยวไป ทำให้ไม่สามารถจับ receptor ได้ หรือยาต้านไวรัสทำให้โครงสร้างของ capsid เสถียรขึ้น ส่งผลให้ไวรัสไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน capsid จึงไม่สามารถปล่อยจีโนมของไวรัสออกมาได้ (24)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของโปรตีน icosahedral capsid, บริเวณ canyon และ drug binding pocket (24)

Nonstructural protein: ยีนที่แปลรหัสให้ nonstructural protein อยู่ในส่วนของ nonstructural region หรือ P2 และ P3 region จีโนมบริเวณนี้ประกอบด้วยยีนหลายชนิดที่แปลรหัสให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication, co-translational cleavage และการประกอบเป็นอนุภาคของไวรัส P2 region ประกอบด้วยยีน 2A, 2B และ 2C ส่วน P3 region ประกอบด้วยยีน 3A, 3B, 3C และ 3D โปรตีนสำคัญที่ได้จากการถอดรหัสของ nonstructural gene มีดังนี้

- **เอนไซม์ 2A (2A protease, 2A^{pro}):** เป็น virus-specific protease ที่ทำหน้าที่ตัด P1 region ออกจาก P2 และ P3 region นอกจากนี้เอนไซม์ 2A ยังทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน โดยจะทำลาย P220 ซึ่งเป็น cap-binding protein ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้กระบวนการถอดรหัสของเซลล์เจ้าบ้านถูกยับยั้งและไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้
- **โปรตีน 3B (VPg):** เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 22 amino acid ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างโปรตีน capsid กับส่วนปลาย 5'UTR ของจีโนม และทำหน้าที่เป็น primer ให้กับ RNA-dependent RNA polymerase (RDRP) ในการสังเคราะห์ RNA
- **เอนไซม์ 3C (3C protease, 3C^{pro}):** เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ co-translational cleavage เกือบทั้งหมดของไวรัส โดยทำหน้าที่ตัดโปรตีนสายยาวออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อยให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้
- **RNA-dependent RNA polymerase (RdRp หรือ 3D^{pol}):** เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ replication (24)

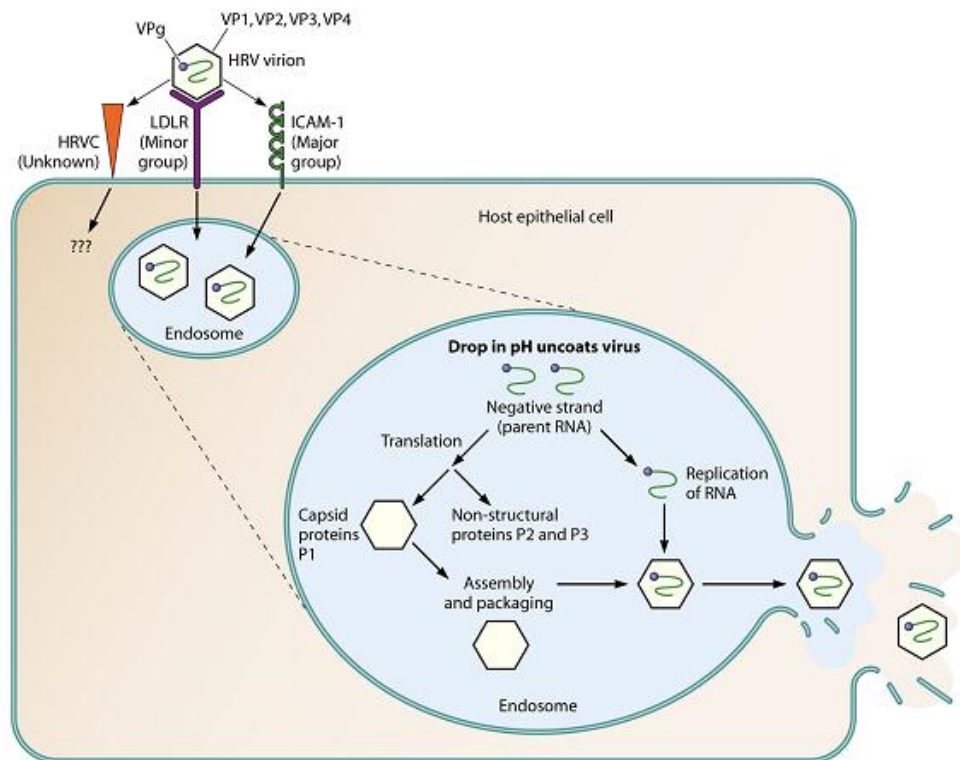
นอกจากนี้ยังมีส่วนของ 5'untranslated regions (5'UTR) ซึ่งเป็นส่วนต้นของจีโนม บริเวณนี้มีโครงสร้างเป็น secondary structure ลักษณะคล้ายรูปไม้กางเขน ซึ่งมีความสำคัญในการจดจำของ polymerase และกระบวนการ RNA replication (25) โดยปกติแล้วจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านจะมีการเติม cap ที่ปลาย 5'ของสาย mRNA ซึ่งบริเวณ 5'-cap จะถูกจดจำด้วย cap-binding protein จากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิด pre-initiation complex โดยมี 80s ribosome เข้ามาเกาะเพื่อหา AUG ที่เป็น initiation codon และเกิดกระบวนการถอดรหัสต่อไป แต่เนื่องจากเชื้อฮิวแมนไรโนไวรัสไม่มี 5'-cap แต่จะมี internal ribosome entry sites (IRESs) หรือ ribosome landing pads (RLPs) ที่มีขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ อยู่ในบริเวณ 5'UTR ที่สามารถจับกับ ribosome ได้

โดยไม่ต้องมี 5'-cap หรือ cap-binding protein ทำให้ไวรัสสามารถเกิดกระบวนการถอดรหัสได้โดยไม่ต้องมี 5'-cap เรียกกระบวนการนี้ว่า 5'-cap independent pathway (26-28)

การเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

กระบวนการ replication จะเกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน โดยบริเวณสำคัญของการเกิด replication คือบริเวณ ciliary epithelial cell ในเยื่อจมูก (nasal mucosa) เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเข้าสู่เซลล์เยื่อจมูก (nasal epithelial cells) โดยการเกาะติดกับตัวรับ (receptor) จำเพาะบนผิวเซลล์ โดยเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 90 ใช้ ICAM-1 เป็น receptor หลักในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และมีเพียงส่วนน้อยที่ใช้ LDLR เป็น receptor (29) หลังจากที่ไวรัสจับกับ receptor แล้ว อนุภาคไวรัสจะถูกพาเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยกระบวนการ clathrin-dependent endocytosis หรือ clathrin-independent endocytosis หรือ macropinocytosis เนื่องจากสภาวะแวดล้อมภายใน endosome ที่มี pH ต่ำ ทำให้ไวรัสเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน capsid หรือ uncoating และปล่อยจีโนมเข้าสู่ไซโทพลาสซึม จากนั้นจึงเริ่มต้นกระบวนการจำลองจีโนมและถอดรหัสต่อไป (30)

เมื่อจีโนมสายบวกเข้าสู่ไซโทพลาสซึมแล้ว จะถูก ribosome ของเซลล์เจ้าบ้านทำการแปลรหัสเพื่อสร้าง RNA-dependent RNA polymerase (RDRP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างสาย antisense RNA หรือ จีโนมสายลบเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสและใช้สำหรับสร้างสาย messenger RNA ซึ่งจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนสายยาว จากนั้นจะถูกเอนไซม์ protease ของไวรัสตัดโปรตีนสายยาวออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อยต่อไป ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญที่จะเป็นส่วนประกอบต่างๆ ของอนุภาคไวรัส เช่น structural (capsid) protein และ nonstructural protein หลังจากสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของไวรัสครบแล้วจึงจะมีการประกอบ (assembly) เป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่และปล่อยออกจากเซลล์โดยการย่อยเซลล์เมมเบรนของเซลล์เจ้าบ้าน (23) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนไรโนไวรัส (23)

ความแตกต่างของ Human Rhinovirus และ Human Enterovirus

เชื้อฮิวแมนไรโนไวรัสและเชื้อฮิวแมนเอนเทอโรไวรัส เป็นไวรัสที่จัดอยู่ใน family และ genus เดียวกัน คือ *Picornaviridae* และ *Enterovirus* ตามลำดับ โดยไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกันหลายประการ ได้แก่ สัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัส การจัดเรียงตัวของจีโนม และกระบวนการ replication ของไวรัส เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนไรโนไวรัสโดยเฉลี่ยคือ 33°C (12) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่พบได้ในระบบทางเดินหายใจโดยเฉพาะในระบบทางเดินหายใจส่วนบน บริเวณที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนไรโนไวรัส คือบริเวณ ciliary epithelial cell ในเยื่อจมูก (nasal mucosa) (31) นอกจากนี้เชื้อฮิวแมนไรโนไวรัสยังไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด โดยพบว่าที่ $\text{pH} < 6.2$ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation ใน capsid protein ของไวรัส ทำให้ไวรัสสูญเสีย VP4 subunit ไป และทำให้ไวรัสสูญเสีย infectivity (14) ซึ่งแตกต่างกับเชื้อเอนเทอโรไวรัสที่สามารถทนสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดได้ โดยพบว่าที่ $\text{pH} < 3$ เชื้อฮิวแมนเอน

เทอโรไวรัสยังสามารถคงคุณสมบัติ viral infectivity ไว้ได้ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนเอนเทอโรไวรัส คือ 37 °C ดังนั้นเชื้อฮิวแมนเอนเทอโรไวรัสจะเจริญได้ดีในระบบทางเดินอาหาร

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถใช้เกณฑ์การพิจารณาได้หลายรูปแบบ แต่เดิมการจัดกลุ่มของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสใช้วิธี capsid serotyping โดยการพิจารณาความจำเพาะของ neutralizing antibody ต่อ antigenic site บนอนุภาคไวรัส ซึ่งวิธีนี้สามารถจำแนกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้มากกว่า 100 serotypes หรือใช้เกณฑ์การพิจารณาความจำเพาะของ receptor ที่เชื้อไวรัสใช้ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ทำให้สามารถจำแนกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่ใช้ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) เป็น receptor ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสมาชิก 91 serotypes จึงถือว่าเป็น receptor หลัก (major receptor) ที่เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่วนใหญ่ใช้ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน
2. กลุ่มที่ใช้ low-density lipoprotein receptor (LDLR) เป็น receptor ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งถือว่าเป็น receptor รอง (minor receptor) ที่ไวรัสใช้ เพราะมีเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเพียง 10 serotypes ที่ใช้ receptor ชนิดนี้ (32)
3. กลุ่มที่ใช้ heparan sulfate เป็น receptor ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยพบว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่ใช้ ICAM-1 บางตัวสามารถใช้ heparan sulfate เป็น receptor ได้อีกด้วย (23)

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส โดยพิจารณาจากการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส (anti-viral drug sensitivity) เช่นยา pleconaril ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ต้านต่อยามีประมาณร้อยละ 10 เช่น HRV-4, HRV-5, HRV-70, HRV-72, HRV-84 และ HRV-86 เป็นต้น และกลุ่มที่ไม่ต้านต่อยามีประมาณร้อยละ 90 เช่น HRV-1A, HRV-9, HRV-15, HRV-29, HRV-30, HRV-61, HRV-76 และ HRV-88 เป็นต้น (33)

ในปัจจุบันการจำแนกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจะใช้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นหลัก โดยพิจารณาจากความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนในส่วนต่างๆของจีโนม โดยบริเวณ 5'UTR และ capsid protein ในส่วนของยีน VP4 หรือ VP1 จะสามารถจัดจำแนกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้มากกว่า 100 serotypes โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ HRV-A มีสมาชิก 80 serotypes, HRV-B มีสมาชิก 32 serotypes และ HRV-C ที่มีสมาชิกอย่างน้อย 54 types

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส พบว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส serotype 87 มีลักษณะคล้ายคลึงกับ HEV specie D คือ HEV-68 มากกว่า HRV จึงมีการจัดกลุ่มแยกออกมา แต่อย่างไรก็ตามพบว่า HRV-87 ยังมีคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส คือไม่ทนต่อสภาวะกรด ซึ่งแตกต่างจาก HEV แสดงให้เห็นว่า HRV-87 มีลักษณะร่วมกันระหว่าง HRV และ HEV (34, 35)

ระบาดวิทยาของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

การระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วโลกและมักมีการติดเชื้อในเด็กอายุระหว่าง 2 เดือนถึง 2 ปี โดยพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของเด็กอายุ 2 ปีจะเคยมีประวัติการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสอย่างน้อย 1 ครั้ง (36) การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีความชุกมากในฤดูใบไม้ผลิ (เดือนเมษายน-พฤษภาคม) และฤดูใบไม้ร่วง (ช่วงเดือนกันยายน) (11) สำหรับการศึกษาระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในประเทศไทย พบว่า HRV-C และ HRV-A จะมีความชุกมากในฤดูฝนและช่วงต้นฤดูหนาว (37) นับตั้งแต่มีการแยกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้ครั้งแรกในปี 1953 จากตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูกของผู้ป่วยโรคไขหวัด เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้ถูกค้นพบอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มการระบาดเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ในอดีตสามารถจำแนกเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้ 2 สายพันธุ์คือ HRV-A และ HRV-B ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ จนกระทั่งปี 2006 ได้มีรายงานการค้นพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสายพันธุ์ใหม่คือ HRV-C และพบว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้ทำให้อาการของโรครุนแรงมากกว่า HRV-A และ HRV-B โดยพบว่า HRV-C ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง, หายใจมีเสียงหวีด และการกำเริบของโรคหอบหืด (37-44) แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า สามารถพบ HRV-C ได้ในคนปกติที่ไม่มีอาการของระบบทางเดินหายใจ และไม่พบความแตกต่างของอาการผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสต่างสายพันธุ์กัน (45) จากการศึกษาการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสทั่วโลกพบว่า ในประเทศจีน, ฮองกง,

ไทย, อิตาลี และจอร์แดนมักพบเชื้อ HRV-A และ HRV-C เป็นสายพันธุ์หลักที่ระบาดในกลุ่มประชากรมากกว่า HRV-B (37, 41-43)

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเป็นสาเหตุหลักที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสนี้ได้ในตัวอย่างไม่ล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก ซึ่งแต่เดิมเชื่อว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไม่สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ เนื่องจากเชื้อไวรัสนี้ไม่ทนกรดและจะสูญเสีย infectivity ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นกรดของกระเพาะอาหาร (15) ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสนี้ได้ในตัวอย่างไม่อุจจาระ แต่ในปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างไม่อุจจาระ โดยมีความชุกประมาณร้อยละ 10 จึงเชื่อว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนและก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้



ตารางที่ 1 แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระในงานวิจัยของต่างประเทศที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้

ประเทศ	ลักษณะอาการของผู้ป่วย	กลุ่มอายุ	วิธีทดสอบ	จำนวนตัวอย่าง	Species (%)			ความชุก	ปีที่ทำการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
					HRV-A	HRV-B	HRV-C			
อังกฤษ	Gastroenteritis	< 2 ปี	Nested RT-PCR	288	46	13	41	10%	2010-2011	(1)
ฮ่องกง	Gastroenteritis	3 ปี	RT-PCR	734	NA	NA	NA	7.9%	2004-2005	(2)
อิตาลี	Gastroenteritis	32 ปี	Real-time RT-PCR	689	NA	NA	NA	5.2%	2011-2012	(3)
ฟินแลนด์	Healthy children background population	< 3 ปี	RT-PCR	4184	79	8	13	10.5%	1996-2009	(4)
ฟินแลนด์	Upper respiratory infections, otitis media, laryngitis and gastrointestinal symptoms	< 11 ปี	Real-time RT-PCR	425	54	23	15	35.1%	2009-2011	(5)

หมายเหตุ: NA=Not Available

การติดต่อ และอาการแสดงทางคลินิก

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถแพร่กระจายได้จากการสัมผัสโดยตรงกับละอองของเหลว (aerosol transmission) เช่น น้ำมูก น้ำลาย และเสมหะของผู้ป่วย ที่มาจากการไอ การจาม การพูดคุย และการหายใจของผู้ป่วย (46) นอกจากนี้เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสยังสามารถแพร่กระจายได้โดยทางอ้อมจากการสัมผัสกับวัตถุที่เป็นพาหะนำเชื้อที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส (contact transmission) เช่น ลูกบิด ที่จับประตูตู้เย็น และรีโมททีวี เป็นต้น เนื่องจากเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่บนพื้นผิวของวัตถุที่เป็นพาหะนำเชื้อเหล่านี้ได้นานหลายชั่วโมง จึงสามารถทำให้เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายได้ โดยเชื้อไวรัสจะเข้าสู่ร่างกายทางจมูก เยื่อบุตา และปาก (47)

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถก่อโรคได้ทั้งในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กทารกและเด็กเล็ก ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจะมีอาการแสดงที่หลากหลาย ตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงมีอาการของโรคอย่างรุนแรงที่ต้องเข้ารับรักษาในโรงพยาบาล เช่น โรคปอดอักเสบ (pneumonia) และโรคหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) เป็นต้น (48) ส่วนอาการที่พบได้บ่อยที่สุดซึ่งเกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส คือโรคหวัดทั่วไป (common cold หรือ coryza) โดยพบในทุกกลุ่มอายุ ซึ่งอาการของโรคหวัดที่เกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจะไม่สามารถแยกได้จากโรคหวัดที่มาจากโรคหวัดชนิดอื่น หลังจากร่างกายได้รับเชื้อไวรัสเข้าไป เชื้อไวรัสจะใช้เวลาฟักตัว 1-4 วัน จึงเริ่มแสดงอาการ และมีอาการรุนแรงที่สุดในช่วง 3-7 วันหลังติดเชื้อ (21) ผู้ป่วยมีอาการคัดจมูก น้ำมูกไหล จาม เจ็บคอ ปวดศีรษะ ไอ หายใจไม่ออก มีไข้ หนาวสั่น เสียงแหบ สูญเสียการรับรสและการได้กลิ่น ปวดเมื่อยเนื้อตัว (49, 50) แสบตาเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีอาการหูอักเสบจากไซนัสอักเสบ (sinuses) เนื่องจากมีการบวมของเยื่อ ระยะเวลาในการรักษาจะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล แต่โดยเฉลี่ยคือ 2 สัปดาห์ นอกจากนี้การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในเด็กมักก่อให้เกิดภาวะหูชั้นกลางอักเสบอย่างรุนแรง หรือ Acute otitis media (AOM) มีงานวิจัยที่ระบุว่าสามารถตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้ 40% จาก nasopharyngeal sample ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย AOM ในเด็กอายุ 2 เดือนถึง 2 ปี (36) นอกจากนี้การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสยังก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้อีกด้วย เช่น อาการไอและหายใจลำบาก (croup) โรคหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) โรคปอดอักเสบ (pneumonia) โรคหอบหืด (asthma) และหายใจมีเสียงหวีดอย่างเฉียบพลัน (acute wheezing) (51)

การป้องกันและการรักษา

เนื่องจาก antigenic diversity ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ทำให้ยากต่อการพัฒนาวัคซีนในการรักษาการติดเชื้อของไวรัสชนิดนี้ ทางที่ดีที่สุดในการลดการติดเชื้อของไวรัสชนิดนี้ คือการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ โดยการปฏิบัติตามสุขอนามัยที่ดี เช่น ล้างมือด้วยน้ำและสบู่ให้สะอาด หลีกเลี่ยงการใช้มือสัมผัสกับจมูก ตา และปาก และหลีกเลี่ยงการอยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยโรคหวัดหรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (52)

แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามพัฒนาายาด้านเชื้อไวรัสหลายชนิดเพื่อใช้รักษาอาการที่เกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส โดยสามารถแบ่งยาด้านไวรัสได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มยาที่จับบนโปรตีน capsid ของไวรัส: กลุ่มยาเหล่านี้จะจับที่ hydrophobic pocket ซึ่งอยู่ภายใต้ canyon ของ viral capsid และป้องกัน infection ของไวรัส เนื่องจากการจับของยากับ hydrophobic pocket ทำให้ capsid structure ของไวรัสมีความเสถียรมากขึ้น ป้องกันการเปลี่ยนแปลง conformation ของ capsid structure ซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการแยกสารพันธุกรรมของไวรัสออก (uncoating) จากส่วนของโปรตีน และการปล่อย genomic RNA ของไวรัส เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนี้ยาที่จับกับ hydrophobic pocket บางตัวยังขัดขวางการ interaction กันระหว่างไวรัสและ cellular receptor อีกด้วย (53) ดังนั้นยากกลุ่มนี้จึงสามารถยับยั้งกระบวนการ replication ของไวรัสได้ ยาในกลุ่มนี้ที่ใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ pleconaril ซึ่งเป็นยาที่ใช้ต้านการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของไวรัสในกลุ่ม picornavirus แต่ยาชนิดนี้ไม่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) เนื่องจากพบว่าเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 3A (21) นอกจากนี้ยังมียาชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ได้แก่ vapendavir และ Pirodavir (23)

2. กลุ่มยาที่ยับยั้งเอนไซม์ protease ของไวรัส: ยาในกลุ่มนี้ที่สำคัญและมีประสิทธิภาพมากคือ rupintrivir เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ 3C protease ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ตัดโปรตีนสายยาว (polyprotein) ออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อย และเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการ replication ของไวรัส รวมทั้งการประกอบกันเป็นอนุภาคของไวรัส (assembly) ยา rupintrivir สามารถลด

ปริมาณของไวรัส และอาการในระบบทางเดินหายใจได้ (54) ส่วนยาชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ alpha-2 interferon, echinacea, zinc และ antihistamines (23)

3. กลุ่มยาที่จับกับ ICAM-1: เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่วนใหญ่จะใช้ ICAM-1 เป็น receptor ซึ่งอยู่บนโฮสต์เซลล์ในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ tremacamra แต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด (23)

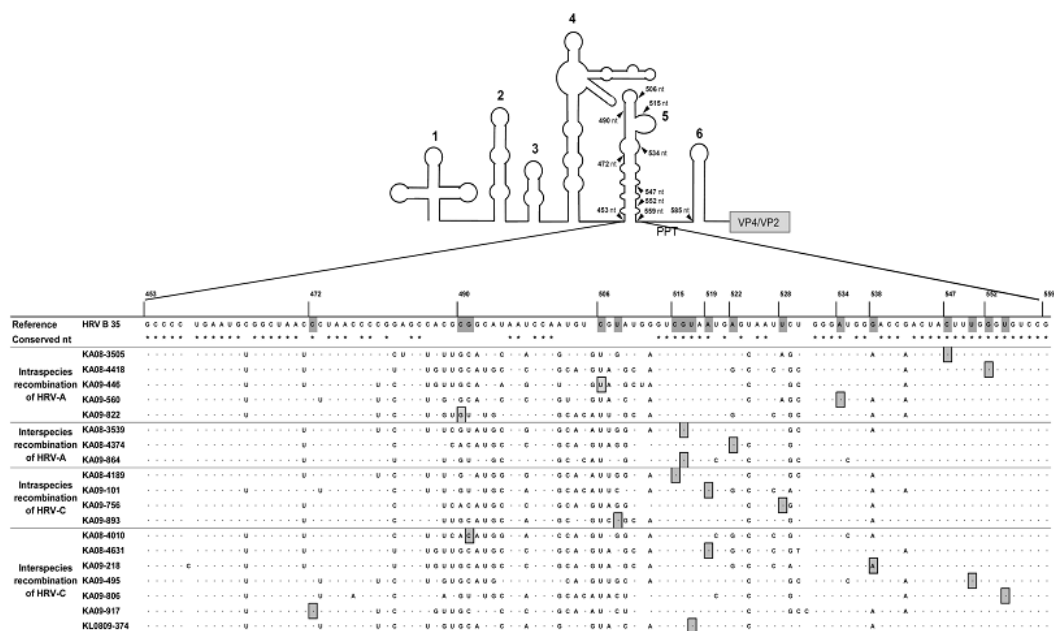
การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* สกุล *Enterovirus* ซึ่งเชื้อไวรัสในวงศ์นี้มีการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการทำให้เกิดความหลากหลายในสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสโดยผ่านการกระบวนการเกิด recombination บริเวณที่พบว่าการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส คือบริเวณรอยต่อระหว่าง 5'UTR และ structural gene (P1 region), บริเวณรอยต่อระหว่าง P1 และ P2 region และ บริเวณรอยต่อระหว่าง P2 และ P3 region (55-58) แต่ส่วนใหญ่การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมักพบได้มากที่สุดที่สุดในบริเวณรอยต่อระหว่าง 5'UTR และ structural gene บริเวณ 5'UTR ของจีโนมมีขนาดประมาณ 650 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 2 โครงสร้างหลัก คือ 5'Terminal clover leaf like motif หรือ *OriL* มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส โดยไปยับยั้งกระบวนการ translation ของไวรัสเพื่อนำ RNA ของไวรัสมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย antisense RNA ส่วนอีกโครงสร้างหนึ่งคือ Internal ribosome entry site (IRES) มีหน้าที่ในกระบวนการ translation ของไวรัส โดยจะมี ribosome หรือ initiation complex ของโฮสต์เซลล์เข้ามาจับเพื่อเริ่มหา start codon และเริ่มกระบวนการ translation ต่อไป โครงสร้าง IRES จะประกอบด้วย 5 stem-loop (SL) ตั้งแต่ stem-loops ที่ 2 ถึง stem-loop ที่ 6 นอกจากนี้ยังมีส่วนของ polypyrimidine tract (PPT) ที่อยู่ระหว่าง SL5 และ SL6 ซึ่งบริเวณ SL5 และ PPT จะมี polypyrimidine tract binding protein (PTB) ซึ่งเป็น cellular translation initiation protein เข้ามาจับเพื่อเริ่มกระบวนการ translation (59)

การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจะพบได้มากที่สุดที่สุดในบริเวณรอยต่อระหว่าง 5'UTR ของจีโนมและยีน VP4 จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าตำแหน่งของการเกิด

recombination ส่วนใหญ่มักอยู่ในบริเวณ SL5 ของ IRES ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความ conserve ของ ลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (60) และอีกบริเวณหนึ่งที่พบการเกิด recombination ได้บ่อยคือ PPT ถึง SL6 (56)

การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่งผลให้เกิดความหลากหลายในสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส เช่นการเกิด recombination ของ HRV-C และ HRV-A ทำให้เกิดความหลากหลายในสายพันธุ์ของ HRV-C ซึ่งสามารถแบ่ง HRV-C ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ HRV-Ca และ HRV-Cc HRV-C ที่มีส่วนของ 5'UTR คล้ายกับ 5'UTR ของ HRV-A จะถูกเรียกว่า HRV-Ca โดยเกิดจาก recombination ระหว่าง HRV-C และ HRV-A ในส่วนของ 5'UTR ของจีโนม ในขณะที่ HRV-Cc มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5'UTR แตกต่างไปจาก HRV-A และ HRV-B



รูปที่ 5 แสดงบริเวณภายใน 5'UTR ของจีโนมที่พบการเกิด recombination มากที่สุด (60)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นในปี 1986 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ในระยะเวลาอันสั้นและรวดเร็ว ได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า โดยอาศัยหลักการของ DNA replication เพื่อสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่จาก DNA ต้นแบบ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อช่วยขยายสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ให้ยาวขึ้น โดยเลือกจับเบสตัวใดตัวหนึ่ง ได้แก่ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สม เอนไซม์ที่ใช้ในการต่อสาย DNA นั้นจะต้องสามารถทนต่อความร้อนสูงได้กว่า 90 °C ในปฏิกิริยาของ PCR ที่มีการใช้อุณหภูมิสูง-ต่ำแตกต่างกันมาก

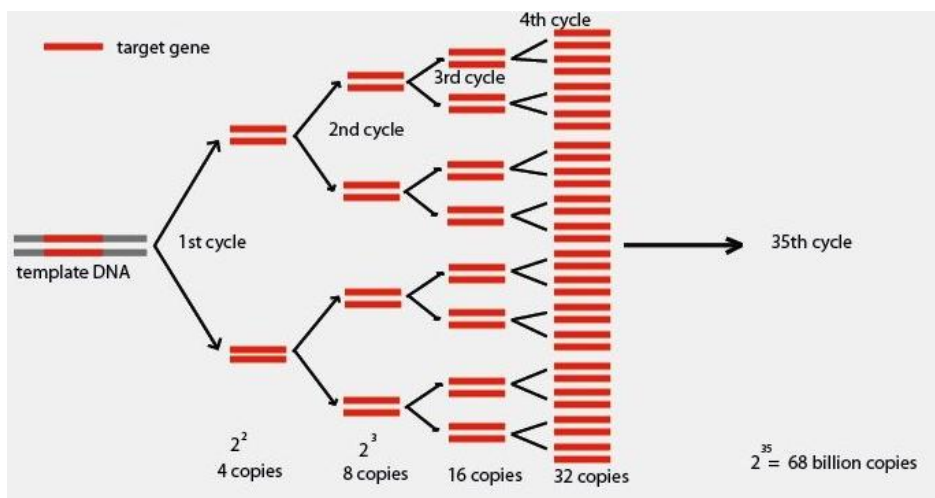
ส่วนประกอบต่างๆ ที่ต้องมีในการทำ PCR

1. DNA แม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มจำนวน
2. Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP
3. Oligonucleotide primer ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ DNA แม่แบบอย่างน้อย 1 คู่
4. เอนไซม์ DNA polymerase
5. Co-factor ของเอนไซม์ DNA polymerase ต่างๆ เช่น Mg^{2+}

หลักการ PCR

เทคนิค PCR จะสามารถสังเคราะห์สาย DNA ได้เพิ่มขึ้นครั้งละ 2 สาย โดยปฏิกิริยา PCR จะมี 3 ขั้นตอน วนซ้ำๆ กันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสาย DNA จากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของ primer และ DNA template โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 37-60 °C
3. Extension เป็นขั้นตอนการต่อสายยาวของ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของ primer อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 72-75 °C



รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนในการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR

แหล่งที่มา: (<http://www.paulvanouse.com/dwpcr.html>) สืบค้น ณ วันที่ 14 มิถุนายน 2558

Semi-nested polymerase chain reaction (Semi-nested PCR)

เป็นการพัฒนาเทคนิคการทำ PCR เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ผลจากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการทำ PCR 2 ครั้ง ซึ่งการทำ PCR ครั้งที่ 1 ใช้ primer คู่แรกคัดเลือกบริเวณยีนที่สนใจ จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำ PCR ครั้งที่ 1 มาทำ PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้ primer ใหม่ร่วมกับ primer เดิม ซึ่งอาจจะเป็น forward primer หรือ reverse primer เดิมก็ได้ เพื่อคัดเลือกยีนบริเวณเดิม ทำให้มีความถูกต้องและแม่นยำสูงชันกว่าเทคนิค PCR ทั่วไป

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Cross-sectional study) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB No. 491/57

ประชากรที่ศึกษา

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจาก 2 กลุ่มตัวอย่าง คือ

1.1 อุจจาระ (stool) จากผู้ป่วยเด็กซึ่งป่วยด้วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยคือ 4.8 ปี โดยเป็นตัวอย่างอุจจาระแช่แข็งที่เหลือจากโครงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัส กลุ่มตัวอย่างมาจากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 1,003 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 291 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 1,294 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมกราคม ปี 2010 ถึงเดือนตุลาคม ปี 2014 โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกเก็บในรูปแบบนิรนามเพื่อปกป้องสิทธิของผู้ป่วย

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันเป็นผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ อาเจียน และอาจมีไข้ร่วมด้วย

1.2 อุจจาระ (stool) หรือ rectal swab ของกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก และโรค Herpangina ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่มีอาการในระบบทางเดินอาหาร อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยคือ 3.4 ปี โดยเป็นตัวอย่างที่เข้ามารับการบริการในโรงพยาบาลเพื่อตรวจหาเชื้อเอนเทอโรไวรัส ตัวอย่างถูกเก็บตั้งแต่เดือนมกราคม ปี 2012 จนถึงเดือนตุลาคม ปี 2014 เป็น stool จำนวน 145 ตัวอย่าง และ rectal swab จำนวน 446 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 591 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่เก็บนั้นมาจากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 158 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลต่างๆ ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร เช่น โรงพยาบาลบีเอ็นเอช กรุงเทพ โรงพยาบาลหัวเฉียว

โรงพยาบาลบางปะกอก 9 โรงพยาบาลธนบุรี 2 โรงพยาบาลพระราม 9 โรงพยาบาลสมิติเวชศรีนครินทร์ โรงพยาบาลสมิติเวช สุขุมวิท โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลเวชธานี และโรงพยาบาลบำรุงราษฎร์ รวม 433 ตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมือเท้าปากเป็นผู้ป่วยที่มีอาการไข้ เป็นแผลในปาก มีตุ่มน้ำใสตามฝ่ามือ ฝ่าเท้า และลำตัว ส่วนผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค Herpangina มักมีไข้สูง มีผื่นขึ้น เป็นแผลตื้นๆ ในช่องปากเท่านั้น และไม่พบผื่นบริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้า

2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างคำนวณจากสมการ Cochran's samples size formula

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

โดยที่ n คือ จำนวนตัวอย่าง

Z คือ ค่า alpha ที่ระดับความเชื่อถือที่ 95 เปอร์เซนต์ ดังนั้นเท่ากับ 1.96

p คือ อัตราความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสของตัวอย่างอุจจาระในการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 10 โดยเฉลี่ย (1)

q คือ 1-p

d คือ ค่าความผิดพลาด เท่ากับ 0.05

เมื่อแทนค่าต่างๆ ในสมการแล้วจะได้จำนวนตัวอย่างอุจจาระเท่ากับ 139 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่เป็นตัวแทนที่เหมาะสมกับการศึกษาครั้งนี้

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGen, USA)
- 1.2 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml (Pyrex, USA)
- 1.3 Flask: 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.4 Cuvett: 5 µl, 10 µl (MiralBio, Japan)

- 1.5 Parafilm (American Nation Can, USA)
- 1.6 Cylinder: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.7 Pipet tip: 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (AxyGen, USA)
- 1.8 Stirring-magnetic bar
- 1.9 Plastic wrap
- 1.10 Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- 1.11 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.12 Polypropylene conical tube: 15 ml, 50 ml (Elkay, Ireland)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- 2.2 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.3 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.4 Freezer -20 °C (Sanyo, Japan)
- 2.5 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.6 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- 2.7 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.8 PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)
- 2.9 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.10 UV transilluminator (Fotodyne, USA)
- 2.11 Autoclave (Sanyo Japan)
- 2.12 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 2.13 Incubator (Mettmert, Germany)
- 2.14 Water purification equipment (Water pro Ps, USA)
- 2.15 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- 2.16 Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.17 LightCycler® 480 (Roche, Germany)
- 2.18 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.19 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.20 Automatic adjustable micropipette: P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P200 (20-200 μ l), P1000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)

- 2.21 Refrigerator 4 °C (Mitsubishi, Japan)
- 2.22 Freezer -70 °C (Forma Scientific, USA)

3. สารเคมีที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง

- 3.1 Polypropylene conical tube: 15 ml (AxyGen® Scientific)
- 3.2 Phosphate buffer saline (BIO BASIC INC., NY, USA)
- 3.3 Dry cotton or polyester swab
- 3.4 Antibiotic: Penicillin-Streptomycin 10,000 units/ml (GIBCO., CA, USA)

4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัด RNA (RNA extraction)

- 4.1 Chloroform (Sigma, MO, USA)
- 4.2 Sodium acetate (Sigma, Singapore)
- 4.3 Phenol (Amresco, OH, USA)
- 4.4 Glycogen (USB, Ohio, USA)
- 4.5 Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 4.6 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)
- 4.7 Isoamyl alcohol (BDH, UK)
- 4.8 Proteinase K (5PRIME, Germany)
- 4.9 Isopropanal (Sigma, Singapore)
- 4.10 Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Ribospin™ vRD II, Korea)

5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียม cDNA template โดยการทำ Reverse transcription

- 5.1 RNase inhibit (Promega, USA)
- 5.2 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, USA)
- 5.3 5x MMLV buffer (Promega, USA)
- 5.4 Random hexamer (Promega, USA)
- 5.5 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR

- 6.1 cDNA template
- 6.2 Distill water (DW)
- 6.3 5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)
- 6.4 $MgCl_2$
- 6.5 Forward primer (F)
- 6.6 Reverse primer (R)

7. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis

- 7.1 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
- 7.2 Agarose molecular grade (Reserch Organics, OH, USA)
- 7.3 GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)
- 7.4 1xTris borate buffer (1xTBE)

8. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

HiYield™ Gel/PCR DNA fragment extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan)

9. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ cloning

- 9.1 Yeast Extract (GIBCO, NY, USA)
- 9.2 Agar Bacteriological (GIBCO, NY, USA)
- 9.3 IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendorf, Germany)
- 9.4 FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)
- 9.5 pGEM-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)
- 9.6 X-Gal (Promega, CA, USA)
- 9.7 Tryptone powder (BIO BASIC INC., NY, USA)
- 9.8 One Shot TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen, NY, USA)

10. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดพลาสมิด

HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan)

11. โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

11.1 Chromas Lite (version 2.01)

11.2 Seqman™ II (version 6.0)

11.3 BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.4.1)

11.4 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 5.05)

11.5 OLIGOS primer design software (version 9.1)

11.6 IBM SPSS Statistics (version 22)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

Stool sample

อุจจาระของผู้ป่วยถูกเก็บใส่ภาชนะมีฝาปิดที่สะอาดปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube ที่มีสารละลาย PBS เพื่อทำการสกัดสารพันธุกรรมต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บรักษาไว้ที่ -70 °C

2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส

ตัวอย่างที่ได้ถูกนำมาทำการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Ribospin™ vRD II, Korea) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 เติม NVL buffer 300 µl และ carrier RNA 7 µl ใส่ใน 1.5 microcentrifuge tube

2.2 แบ่งตัวอย่าง (Stool sample) ปริมาตร 100 µl ใส่ลงไป แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.3 ใส่ RB1 buffer 350 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

2.4 แบ่งส่วนผสมปริมาตร 750 µl ใส่ลงไปใน spin column จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง

- 2.5 เติม RBW buffer 500 μ l จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- 2.6 เติม RNW buffer 500 μ l จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- 2.7 ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 12,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ column แห้ง
- 2.8 ย้าย column ใส่ลงใน 1.5 microcentrifuge tube อันใหม่จากนั้นเติม nuclease-free water ปริมาตร 25-50 μ l แล้วบ่มไว้ 1 นาที
- 2.9 ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 12,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้าง RNA จาก column ลงไปใน microcentrifuge tube

3. การทำ Reverse transcription

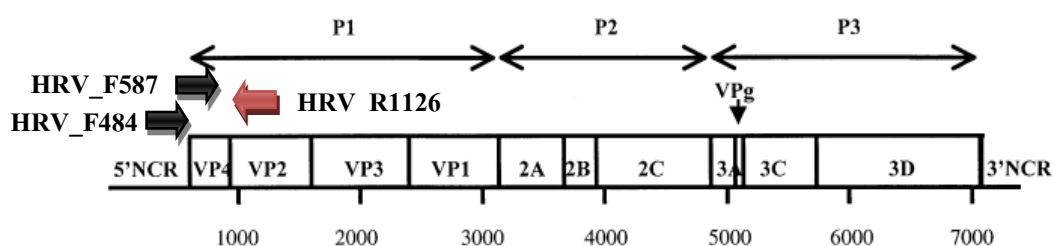
นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) โดยวิธี Reverse transcription ด้วย Improm II (Promega, Madison, WI, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

- 3.1 เติม Random mix 6 μ l แล้วเติม RNA ที่สกัดได้ 5 μ l
- 3.2 นำไป heat ที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป chill ice อีกเป็นเวลา 5 นาที
- 3.3 เติม Improm II 15 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
- 3.4 บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป heat activate ที่ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที
- 3.5 นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. การตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้ออิวแมนโรโนไวรัสด้วยวิธี Semi-Nested PCR ในบริเวณยีน VP4/VP2

นำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี semi-nested Polymerase Chain Reaction (semi-nested PCR) ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณส่วนปลายของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 โดยใช้ไพรเมอร์ HRV_F484 (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 451-470) และ HRV_R1126 (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1061-1081) ในการทำ PCR รอบที่ 1 และไพรเมอร์ HRV_F587 (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 544-565) และ HRV_R1126 ในการทำ PCR รอบที่ 2 ดังแสดง

ในตารางที่ 4 โดยตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจาก HRV-35 (accession number FJ445187) สำหรับขนาดโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ของ PCR1 มีขนาดประมาณ 631 นิวคลีโอไทด์ และขนาดโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ของ PCR2 มีขนาดประมาณ 538 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเข้ากระบวนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสต่อไป สำหรับรายละเอียดของปริมาณสาร และ Thermal profile สำหรับการทำให้ PCR มีรายละเอียดดังตารางที่ 2,3 และ 5



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ semi-nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ในส่วน 5'UTR และส่วนต้นของยีน VP2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 เพื่อตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจากตัวอย่าง

สารเคมีที่ใช้		ปริมาตร
PCR 1 st	PCR 2 nd	(μ l)
RNase free water	RNase free water	6
2.5 X Master Mix (5 primes)	2.5 X Master Mix (5 primes)	5
Primer forward 10 μ M (HRV_F484)	Primer forward 10 μ M (HRV_F587)	0.25
Primer reverse 10 μ M (HRV_R1126)	Primer reverse 10 μ M (HRV_R1126)	0.25
cDNA template	1 st round PCR product	2
Total		13.5

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อส่งวิเคราะห์ผล sequencing

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร (μl)
RNase free water	12
2.5 X Master Mix (5 primes)	10
Primer forward 10 μM (HRV_F587)	0.5
Primer reverse 10 μM (HRV_R1126)	0.5
1 st round PCR product	2
Total	25

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

Primer name	Sequence (5' → 3')
HRV_F484	CGG CCC CTG AAT GYG GCT AA
HRV_F587	CTA CTT TGG GTG TCC GTG TTT C
HRV_R1126	ATC HGG HAR YTT CCA MCA CCA

หมายเหตุ: Primer ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในงานวิจัยครั้งนี้เป็น Primer ที่ออกแบบโดย ดร. ปิยดา หลินศุวนนท์ ที่ใช้ตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเมื่อปี 2009 (37)

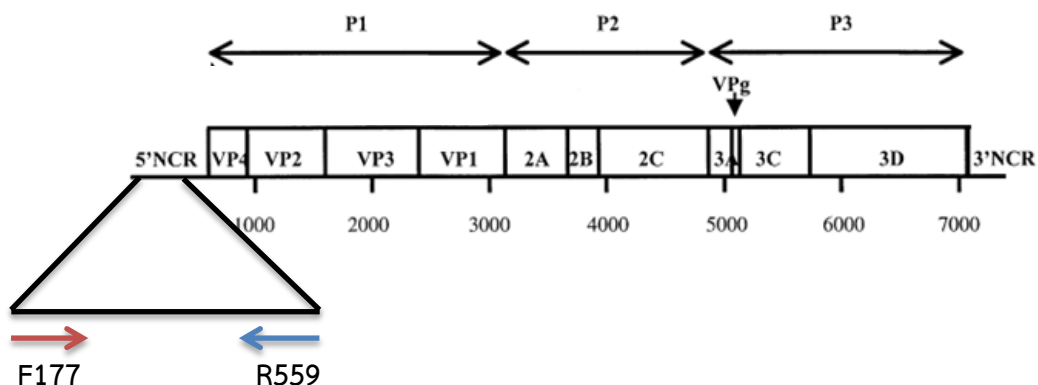
Y=C/T, H= A/C/T, R=A/G, M=A/C

ตารางที่ 5 แสดง Thermal profile ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

PCR Cycle	PCR รอบที่ 1			PCR รอบที่ 2		
	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน
	(C°)		รอบ	(C°)		รอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40	94	30 วินาที	} 40
Annealing	55	30 วินาที				
Extension	72	1 นาที				
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1
Hold	25	5 นาที	1	25	5 นาที	1

5. การเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสด้วยวิธี PCR ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไปเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 5'UTR ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนปลายของ 5'UTR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ RV-OL 26 (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 177-192) ที่จำเพาะกับส่วนต้นของ 5'UTR และ RV-OL 27 (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 545-559) ที่จำเพาะกับส่วนปลายของ 5'UTR ในการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 7 สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 383 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเข้ากระบวนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสต่อไป สำหรับรายละเอียดของปริมาณสาร และ Thermal profile สำหรับการทำให้ PCR มีรายละเอียดดังตารางที่ 6 และ 8



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้ออีเวนไนโรไวรัสในส่วน 5'UTR ของจีโนม

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร (μl)
RNase free water	12
2.5 X Master Mix (5 primes)	10
Primer forward 10 μM (RV-OL 26)	0.5
Primer reverse 10 μM (RV-OL 27)	0.5
cDNA template	2
Total	25

ตารางที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม

Primer name	Sequence (5' → 3')
RV-OL 26	GCACTTCTGTTTCCCC
RV-OL 27	AGGACACCCAAAGTA

หมายเหตุ: Primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ในงานวิจัยครั้งนี้เป็น Primer ที่ออกแบบโดย Kim และคณะเมื่อปี 2013 (60)

ตารางที่ 8 แสดง Thermal profile ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	20 วินาที	} 40
Annealing	52	40 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1
Hold	25	5 นาที	1

6. การเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างที่เกิด recombination ด้วยวิธี semi-nested PCR ในบริเวณส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2

นำตัวอย่างที่มีการจัดกลุ่มแตกต่างกันใน phylogenetic tree ระหว่าง 5'UTR ของจีโนม และยีน VP4/VP2 ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส เพื่อดูการเกิด recombination ระหว่างบริเวณทั้ง 2 มาเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ด้วยวิธี semi-nested PCR ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมบริเวณส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ใช้ไพรเมอร์ PanEV_5'_F10 และ HRV_R1126 ในการทำ PCR รอบที่ 1 และไพรเมอร์ RV-OL 26 และ HRV_R1126 ในการทำ PCR รอบที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 10 สำหรับขนาดโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ PCR สุดท้าย มีขนาดประมาณ 905 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเข้ากระบวนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปวิเคราะห์การเกิด recombination ต่อไป สำหรับรายละเอียดของปริมาณสาร และ Thermal profile สำหรับการทำ PCR มีรายละเอียดดังตารางที่ 9 และ 11

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม

สารเคมีที่ใช้			
PCR 1 st	ปริมาณ (μl)	PCR 2 nd	ปริมาณ (μl)
RNase free water	6	RNase free water	12
2.5 X Master Mix (5 primes)	5	2.5 X Master Mix (5 primes)	10
Primer forward 10 μM (PanEV_5'_F10)	0.25	Primer forward 10 μM (RV-OL 26)	0.5
Primer reverse 10 μM (HRV_R1126)	0.25	Primer reverse 10 μM (HRV_R1126)	0.5
cDNA template	2	1 st round PCR product	2
Total	13.5	Total	25

ตารางที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม

Primer name	Sequence (5' → 3')
PanEV_5'_F10	CAGCYKTTGGGTTGTACC
RV-OL 26	GCACTTCTGTTTCCCC
HRV_R1126	ATCHGGHARYTTCCAMCACCA

ตารางที่ 11 แสดง Thermal profile ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม

PCR Cycle	PCR รอบที่ 1			PCR รอบที่ 2		
	อุณหภูมิ (C°)	เวลา	จำนวน รอบ	อุณหภูมิ (C°)	เวลา	จำนวน รอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1	94	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	45	94	45 วินาที	45
Annealing	52	45 วินาที				
Extension	72	1 นาที				
Final extension	72	7 นาที	1	72	7 นาที	1
Hold	25	5 นาที	1	25	5 นาที	1

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ถูกนำมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี gel electrophoresis ใน 2% agarose gel เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 15 นาที แล้วจึงนำไปตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการโดยเปรียบเทียบกับ 100 bp ladder DNA (DNA marker) ผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transluminator) ต่อไป

7. การสกัดแยก PCR product ให้บริสุทธิ์

หลังจากทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยดูผ่านแสง UV จากนั้นตัด gel ในส่วนที่มีแถบของ DNA ที่ต้องการ และทำให้บริสุทธิ์โดยชุด GeneAll Gel/PCR DNA fragment extraction kit (GeneAll Biotechnology, Korea) โดยมีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้

- 7.1. เติมนสารละลาย GB buffer 500 μ l ลงใน microcentrifuge tube ที่มี gel อยู่ จากนั้น incubate ที่ 50 °C จนกว่า gel ละลาย
- 7.2. ดูด gel ที่ละลายทั้งหมดลงใน column filter แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

- 7.3. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม NW buffer (wash buffer) 700 μ l แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 7.4. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้น centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ column แห้ง
- 7.5. เปลี่ยน column filter ใส่ microcentrifuge tube จากนั้นเติม EB buffer (elution buffer) ประมาณ 40 μ l แล้วทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที
- 7.6. Centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้ว ตกกลงไปใน microcentrifuge tube จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์

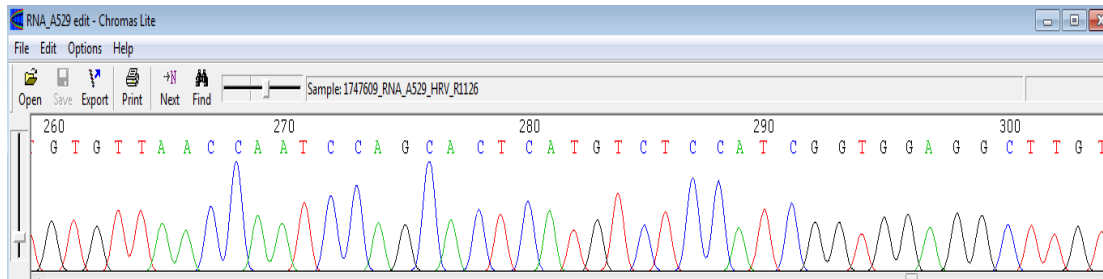
8. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จำนวน 5 μ l มาทำการวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า โดยวิธี gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อตรวจดูว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วจึงส่งไปทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ยังบริษัท First Base laboratories ประเทศมาเลเซีย ด้วยวิธีของ Sanger โดยใช้ไพรเมอร์ HRV_F587 และ HRV_R1126 เป็น sequencing primer แล้วจึงทำการอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite เพื่อทำการตรวจสอบและแก้ไขผลที่ได้ต่อไป

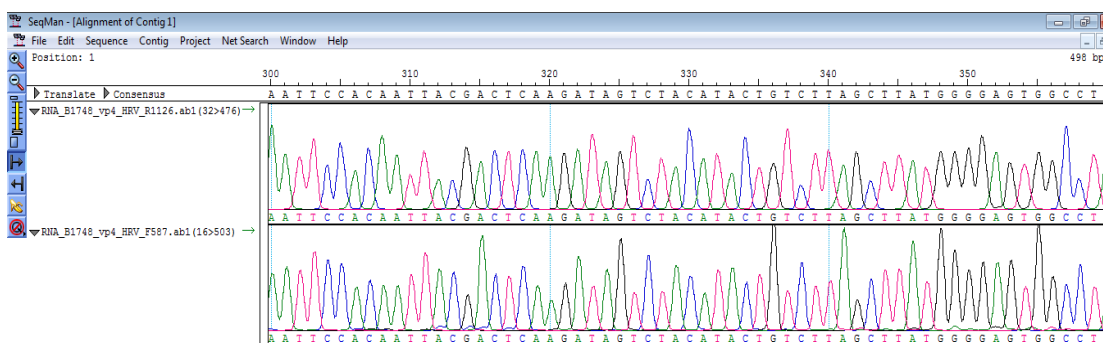
9. การวิเคราะห์ข้อมูล

9.1 การตรวจสอบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing ถูกนำมาวิเคราะห์รูปแบบของยีน (genotype) โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) แล้วจึงทำการอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite (version 2.01) เพื่อแปลผล chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป โดยใช้ SeqmanTM II (version 6.0) ในการตรวจสอบและแก้ไขผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งนี้ยังใช้เชื่อมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Forward และ Reverse ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสให้เข้าด้วยกัน



รูปที่ 9 แสดงผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite



รูปที่ 10 แสดงผลการใช้โปรแกรม Seqman™ II ในการตรวจสอบและแก้ไขผลของลำดับนิวคลีโอไทด์

9.2 การทำ phylogenetic analysis ในบริเวณยีน VP4/VP2 และ 5'UTR ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1) และ Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 5.05) โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน VP4/VP2 และ 5'UTR ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสทุกสายพันธุ์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank database เพื่อจำแนกว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่ทำการศึกษาลงอยู่ในสายพันธุ์ใด และมีรูปแบบของวิวัฒนาการเป็นอย่างไร โดยการศึกษาที่กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์คือ Neighbor-joining method มีค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

9.3 การวิเคราะห์แนวโน้มในการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

ในการวิเคราะห์โอกาสในการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 2 โปรแกรม คือ

9.3.1 Recombination Detection Program 4 (RDP4) version 4.46 เป็นโปรแกรมที่ใช้ทำนายการเกิด recombination ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจ รวมถึงบอกค่า p -value ในการเกิด recombination ของแต่ละโปรแกรมย่อยใน RDP4 ด้วย โปรแกรม RDP4 ประกอบด้วย 6 โปรแกรมย่อย ได้แก่ RDP, Bootscan, Maximum X2, Chimaera, SiScan และ 3Seq ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้โปรแกรม Bootscan โดยกำหนดให้ parameter ของโปรแกรม Bootscan มีค่าดังนี้ window size เท่ากับ 200, step size เท่ากับ 20, bootstrap replicate เท่ากับ 100 และใช้ pairwise distance

9.3.2 Similarity plot เป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจเปรียบเทียบกับ reference strain โดยแสดงผลออกมาในรูปแบบของกราฟ และแสดงค่า %similarity โปรแกรมนี้สามารถใช้ทำนายการเกิด recombination ได้เช่นเดียวกัน

10. การรวบรวมข้อมูล

สำหรับการรวบรวมข้อมูลผลการวิจัยทั้งหมด ผู้วิจัยได้บันทึกข้อมูลของผู้ป่วย ขั้นตอนการทำวิจัยทุกขั้นตอน และผลการทำวิจัย โดยบันทึกข้อมูลลง Data sheet เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไปและทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัสที่จำแนกได้ลงในคอมพิวเตอร์ โดยเก็บเป็น file ซึ่งมีผลจากการวิเคราะห์ sequencing

บทที่ 4

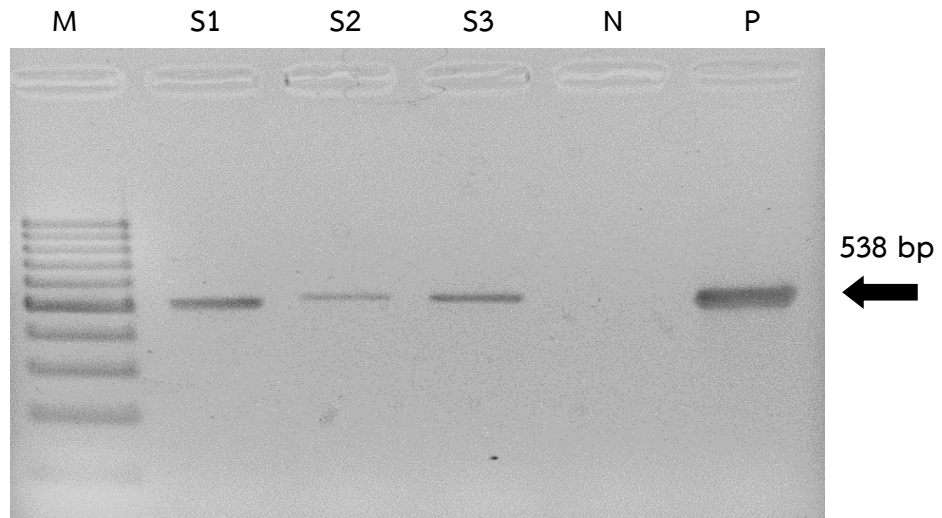
ผลการทดลอง

- ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาระบาดวิทยาและการจัดจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระในประเทศไทย

1. ผลการวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสด้วยวิธี semi-nested PCR ในส่วนของยีน VP4/VP2

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วย 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ตั้งแต่ปี 2010-2014 โดยตัวอย่างมาจากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวนทั้งสิ้น 1,294 ตัวอย่าง กลุ่มที่สองเป็นอุจจาระและ rectal swab ของผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก หรือโรค Herpangina ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่มีอาการในระบบทางเดินอาหาร ตั้งแต่ปี 2012-2014 จำนวนทั้งสิ้น 591 ตัวอย่าง กลุ่มตัวอย่างมาจากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และโรงพยาบาลต่างๆ ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร การตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสใช้วิธี semi-nested PCR ในบริเวณส่วนปลายของ 5'UTR จนถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 ที่สมบูรณ์ การทำ PCR รอบที่ 1 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 631 bp และในการทำ PCR รอบที่ 2 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 538 bp

พบว่าในกลุ่มตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจำนวน 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 1,294 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.32 โดยจำแนกออกไปตามจังหวัด ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.4) และจังหวัดขอนแก่น 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.6) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค Herpangina ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจำนวน 5 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 591 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.85 ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสทั้ง 5 ตัวอย่างในกลุ่มนี้มาจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร (ร้อยละ 1.2)



รูปที่ 11 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 538 bp ที่ได้จากการทำ semi-nested PCR ในการตรวจหาเชื้ออหิวมาโนไวรัส โดยที่ M แทน marker, S1, S2 และ S3 แทนตัวอย่างที่ให้ผลบวก, P แทน Positive control และ N แทน Negative control

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

	Stool samples from acute gastroenteritis (n=1,294)				Stool samples from hand-foot-mouth disease or herpangina (n=591)				
	no. of samples (%)	HRV-A (n=14)	HRV-B (n=5)	HRV positive (n=11)	Total (n=30), no. (%)	HRV-A (n=1)	HRV-B (n=1)	HRV-C (n=3)	Total (n=5), no. (%)
Sex									
Male	781 (60.4)	9	5	11	25 (83)	1	1	0	2 (40)
Female	509 (39.3)	5	0	0	5 (17)	0	0	3	3 (60)
NA	4 (0.3)	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0 (0)
Age (years)									
0-<2	899 (69.5)	12	5	9	26 (87)	0	0	3	3 (60)
2-<5	181 (14)	0	0	2	2 (6.7)	0	1	0	1 (20)
5-<15	40 (3.1)	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0 (0)
≥15	84 (6.5)	1	0	0	1 (3.3)	0	0	0	0 (0)
NA	90 (7)	1	0	0	1 (3.3)	1	0	0	1 (20)
Mean (SD)	4.8 (13.5)	5.7 (17.2)	0.9 (0.74)	1.2 (1.1)	3.1 (12)	NA	2 (NA)	1.2 (0.4)	1.4 (0.5)
Seasonal distribute									
Summer (Feb-Apr)	451 (34.9)	5	4	4	13 (43)	0	0	1	1 (20)
Rainy (May-Oct)	492 (38)	5	0	3	8 (27)	1	1	2	4 (80)
Winter (Nov-Jan)	351 (27.1)	4	1	4	9 (30)	0	0	0	0 (0)

หมายเหตุ: NA = Not Available

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

Characteristic	Acute gastroenteritis (n=1,294)		Hand-foot-mouth disease and herpangina (n=591)	
	No. specimens	Positive HRV (%)	No. specimens	Positive HRV (%)
จังหวัด				
กรุงเทพมหานคร, n (%)	291 (22.5)	4 (1.4)	433 (73.3)	5 (1.2)
ขอนแก่น, n (%)	1003 (77.5)	26 (2.6)	158 (26.7)	0

2. ผลการวิเคราะห์อายุและเพศของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

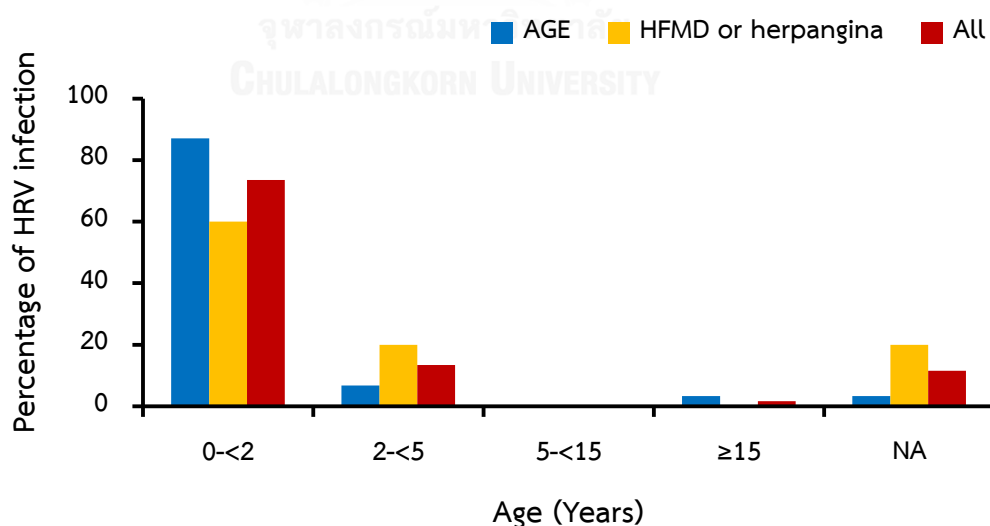
ตัวอย่างอุจจาระที่มาจากกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันมีอายุตั้งแต่ 1 วันถึง 97 ปี อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยคือ 4.8 ปี (median=1, SD=13.5) อัตราส่วนของเพศชายต่อเพศหญิงในกลุ่มตัวอย่างนี้เท่ากับ 1.5:1 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสพบมากที่สุดเป็นผู้ป่วยช่วงอายุ 0-2 ปี คือร้อยละ 87 (26/30) รองลงมาคือ ช่วงอายุ 2-5 ปี ร้อยละ 6.7 (2/30) และอายุมากกว่า 15 ปี ร้อยละ 3.3 (1/30) ตามลำดับ โดยอายุเฉลี่ยของผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้คือ 3.1 ปี (min=11 วัน, max=63 ปี, SD=12, mode=1.3, median=0.8) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส พบว่าเป็นเพศชายร้อยละ 83 (25/30) และเพศหญิงร้อยละ 17 (5/30) คิดเป็นอัตราส่วนของเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 5:1 จากการคำนวณทางสถิติพบว่าการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวอย่างอุจจาระที่มาจากกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค Herpangina มีอายุตั้งแต่ 1 วันถึง 39 ปี อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยคือ 3.4 ปี (median=2.4, SD=4.1) อัตราส่วนของเพศชายต่อเพศหญิงในกลุ่มตัวอย่างนี้เท่ากับ 1.2:1 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสพบมากที่สุดเป็นผู้ป่วยช่วงอายุ 0-2 ปี คล้ายกับในกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน โดยพบร้อยละ 60 (3/5) รองลงมาคือ ช่วงอายุ 2-5 ปี ร้อยละ 20 (1/5) อายุเฉลี่ยของผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้คือ 1.4 ปี (min=1 ปี, max=2 ปี, SD=0.5, mode=1, median=1.3) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโน

ไวรัส พบว่าเป็นเพศชายร้อยละ 40 (2/5) และเพศหญิงร้อยละ 60 (3/5) คิดเป็นอัตราส่วนของเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1:1.5

ตารางที่ 14 แสดงความชุกและช่วงอายุของผู้ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

	Total samples (n)	HRV positive samples (n)	HRV positive rate (%)
Acute gastroenteritis	1294	30	2.32
Hand-foot-mouth disease or herpangina	591	5	0.85
ช่วงอายุ (ปี)			
0-<2	1086	29	2.67
2-<5	428	3	0.7
5-<15	114	0	0
≥15	95	1	1.05
NA	162	2	1.23



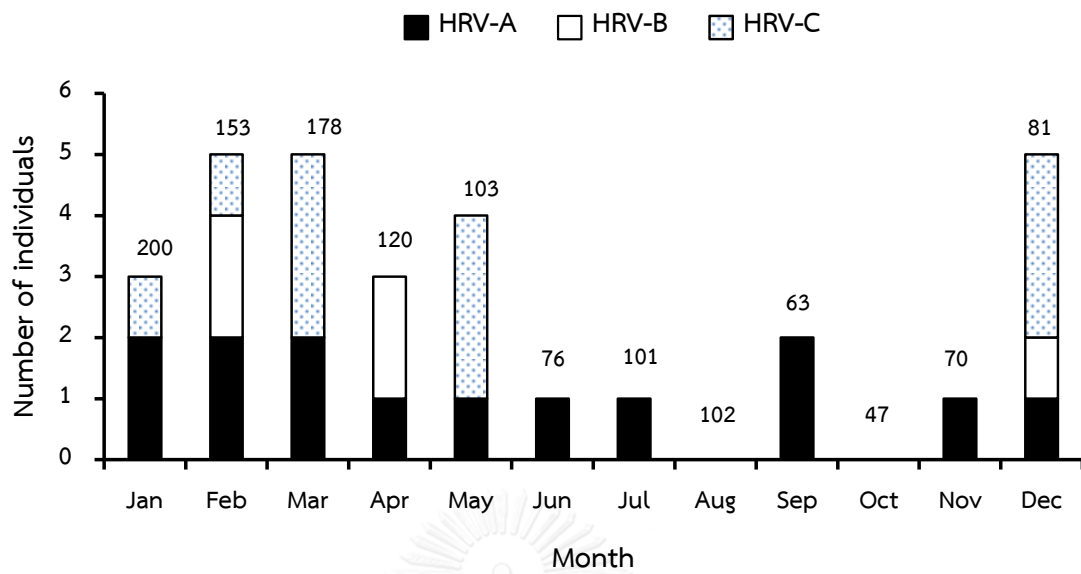
รูปที่ 12 กราฟแท่งแสดงช่วงอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระ

หมายเหตุ: AGE=Acute gastroenteritis, HFMD=Hand-foot-mouth disease

3. ผลการวิเคราะห์การระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสและความสัมพันธ์กับฤดูกาลรวมถึงปีที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

ฤดูกาลของประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 ฤดู คือ ฤดูร้อน (เดือนกุมภาพันธ์-เมษายน), ฤดูฝน (เดือนพฤษภาคม-ตุลาคม) และฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน-มกราคม) จากการศึกษาพบว่าเชื้อ ฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันพบได้มากที่สุดในฤดูร้อนร้อยละ 43 (13/30) รองลงมาคือ ฤดูหนาวร้อยละ 30 (9/30) และ ฤดูฝนร้อยละ 27 (8/30) เมื่อพิจารณาการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสแต่ละสายพันธุ์ พบว่า HRV-A เป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดมากที่สุดในกลุ่มนี้ โดยสามารถพบการระบาดได้ตลอดทั้งปี ยกเว้นเดือนสิงหาคมและตุลาคม ในขณะที่ HRV-C สามารถพบการระบาดได้ในเดือนมกราคม, กุมภาพันธ์, มีนาคม, พฤษภาคม และ ธันวาคม ส่วน HRV-B เป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดน้อยที่สุด โดยพบเพียง 3 เดือน คือเดือนกุมภาพันธ์, เมษายน และธันวาคม นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าตั้งแต่ช่วงเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายนไม่พบการระบาดของ HRV-C และ HRV-B พบแต่เพียง HRV-A เท่านั้น ดังรูปที่ 13 เมื่อพิจารณาความชุกในแต่ละเดือน พบว่าเดือนธันวาคมมีความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมากที่สุด คือร้อยละ 6.2 (5/81) ดังตารางที่ 15

ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค herpangina พบว่าตัวอย่างอุจจาระที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสส่วนใหญ่พบในฤดูฝน ร้อยละ 80 (4/5) รองลงมาคือฤดูร้อน ร้อยละ 20 (1/5) ส่วนฤดูหนาวไม่พบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในกลุ่มนี้พบได้ใน 4 เดือนเท่านั้น คือเดือนเมษายน, มิถุนายน, กรกฎาคม และสิงหาคม เมื่อพิจารณาความชุกในแต่ละเดือน พบว่าเดือนเมษายนพบความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมากที่สุด คือร้อยละ 12.5 (1/8) แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในกลุ่มนี้มีน้อยมาก จึงไม่สามารถนำมาศึกษาการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้



รูปที่ 13 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสต่อฤดูกาลในกลุ่มผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้ออักเสบเฉียบพลัน ตั้งแต่ปี 2010-2014 (จำนวนตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้ในแต่ละเดือนกำกับด้วยตัวเลขด้านบนของกราฟ)

ตารางที่ 15 แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในแต่ละเดือน

เดือน	กลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบ			กลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค		
	เฉียบพลัน			herpangina		
	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่ ให้ผลบวก	ความชุก ของ HRV	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่ ให้ผลบวก	ความชุก ของ HRV
มกราคม	200	3	1.5%	42	0	0%
กุมภาพันธ์	153	5	3.3%	15	0	0%
มีนาคม	178	5	2.8%	15	0	0%
เมษายน	120	3	2.5%	8	1	12.5%
พฤษภาคม	103	4	3.9%	7	0	0%
มิถุนายน	76	1	1.3%	75	1	1.3%
กรกฎาคม	101	1	1%	285	2	0.7%
สิงหาคม	102	0	0%	81	1	1.2%
กันยายน	63	2	3.2%	23	0	0%
ตุลาคม	47	0	0%	13	0	0%
พฤศจิกายน	70	1	1.4%	12	0	0%
ธันวาคม	81	5	6.2%	15	0	0%

อัตราการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเพิ่มขึ้น 3.9 เท่า จากปี 2010 จนถึงปี 2013 และอัตราการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสลดลงประมาณ 3 เท่าในปี 2014 ความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสคิดเป็นร้อยละในแต่ละปีตั้งแต่ช่วงปี 2010-2014 คือ ร้อยละ 1.1, 2.2, 2.7, 4.3 และ 1.4 ตามลำดับ

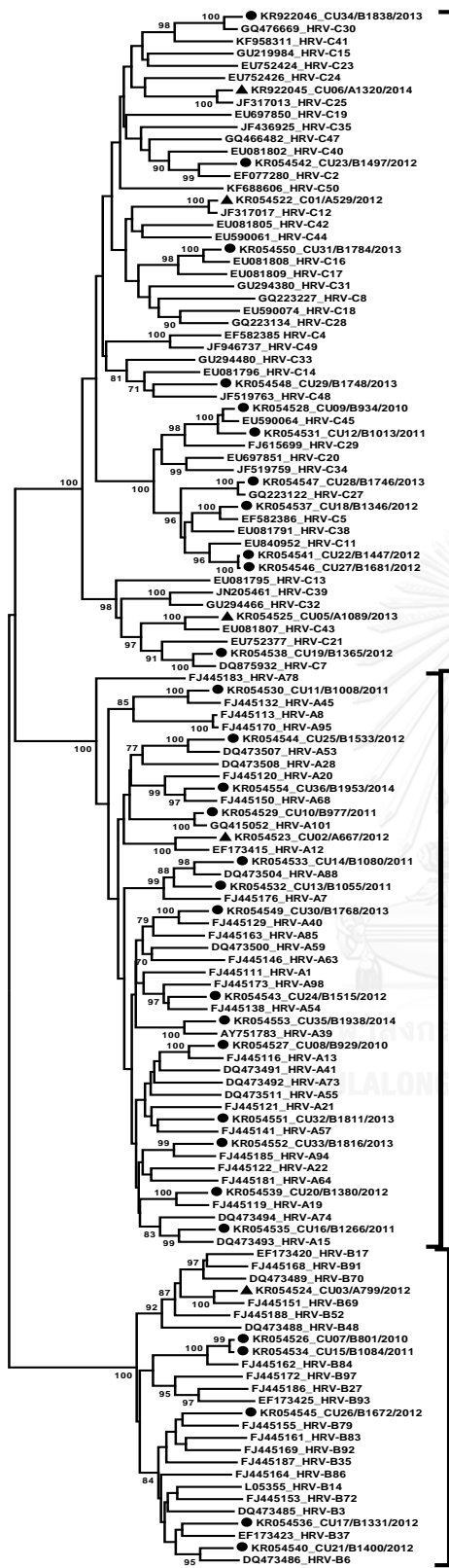
ในขณะที่อัตราการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค Herpangina เพิ่มขึ้นทุกปีจากปี 2012 จนถึงปี 2014 โดยความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสคิดเป็นร้อยละในแต่ละปีตั้งแต่ช่วงปี 2012-2014 คือ ร้อยละ 0.7, 1.1 และ 1.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 16 แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในแต่ละปีที่ทำการศึกษา

ปี	กลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน			กลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค herpangina		
	จำนวน ตัวอย่างทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ความชุกของ HRV	จำนวน ทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่ให้ผลบวก	ความชุกของ HRV
2010	268	3	1.1%	-	-	-
2011	315	7	2.2%	-	-	-
2012	403	11	2.7%	433	3	0.7%
2013	161	7	4.3%	93	1	1.1%
2014	147	2	1.4%	65	1	1.5%

4. ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree และการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

จากการนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไปทำ Direct sequencing แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Phylogenetic tree analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.05 วิธี Neighbor-Joining Method และใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสร้าง Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน VP4/VP2 ซึ่งเป็นยีนที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส เปรียบเทียบกับ reference strains ที่ได้จาก GenBank ทำให้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ HRV-A, HRV-B และ HRV-C ดังรูปที่ 14



● ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบ
เฉียบพลัน

▲ ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก
หรือโรค Herpangina

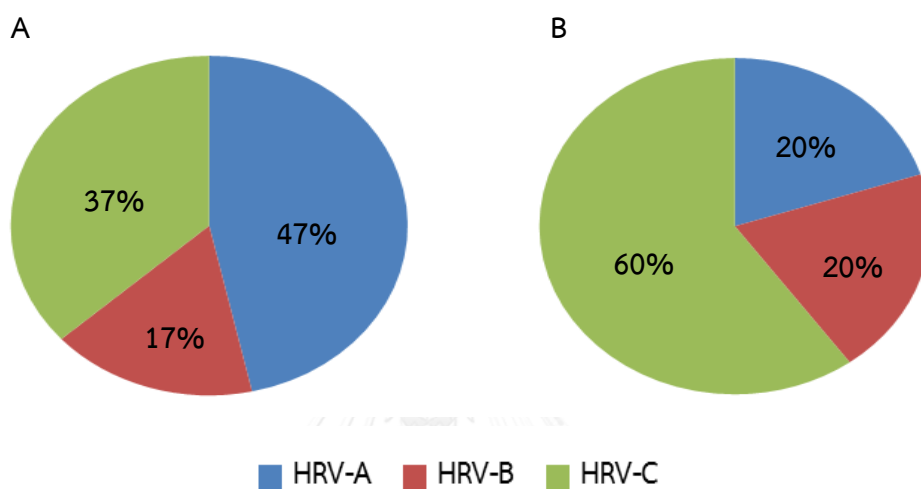
HRV-C

HRV-A

HRV-B

รูปที่ 14 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในส่วนของยีน VP4/VP2 ของตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับ reference strains

ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันพบว่า การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ HRV-A ร้อยละ 47 (14/30) รองลงมาคือ HRV-C ร้อยละ 37 (11/30) และสายพันธุ์ที่มีการติดเชื้อน้อยที่สุดคือ HRV-B ร้อยละ 17 (5/30) ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก และโรค Herpangina พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบมากที่สุดคือ HRV-C ร้อยละ 60 (3/5) ส่วน HRV-A และ HRV-B พบเพียงสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 20 เท่ากัน ดังรูปที่ 15A และรูปที่ 15B



รูปที่ 15 A แสดงสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระจากกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน

B แสดงสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระจากกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก และโรค Herpangina

จากการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจากการศึกษาครั้งนี้มีการกระจายอยู่ในแต่ละ type ที่ไม่ซ้ำกัน โดยพบทั้งหมด 31 types ที่แตกต่างกันใน 35 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส HRV-A พบ 14 types คือ A12, A13, A15, A19, A39, A40, A45, A53, A54, A57, A68, A88, A94 และ A101, HRV-B พบ 5 types คือ B6, B37, B69, B79 และ B84 ในขณะที่ HRV-C พบ 12 types คือ C2, C5, C7, C11, C12, C16, C25, C27, C30, C43, C45 และ C48 เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส A88, B84, C11 และ C45 พบ type ละ 2 ตัวอย่าง นอกนั้นพบ type ละ 1 ตัวอย่างเท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงสายพันธุ์และ strain ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระของกลุ่มผู้ป่วยโรค
ลำไส้อักเสบเฉียบพลันและอุจจาระของกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากหรือโรค Herpangina

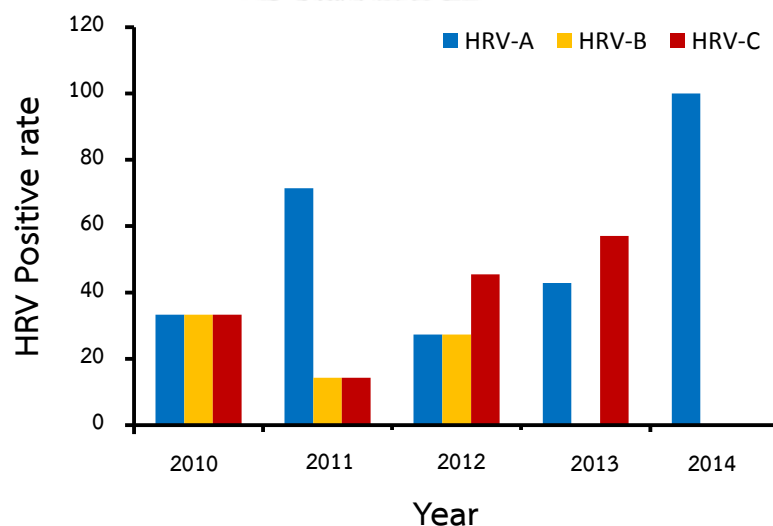
ผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน (n=30)			ผู้ป่วยโรคมือเท้าปาก หรือโรค Herpangina (n=5)								
HRV-A	HRV-B	HRV-C	HRV-A	HRV-B	HRV-C						
Strain no. (+)	Strain no. (+)	Strain no. (+)	Strain no. (+)	Strain no. (+)	Strain no. (+)						
HRV-A13	1	HRV-B6	1	HRV-C2	1	HRV-A12	1	HRV-B69	1	HRV-C12	1
HRV-A15	1	HRV-B37	1	HRV-C5	1					HRV-C25	1
HRV-A19	1	HRV-B79	1	HRV-C7	1					HRV-C43	1
HRV-A39	1	HRV-B84	2	HRV-C11	2						
HRV-A40	1			HRV-C16	1						
HRV-A45	1			HRV-C27	1						
HRV-A53	1			HRV-C30	1						
HRV-A54	1			HRV-C45	2						
HRV-A57	1			HRV-C48	1						
HRV-A68	1										
HRV-A88	2										
HRV-A94	1										
HRV-A101	1										
Total	14	5	11	1	1	3					

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ: (+) แทนจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

5. ผลการวิเคราะห์การกระจายของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้ อักเสบเฉียบพลันช่วงปี 2010-2014

สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบมีการกระจายในแต่ละปีไม่เท่ากัน โดยพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบได้ทุกปีที่ทำการศึกษาคือ HRV-A เมื่อพิจารณาแยกแต่ละปีพบว่า ในปี 2010 พบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์ในอัตราความชุกเท่ากันคือร้อยละ 33.3 ส่วนในปี 2011 พบ HRV-A (ร้อยละ 71.4) เด่นขึ้นมา โดยพบมากที่สุดเกินครึ่งหนึ่งของสายพันธุ์ทั้งหมด ในขณะที่ HRV-B และ HRV-C พบได้เท่ากัน คือร้อยละ 14.3 ส่วนในปี 2012 พบ HRV-C (ร้อยละ 45.5) เด่นขึ้นมามากที่สุด ในขณะที่พบ HRV-A ลดลงเกินครึ่งหนึ่งจากปีที่ผ่านมา และพบได้เท่ากับ HRV-B คือร้อยละ 27.3 ปี 2013 พบว่า HRV-B หายไป และพบ HRV-C (ร้อยละ 57.1) ได้มากกว่า HRV-A (ร้อยละ 42.9) และในปี 2014 ไม่พบ HRV-B และ HRV-C เลย พบเพียงแต่ HRV-A เท่านั้น



รูปที่ 16 แสดงการกระจายตัวของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันในช่วงปี 2010-2014

ตารางที่ 18 แสดงการกระจายตัวของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยในแต่ละปี

HRV specie	Positive of acute gastroenteritis (n=30)						Positive of hand-foot-mouth disease or herpangina (n=5)			
	2010	2011	2012	2013	2014	Total	2012	2013	2014	Total
HRV-A	1	5	3	3	2	14	1	0	0	1
HRV-B	1	1	3	0	0	5	1	0	0	1
HRV-C	1	1	5	4	0	11	1	1	1	3

6. ผลการวิเคราะห์การตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสร่วมกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันทั้ง 30 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารซึ่งได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ HRoV, HPeV, HBoV, HNoV และ HAdV พบว่าจากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง มี 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50 ที่มีการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสร่วม (co-infection) กับการตรวจพบเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่น จากการวิเคราะห์พบว่า 6 ตัวอย่างมีการตรวจพบเชื้อ HRV ร่วมกับไวรัสชนิดอื่นอีก 1 ชนิด, 8 ตัวอย่างมีการตรวจพบเชื้อ HRV ร่วมกับไวรัสชนิดอื่นอีก 2 ชนิด และ 1 ตัวอย่างมีการตรวจพบเชื้อ HRV ร่วมกับไวรัสชนิดอื่นอีก 3 ชนิด เชื้อ HRoV มีอัตราการติดเชื้อมาร่วมกับ HRV มากที่สุด คือร้อยละ 93 (14/15) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) รองลงมาคือ HPeV พบอัตราการติดเชื้อมาร่วมกับ HRV ร้อยละ 33 (5/15) ส่วน HBoV, HNoV และ HAdV พบอัตราการติดเชื้อมาร่วมกับ HRV เท่ากัน คือร้อยละ 13 (2/15) ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงอัตราการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วย

	HRV-A (n=14)	HRV-B (n=5)	HRV-C (n=11)	ผลรวม (n=30), no. (%)
ติดเชื้อ HRV เพียงชนิดเดียว	7	3	5	15 (50)
ติดเชื้อ HRV ร่วมกับไวรัสชนิดอื่น				
Human Rotavirus	6	2	6	14 (93)
Human Parechovirus	4	0	1	5 (33)
Human Bocavirus	1	0	1	2 (13)
Human Norovirus	2	0	0	2 (13)
Human Adenovirus	0	0	2	2 (13)

7. ผลการวิเคราะห์ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

จากการวิเคราะห์ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ซึ่งสามารถหาข้อมูลลักษณะอาการของผู้ป่วยได้ 20 คนจากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสทั้งหมด 30 คน พบว่าผู้ป่วยมีไข้เป็นส่วนใหญ่มากโดยพบร้อยละ 75 (15/20) นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจำนวน 13 คนใน 20 คน คิดเป็นร้อยละ 65 มีอาการในระบบทางเดินหายใจ และผู้ป่วย 7 คนที่เหลือมีการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารอย่างเดียว พบว่าผู้ป่วย 12 คนใน 20 คน คิดเป็นร้อยละ 60 มีการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารร่วมกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ในขณะที่มีผู้ป่วยเพียง 1 คนที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเพียงอย่างเดียว ผู้ป่วยที่มีอาการในระบบทางเดินหายใจ พบว่าร้อยละ 30 (6/20) เป็นปอดอักเสบ (Pneumonia), ร้อยละ 25 (5/20) มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (URTI symptoms) และร้อยละ 10 (2/10) เป็นหลอดลมอักเสบเฉียบพลัน (Acute bronchiolitis)

อุณหภูมิร่างกายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส HRV-A, HRV-B และ HRV-C ไม่มีความแตกต่างกันคือ 37.9 ± 0.6 , 37.5 ± 0.9 และ 37.5 ± 0.9 ตามลำดับ ระยะเวลาเฉลี่ยที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลคือ 3.8 ± 3.3 วัน แต่สังเกตเห็นได้ว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HRV-B มีระยะเวลาใน

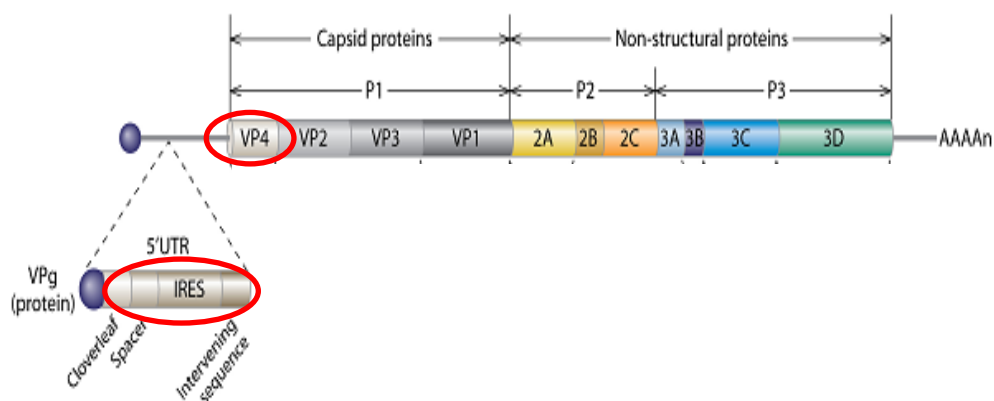
การเข้ารับรักษาในโรงพยาบาลนานกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสายพันธุ์อื่น ดังตารางที่ 20 นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งว่า ผู้ป่วย 9 คนที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสและไม่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วยมีอาการท้องเสียร่วมกับอาการในระบบทางเดินหายใจ ในขณะที่ 2 คนมีอาการท้องเสียเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 20 ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระ

อาการทางคลินิก	HRV-A (n=7)	HRV-B (n=5)	HRV-C (n=8)	Total (n=20)
อุณหภูมิร่างกาย (°C)	37.9 ± 0.6	37.5 ± 0.9	37.5 ± 0.9	37.7 ± 0.8
ผลการวินิจฉัยโรค , no. (%)				
Fever	6 (85.7)	4 (80)	5 (62.5)	15 (75)
URTI symptoms	0 (0)	2 (40)	3 (37.5)	5 (25)
Acute bronchiolitis	1 (14.3)	0 (0)	1 (12.5)	2 (10)
Pneumonia	3 (42.9)	1 (20)	2 (25)	6 (30)
Acute gastroenteritis	6 (85.7)	5 (100)	8 (100)	19 (95)
ระยะเวลาการเข้ารับการรักษา ในโรงพยาบาล	2.9 ± 1.8	6.8 ± 5	3.3 ± 3	3.8 ± 3.3

- ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม

1. ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบ phylogenetic tree บริเวณ 5'UTR และยีน VP4/VP2

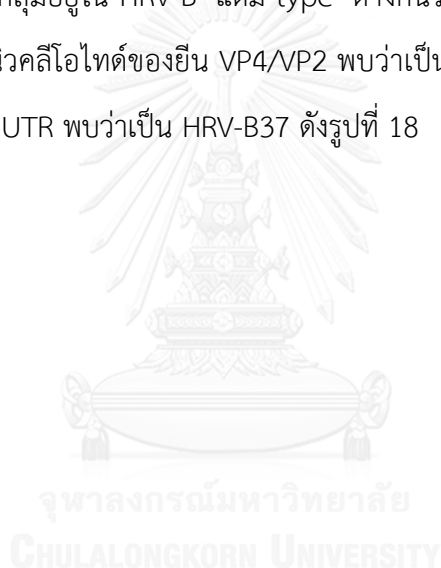


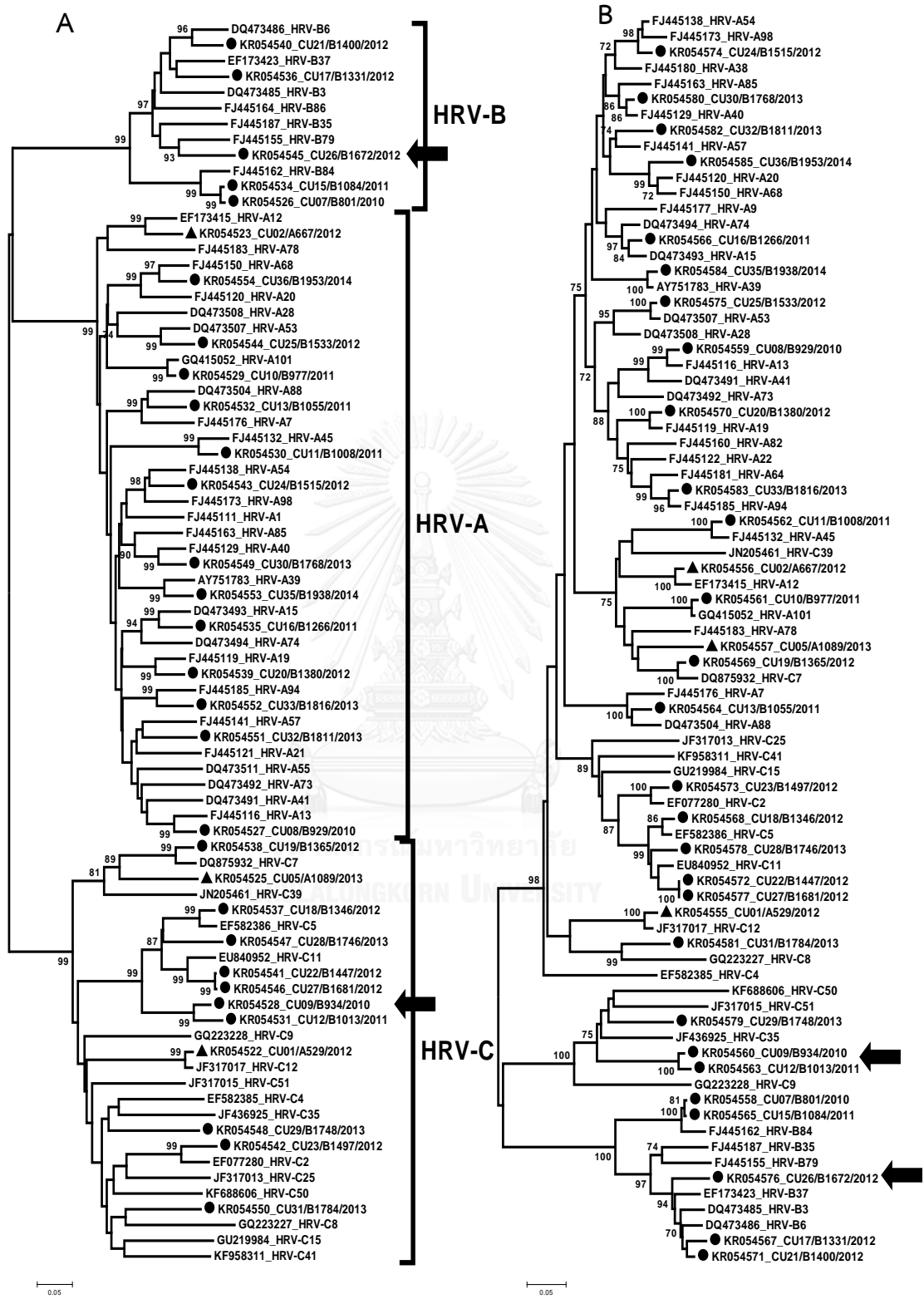
รูปที่ 17 แสดงจีโนมบริเวณ 5'UTR และยีน VP4/VP2 (23)

จากการนำตัวอย่างทั้งหมด 35 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมาทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ในบริเวณส่วนต้นจนถึงส่วนปลายของ 5'UTR ของจีโนม โดยให้ผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 383 bp พบว่ามี 31 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR ได้ จากนั้นจึงนำไปทำ Direct sequencing แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.05 วิธี Neighbor-Joining Method และใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1000

จากการนำ phylogenetic tree ในส่วนของยีน VP4/VP2 มาเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree ในส่วนของ 5'UTR พบว่า phylogenetic tree ของ 5'UTR มีรูปแบบการจัดกลุ่มของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสแตกต่างจาก phylogenetic tree ของยีน VP4/VP2 ในสายพันธุ์ของ HRV-C phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5'UTR แบ่ง HRV-C ออกเป็น 2 กลุ่มคือ HRV-Ca และ HRV-Cc โดย HRV-Ca มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5'UTR คล้ายกับ HRV-A และ HRV-Ca บางส่วนถูกจัดกลุ่มอยู่กับ HRV-A ใน phylogenetic tree ส่วน HRV-Cc มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5'UTR แยกออกไป

จากการเปรียบเทียบ phylogenetic tree ในส่วนของยีน VP4/VP2 และ 5'UTR ของจีโนม พบว่ามี 3 ตัวอย่างที่มาจากผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้ออักเสบเฉียบพลัน คิดเป็นร้อยละ 9.7 (3/31) ที่มีการจัดกลุ่มใน phylogenetic tree ของยีน VP4/VP2 และ 5'UTR ไม่สอดคล้องกัน โดยพบว่าตัวอย่าง B934 และ B1013 มีการเกิด recombination ภายใน HRV-C (intraspecies recombination of HRV-C) เนื่องจากทั้งสองตัวอย่างถูกจัดกลุ่มอยู่ใน HRV-C แต่มี type ต่างกันระหว่างยีน VP4/VP2 และ 5'UTR เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4/VP2 พบว่าเป็น HRV-C11 แต่เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5'UTR พบว่าเป็น HRV-C35 นอกจากนี้ยังพบว่ามี 1 ตัวอย่างคือ B1672 มีการเกิด recombination ภายใน HRV-B (intraspecies recombination of HRV-B) เนื่องจากตัวอย่งนี้ถูกจัดกลุ่มอยู่ใน HRV-B แต่มี type ต่างกันระหว่างยีน VP4/VP2 และ 5'UTR เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4/VP2 พบว่าเป็น HRV-B79 แต่เมื่อจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5'UTR พบว่าเป็น HRV-B37 ดังรูปที่ 18





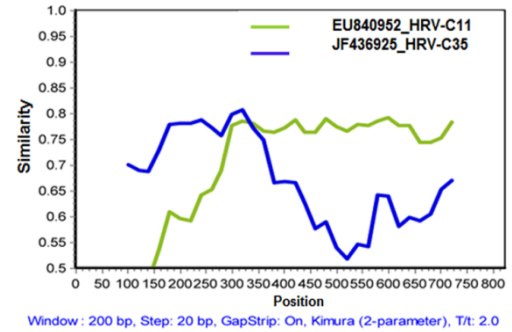
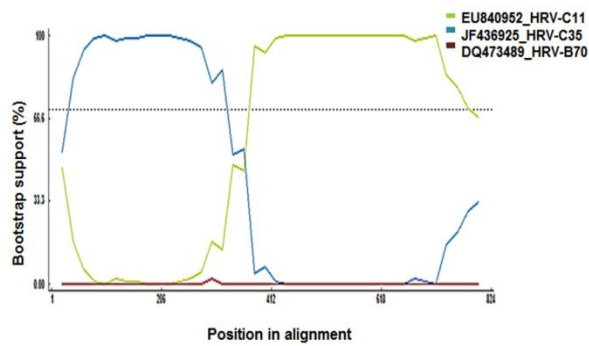
รูปที่ 18 Phylogenetic tree แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในส่วนของ ยีน VP4/VP2 (A) และ 5'UTR (B)

2. ผลการวิเคราะห์การเกิด recombination ภายใน 5'UTR ของจีโนมเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

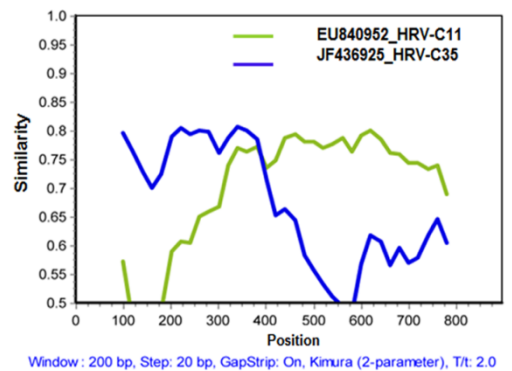
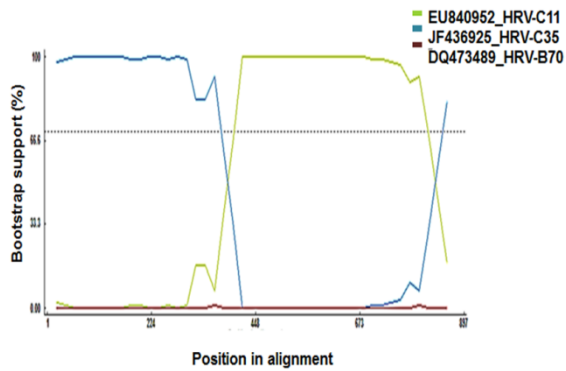
เพื่อยืนยันการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสภายใน 5'UTR ของจีโนม จึงได้นำทั้ง 3 ตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครอบคลุมส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนม โดยใช้วิธี semi-nested PCR ให้ผลิตภัณฑ์ PCR สุกท้ายประมาณ 905 bp จากนั้นนำไปทำ Direct sequencing แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมตั้งแต่ส่วนต้นของ 5'UTR ถึงส่วนต้นของยีน VP2 ของจีโนมไปวิเคราะห์การเกิด recombination โดยใช้โปรแกรม Bootscan และ Similarity plot เพื่อหาจุดตัดของ recombination

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bootscan และ Similarity plot พบว่ามีการเกิด recombination ภายในบริเวณ 5'UTR ของจีโนม โดยพบว่าตัวอย่าง B934 และ B1013 มีการเกิด recombination ภายใน HRV-C ระหว่าง HRV-C11 และ HRV-C35 มีจุดตัดของ recombination อยู่ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 573 และ 570 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอยู่ในบริเวณ polypyrimidine tract ของ IRES ส่วนตัวอย่าง B1672 พบว่ามีการเกิด recombination ภายใน HRV-B ระหว่าง HRV-B79 และ HRV-C37 มีจุดตัดของ recombination อยู่ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 606 โดยตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์นี้เป็นตำแหน่งที่ถูกนำไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HRV-B35 ซึ่งใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (accession number FJ445187) ดังรูปที่ 19

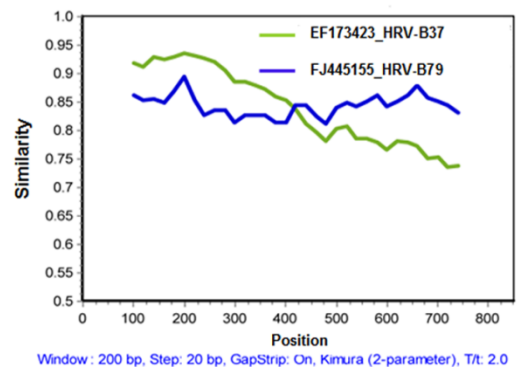
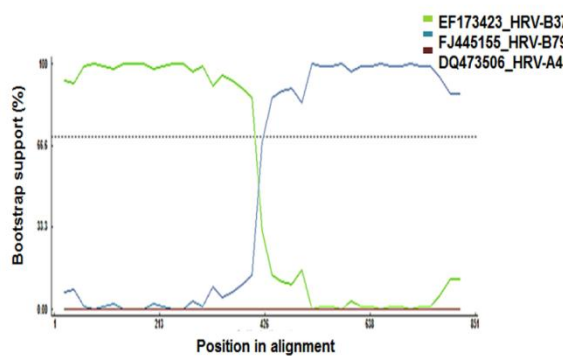
A



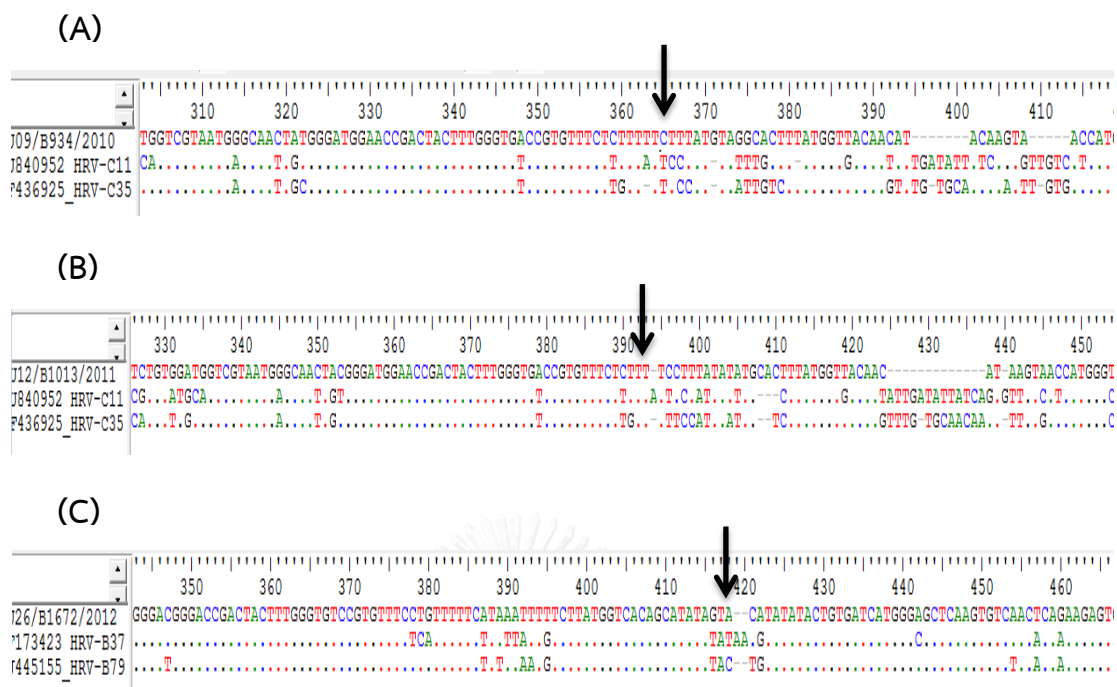
B



C



รูปที่ 19 แสดงผลการวิเคราะห์การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่าง B934 (A), B1013 (B) และ B1672 (C) โดยใช้โปรแกรม Bootscan (ซ้าย) และ โปรแกรม Similarity plot (ขวา)



รูปที่ 20 แสดงการ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่าง (A) B934, (B) B1013 และ (C) B1672 ที่มีการเกิด recombination กับ reference strain (บริเวณจุดตัดของ recombination ถูกระบุด้วยลูกศรสีดำ)

จากการวิเคราะห์การเกิด recombination ภายใน 5'UTR ของจีโนม โดยใช้ 6 วิธี ในโปรแกรม Recombination Detection Program ได้แก่ RDP, Geneconv, BootScan, MaxChi, Chimaera และ 3Seq พบว่ามีอย่างน้อย 5 วิธีที่ให้ค่า p -values น้อยกว่า 0.05 ดังตารางที่ 21 ซึ่งโดยทั่วไปแล้วต้องมีอย่างน้อย 3 วิธีที่ให้ค่า p -values น้อยกว่า 0.05 จึงยอมรับว่ามีการเกิด recombination

ตารางที่ 21 แสดงค่า *p*-values ของการเกิด recombination จาก 6 วิธีโปรแกรม RDP

Samples	5'UTR	VP4/VP2	<i>p</i> -value						Classification of recombination
			RDP	Geneconv	BootScan	MaxChi	Chimaera	3Seq	
CU09/B934/2010	HRV-C35	HRV-C11	3.228×10^{-3}	N/A	5.833×10^{-3}	2.131×10^{-6}	3.140×10^{-3}	2.335×10^{-4}	Intraspecies
CU12/B1013/2011	HRV-C35	HRV-C11	3.922×10^{-4}	N/A	1.559×10^{-3}	5.368×10^{-5}	2.690×10^{-2}	8.321×10^{-8}	recombination of HRV-C
CU26/B1672/2012	HRV-B37	HRV-B79	5.076×10^{-4}	1.313×10^{-2}	2.011×10^{-3}	2.515×10^{-4}	1.909×10^{-5}	4.546×10^{-4}	Intraspecies recombination of HRV-B

หมายเหตุ: N/A = Not Available

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเป็นไวรัสสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน แบบไม่รุนแรง หรือโรคไขหวัดทั่วไป นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ส่วนล่างด้วย ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบ หายใจแล้วมีเสียงวี๊ดในเด็ก การกำเริบของโรคหอบหืด และ โรคปอดอุดกั้นเรื้อรังในผู้ใหญ่ และเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสยังเกี่ยวข้องกับโรคที่รุนแรงด้วย เช่น โรคหุซัน กลางอักเสบในเด็ก และไซนัสอักเสบในผู้ใหญ่ (21) ดังนั้นจึงเป็นที่รู้จักกันว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส เป็นไวรัสที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ และไม่เชื่อว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถก่อโรคในระบบ ทางเดินอาหารได้ เนื่องจากไวรัสชนิดนี้ไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดของกระเพาะอาหาร สภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation ในส่วนของ capsid protein ของไวรัสและเป็นสาเหตุให้ไวรัสสูญเสีย infectivity และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของ เชื้อไวรัสคือ 33-34 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่พบได้ในระบบทางเดินหายใจ จนกระทั่งในปี 2009 ได้มี รายงานการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในสิ่งปฏิกูลได้เป็นครั้งแรก (15) ซึ่งสภาวะแวดล้อมที่ตรวจ พบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสนั้นเป็นสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอนเทอโรไวรัส จึงทำให้มีหลายงานวิจัยสนใจที่จะศึกษาการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างจากอุจจาระ มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระยังมีอยู่น้อยมาก และ ไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน รวมถึงไม่มีการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่มควบคุมที่ไม่มีอาการใน ระบบทางเดินอาหาร

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยไทย 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ตั้งแต่ปี 2010-2014 และกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค herpangina ตั้งแต่ปี 2012-2014 ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มโรคมือเท้าปากและโรค herpangina ไม่มีอาการใน ระบบทางเดินอาหาร จึงใช้ผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นกลุ่มควบคุม ตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มนี้มาจากจังหวัด กรุงเทพมหานครและจังหวัดขอนแก่น การตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสใช้วิธี semi-nested PCR ใน ส่วนของยีน VP4/VP2 พบว่าตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันให้ผลบวกต่อเชื้อ ฮิวแมนโรโนไวรัสมากกว่าตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค herpangina ประมาณ

2.7 เท่า โดยความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน และกลุ่มผู้ป่วยโรคมือเท้าปากหรือโรค herpangina คือร้อยละ 2.32 และ 0.85 ตามลำดับ ความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสจากตัวอย่างอุจจาระในผู้ป่วยไทยค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศ ได้แก่ ประเทศอังกฤษ ร้อยละ 10 (1) ฮองกง ร้อยละ 7.9 (2) อิตาลี ร้อยละ 5.2 (3) และในประเทศฟินแลนด์ที่เคยมีการศึกษา 2 ครั้ง โดยมีความชุกร้อยละ 10.5 (4) และร้อยละ 35.1 (5) ความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่ต่ำในการศึกษาคั้งนี้อาจเกิดจากข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้เป็นตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่เหลือจากโครงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัส ดังนั้นผู้วิจัยคิดว่าถ้านำตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการในระบบทางเดินหายใจมาทำการศึกษาอาจพบความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมากกว่านี้ หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของกลุ่มอายุผู้ป่วยที่นำมาศึกษา โดยส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมักพบในเด็กเล็กมากกว่าผู้ใหญ่ ข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสน้อย คือวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่แตกต่างกัน ทำให้ความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสแตกต่างกันได้ การศึกษาคั้งนี้ใช้วิธี semi-nested PCR ซึ่งมีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสต่ำกว่าวิธี real-time PCR ที่งานวิจัยอื่นๆ ใช้ทั้งในประเทศอิตาลี (3) และฟินแลนด์ (5) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นอีกงานวิจัยหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถพบได้ในอุจจาระ แม้แต่อุจจาระของกลุ่มคนทั่วไปที่ไม่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารก็สามารถพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้เช่นกัน คล้ายกับงานวิจัยของ Honkanen ในประเทศฟินแลนด์ที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของกลุ่มเด็กปกติที่ไม่มีอาการในระบบทางเดินอาหาร (4)

ในการศึกษาคั้งนี้พบทุกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็น HRV-A รองลงมาคือ HRV-C ส่วน HRV-B พบน้อยที่สุด (ร้อยละ 46.7, 36.7 และ 16.7 ตามลำดับ) สัดส่วนของแต่ละสายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้คล้ายกับงานวิจัยในประเทศอังกฤษและฟินแลนด์ที่พบความชุกของ HRV-A มากที่สุดในอุจจาระ โดยการศึกษาในประเทศอังกฤษพบสัดส่วนของ HRV-A, HRV-B และ HRV-C ร้อยละ 46, 13 และ 41 ตามลำดับ (1) ในขณะที่งานวิจัยในประเทศฟินด์แลนด์ซึ่งมี 2 งานวิจัย คืองานวิจัยของ Honkanen และคณะพบสัดส่วนของ HRV-A, HRV-B และ HRV-C ร้อยละ 79, 8 และ 41 ตามลำดับ (4) ในขณะที่งานวิจัย

ของ Savoainen-Kopra และคณะพบ HRV-A ร้อยละ 54, HRV-B ร้อยละ 23 และ HRV-C ร้อยละ 15 นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของ HRV-A, HRV-B และ HRV-C ที่พบในตัวอย่างอุจจาระและตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินหายใจไม่มีความแตกต่างกัน เช่นในงานวิจัยที่ศึกษาการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสโดยใช้ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจในประเทศมองโกเลีย (ร้อยละ 47.1, 8.2 และ 44.7 ตามลำดับ) (61) และในประเทศจีน (ร้อยละ 50, 10.4 and 39.6 ตามลำดับ) (62) จึงสรุปได้ว่าทุกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถพบได้ทั้งในตัวอย่างจากอุจจาระและตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจโดยสัดส่วนของแต่ละสายพันธุ์มีความคล้ายกันในตัวอย่างไม่ถึง 2 ชนิด และสรุปได้ว่า HRV-A และ HRV-C เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในตัวอย่างไม่ถึง 2 ชนิด

ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส 31 types ที่แตกต่างกันใน 35 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มี type ที่จำเพาะในตัวอย่างอุจจาระ คล้ายกับงานวิจัยของ Harvala (1) และ Honkanen (4) นอกจากนี้ยังพบว่าหลายๆ type ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในงานวิจัยนี้เป็น type เดียวกับที่พบในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจของประเทศอิตาลี (63) และประเทศญี่ปุ่น (64) เช่น HRV-A12, HRV-A39, HRV-A40, HRV-A88, HRV-A68, HRV-A54, HRV-B79, HRV-B84, HRV-C2, HRV-C43, HRV-C25 และ HRV-C12 เป็นต้น

งานวิจัยนี้พบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันได้เกือบทุกเดือนยกเว้นเดือนสิงหาคมและตุลาคม โดยพบมากที่สุดในเดือนธันวาคมร้อยละ 40 รองลงมาคือฤดูหนาวและฤดูฝนร้อยละ 30 และ 27 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความชุกในแต่ละเดือน พบว่าเดือนธันวาคมมีความชุกมากที่สุด งานวิจัยนี้คล้ายกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นซึ่งสามารถพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสได้ตลอดทั้งปี ไม่มีฤดูกาลที่แน่นอน แต่เป็นการศึกษาจากตัวอย่างระบบทางเดินหายใจ (64) ส่วนงานวิจัยในประเทศฟินแลนด์และอังกฤษพบความชุกของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระได้มากที่สุดในเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม (1, 4, 5) ในการศึกษาการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในประเทศไทยที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่า HRV-C และ HRV-A มีความชุกมากในฤดูฝน (เดือนพฤษภาคม-ตุลาคม) และช่วงต้นฤดูหนาว (พฤศจิกายน-มกราคม) แต่เป็นการศึกษาในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ (37) การระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของตัวอย่างที่ใช้ศึกษาซึ่งมาจากความแตกต่างของอาการผู้ป่วย การแบ่งฤดูกาลและ

ลักษณะภูมิอากาศของแต่ละประเทศแตกต่างกัน และเมื่อพิจารณาการระบาดของแต่ละสายพันธุ์ไม่พบที่มีความแตกต่างกันระหว่าง HRV-A, HRV-B และ HRV-C

งานวิจัยนี้พบว่าการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมีความสัมพันธ์กับเพศของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้ออักเสบเฉียบพลัน เนื่องจากการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในผู้ป่วยกลุ่มนี้มักพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงถึง 5 เท่าและมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่งานวิจัยในประเทศฟินแลนด์พบอัตราส่วนของการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในเพศชายและเพศหญิงไม่แตกต่างกัน คือมีอัตราส่วนของชาย:หญิงในการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเป็น 1:1 (4) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยใดที่สามารถอธิบายว่าเพศมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพฤติกรรมของเด็กผู้ชายที่ซนกว่าเด็กผู้หญิงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เด็กผู้ชายติดเชื้อไวรัสได้ง่ายกว่าเด็กผู้หญิง เนื่องจากว่าไวรัสชนิดนี้สามารถแพร่เชื้อได้ทั้งทางการหายใจและแพร่เชื้อแบบ fecal-oral route

การติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในงานวิจัยนี้พบได้มากที่สุดของเด็กอายุต่ำกว่า 2 ปี แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า (1, 2, 37, 62) อาจเป็นเพราะในเด็กเล็กยังไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าการที่เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในตัวอย่างอุจจาระส่วนใหญ่พบในกลุ่มเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 2 ปี อาจเนื่องมาจาก pH ในกระเพาะอาหารของเด็กเล็กไม่ต่ำเท่ากับ pH ในกระเพาะอาหารของผู้ใหญ่ (65-67) ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถผ่านกระเพาะอาหารที่มี pH เป็นกรดได้โดยจีโนมของไวรัสไม่ถูกทำลายไป และสามารถตรวจพบได้ในอุจจาระ

ในปัจจุบันยังไม่ทราบเหตุผลและกลไกที่แน่ชัดว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่ไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดสามารถเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและตรวจพบได้ในอุจจาระ แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยของ Skern และคณะที่แสดงให้เห็นว่าการเกิด mutation ของกรดอะมิโนในส่วน of capsid protein VP1 เพียง 1 ตำแหน่ง ทำให้เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถทนต่อกรดได้ที่ pH 4.5 (68) นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่า $MgCl_2$ ในร่างกายอาจเป็นตัวกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ทำให้สามารถรักษานุภาคของไวรัสได้โดยไม่ถูกทำลายไป (69) เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเพิ่มจำนวนได้ดีที่อุณหภูมิ 34 °C แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยในอดีตที่ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่อุณหภูมิ 37 °C และพบว่าประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสมีความ

แตกต่างกันน้อยมากระหว่างการเลี้ยงเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิ 33 °C และ 37 °C และเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสบางตัวยังมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นเมื่อ incubate ที่อุณหภูมิสูงขึ้น (12) เหตุผลเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและตรวจพบได้ในอุจจาระ

เชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสถูกตรวจพบในอุจจาระได้ครั้งแรกในปี 2009 จากงานวิจัยที่ต้องการตรวจหาเชื้อเอนเทอโรไวรัสของ Blomqvist และคณะ โดยพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในสิ่งปฏิกูลซึ่งเป็นสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอนเทอโรไวรัส และให้เหตุผลว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบนั้นมาจากการปนเปื้อนสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ จากการใช้กระดาษ tissue และการปนเปื้อนในน้ำเสีย (15) ต่อมาในปี 2012 Harvala และคณะสามารถตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอัตราที่สูง โดยพบประมาณร้อยละ 10 และมี viral load มาก ซึ่งมีค่า C_t-values ที่ต่ำ ใกล้เคียงกับที่พบในเชื้อเอนเทอโรไวรัส และมีการให้เหตุผลที่แย้งกับงานวิจัยของ Blomqvist โดยไม่เชื่อว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบนั้นมาจากการปนเปื้อนสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด ดังนั้นเมื่อมีการกลืนสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจลงไปตามกระเพาะอาหาร capsid ของไวรัสจะถูกทำลาย ทำให้ RNA ของไวรัสสลายไป ทำให้ไวรัสสูญเสีย infectivity อีกเหตุผลหนึ่งคือสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจที่กลืนลงไปถูกเจือจางด้วยสารต่างๆ ที่มีอยู่ในลำไส้ ทำให้ viral load ของไวรัสไม่มากพอที่สามารถตรวจพบในอุจจาระได้ จึงสรุปได้ว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ (1) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Savolainen-Kopra และงานวิจัยของ Honkanen ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่แยกได้จากอุจจาระสามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์ HeLa ได้ และแสดง Cytopathic effect (CPE) จึงสรุปได้ว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระนั้นไม่ใช่แค่เพียง RNA ของไวรัสแต่เป็นเชื้อไวรัสทั้งตัวที่มีชีวิตอยู่ (4, 5)

จากการดูลักษณะอาการของผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่ติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส ในงานวิจัยนี้พบว่าร้อยละ 60 ของผู้ป่วยมีอาการของโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันร่วมกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วย 9 คน ที่มีการติดเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วย ในจำนวนนี้ผู้ป่วย 7 คนมีอาการท้องเสียร่วมกับอาการในระบบทางเดินหายใจ ในขณะที่ผู้ป่วย 2 คนมีอาการท้องเสียอย่างเดียว ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ

อีวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระนี้อาจมาจากการกลืนสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษารั้งนี้ไม่ได้เก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระมาทำการศึกษาก็จะทำให้ไม่ทราบว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระมีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมาก่อนหรือไม่ ซึ่งงานวิจัยนี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Harvala และงานวิจัยของ Lau ที่พบว่าประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระมีอาการท้องเสียโดยไม่พบอาการในระบบทางเดินหายใจร่วมด้วย (1, 2) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Savolainen-Kopra และคณะพบว่าประมาณร้อยละ 94 ของตัวอย่างอุจจาระและตัวอย่างในระบบทางเดินหายใจที่ได้จากผู้ป่วยคนเดียวกัน ให้ผลบวกต่อเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด (5)

ถึงแม้ว่าในการศึกษารั้งนี้พบเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในผู้ป่วยโรคมือเท้าปากและโรค Herpangina แต่พบในความชุกที่ต่ำมากเพียงร้อยละ 0.85 จึงสรุปได้ว่าเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคนี้อ ในประเทศไทยเคยมีการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่มนี้พบว่า coxsackievirus A16 และ enterovirus 71 เป็นสาเหตุหลักของโรคมือเท้าปาก ในขณะที่ coxsackievirus A8 เป็นสาเหตุหลักของโรค herpangina (70)

นอกจากการศึกษาระบาดของเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระแล้ว งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการเกิด recombination ของเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสในบริเวณ 5'UTR ด้วย เนื่องจากการเกิด recombination ของเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ แต่ไม่เคยมีการศึกษาในตัวอย่างอุจจาระ การเกิด recombination มีความสำคัญต่อวิวัฒนาการของเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสและทำให้เกิดความหลากหลายในสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ดังเช่น HRV-Ca ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5'UTR คล้ายกับ HRV-A ซึ่งคาดกันว่า HRV-Ca เกิดจาก recombination ระหว่าง HRV-A และ HRV-C และทำให้เกิดความหลากหลายของ HRV-C (56, 58) โดยทั่วไปแล้วการเกิด recombination ของเชื้ออีวแมนโรโนไวรัสมักพบในส่วน of nonstructural gene หรือบริเวณรอยต่อระหว่าง 5'UTR กับ structural gene และพบการเกิด recombination ในส่วนของ structural gene ได้น้อย (71) งานวิจัยนี้เป็นอีกงานวิจัยหนึ่งที่ยืนยันว่าพบการเกิด recombination ในบริเวณ 5'UTR โดยพบว่ามี 2 ตัวอย่างที่เกิด recombination ภายใน HRV-C และอีก 1 ตัวอย่างมีการเกิด recombination ภายใน HRV-B ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของจุดที่เกิด

recombination อยู่ในช่วงบริเวณ polypyrimidine tract (PPT) ของ IRES ภายใน 5'UTR ของจีโนม ตำแหน่งของการเกิด recombination ที่พบในงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยที่เคยศึกษาก่อนหน้านี้ (56, 60) ซึ่งบริเวณ 5'UTR ที่มักมีการเกิด recombination เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ replication, transcription และ translation ของไวรัส จากการศึกษาของ Schibler และคณะพบว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่มีการเกิด recombination บริเวณ 5'UTR มีประสิทธิภาพในการ replication และ translation น้อยกว่าเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่ไม่มีการเกิด recombination (72) แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของการเกิด recombination ในบริเวณดังกล่าว อาจเป็นเพราะบริเวณนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างคล้ายกันระหว่าง HRV-A และ HRV-C ทำให้สามารถเข้าคู่กันได้ระหว่างกระบวนการ replication และสังเกตได้ว่าการเกิด recombination ถูกจำกัดอยู่แค่บางบริเวณ อาจเนื่องจากการเกิด recombination ในบริเวณดังกล่าวทำให้ไวรัสสามารถอยู่รอดได้ และความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เท่ากันภายในจีโนมของไวรัสทำให้การเกิด recombination ถูกจำกัดอยู่แค่บางบริเวณ ในงานวิจัยนี้ยังได้ดูความเกี่ยวข้องของการเกิด recombination กับความรุนแรงของโรคด้วย แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่พบความแตกต่างของลักษณะอาการของผู้ป่วยระหว่าง strain ที่มีการเกิด recombination และ strain ที่ไม่มีการเกิด recombination ซึ่งอาจเป็นเพียงแค่การเกิด recombination โดยธรรมชาติของไวรัสเท่านั้น และส่งผลให้เกิดความหลากหลายของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบการระบาดของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระจากผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลันเปรียบเทียบกับกลุ่มคนที่ไม่มีอาการของโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน รวมถึงการวิเคราะห์อายุ เพศ การติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่น สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสที่พบในอุจจาระ ฤดูกาลในการติดเชื้อไวรัส ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ รวมถึงการพบ recombination ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสในอุจจาระด้วย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารซึ่งอาจเกิดจากเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส รวมทั้งใช้ในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Harvala H, McIntyre CL, McLeish NJ, Kondracka J, Palmer J, Molyneaux P, et al. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. *Journal of medical virology*. 2012;84(3):536-42.
2. Lau SK, Yip CC, Lung DC, Lee P, Que TL, Lau YL, et al. Detection of human rhinovirus C in fecal samples of children with gastroenteritis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;53(4):290-6.
3. Rovida F, Campanini G, Piralla A, Adzasehoun KM, Sarasini A, Baldanti F. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;77(3):231-5.
4. Honkanen H, Oikarinen S, Peltonen P, Simell O, Ilonen J, Veijola R, et al. Human rhinoviruses including group C are common in stool samples of young Finnish children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;56(3):250-4.
5. Savolainen-Kopra C, Simonen-Tikka ML, Klemola P, Blomqvist S, Suomenrinne S, Nanto-Salonen K, et al. Human rhinoviruses in INDIS-study material-evidence for recovery of viable rhinovirus from fecal specimens. *Journal of medical virology*. 2013;85(8):1466-72.
6. Heikkinen T, Jarvinen A. The common cold. *Lancet*. 2003;361(9351):51-9.
7. Pitkaranta A, Arruda E, Malmberg H, Hayden FG. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 1997;35(7):1791-3.
8. Abzug MJ, Beam AC, Gyorkos EA, Levin MJ. Viral pneumonia in the first month of life. *Pediatr Infect Dis J*. 1990;9(12):881-5.

9. Duff AL, Pomeranz ES, Gelber LE, Price GW, Farris H, Hayden FG, et al. Risk factors for acute wheezing in infants and children: viruses, passive smoke, and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics*. 1993;92(4):535-40.
10. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*. 1993;307(6910):982-6.
11. Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(6):574-81.
12. Papadopoulos NG, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *Journal of medical virology*. 1999;58(1):100-4.
13. McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 8):1791-806.
14. Giranda VL, Heinz BA, Oliveira MA, Minor I, Kim KH, Kolatkar PR, et al. Acid-induced structural changes in human rhinovirus 14: possible role in uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10213-7.
15. Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Paananen A, Hovi T, Roivainen M. Molecular characterization of human rhinovirus field strains isolated during surveillance of enteroviruses. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 6):1371-81.
16. Jackson GG, Dowling HF. Transmission of the common cold to volunteers under controlled conditions. IV. Specific immunity to the common cold. *J Clin Invest*. 1959;38(5):762-9.
17. Andrewes CH. Rhinoviruses and common colds. *Annu Rev Med*. 1966;17:361-70.
18. Hamre D. Rhinoviruses. *Monogr Virol*. 1967;1:1-85.
19. Tyrrell DA, Parsons R. Some virus isolations from common colds. III. Cytopathic effects in tissue cultures. *Lancet*. 1960;1(7118):239-42.
20. Andrewes CH, Chaproniere DM, Gompels AE, Pereira HG, Roden AT. Propagation of common-cold virus in tissue cultures. *Lancet*. 1953;265(6785):546-7.

21. Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. Human rhinoviruses. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4(2):91-8.
22. Mackay IM. Human rhinoviruses: the cold wars resume. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;42(4):297-320.
23. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):135-62.
24. Rowlands DJ. Rhinoviruses and cells: molecular aspects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(4 Pt 2):S31-5.
25. Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell*. 1990;63(2):369-80.
26. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988;334(6180):320-5.
27. Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology*. 1988;62(8):2636-43.
28. Jackson RJ, Howell MT, Kaminski A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci*. 1990;15(12):477-83.
29. Abraham G, Colonno RJ. Many rhinovirus serotypes share the same cellular receptor. *Journal of virology*. 1984;51(2):340-5.
30. Fuchs R, Blaas D. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol*. 2010;20(5):281-97.
31. Cate TR, Couch RB, Johnson KM. Studies with Rhinoviruses in Volunteers: Production of Illness, Effect of Naturally Acquired Antibody, and Demonstration of a Protective Effect Not Associated with Serum Antibody. *J Clin Invest*. 1964;43:56-67.
32. Uncapher CR, DeWitt CM, Colonno RJ. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology*. 1991;180(2):814-7.
33. Andries K, Dewindt B, Snoeks J, Wouters L, Moereels H, Lewi PJ, et al. Two groups of rhinoviruses revealed by a panel of antiviral compounds present sequence divergence and differential pathogenicity. *Journal of virology*. 1990;64(3):1117-23.

34. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 2):333-40.
35. Blomqvist S, Savolainen C, Raman L, Roivainen M, Hovi T. Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4218-23.
36. Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, Kleemola M, Hovi T. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *Journal of medical virology*. 2002;66(2):263-8.
37. Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanboonlers A, et al. High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *The Journal of infection*. 2009;59(2):115-21.
38. Lau SK, Yip CC, Tsoi HW, Lee RA, So LY, Lau YL, 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*. 2007;45(11):3655-64.
39. Khetsuriani N, Lu X, Teague WG, Kazerouni N, Anderson LJ, Erdman DD. Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(11):1793-6.
40. Han TH, Chung JY, Hwang ES, Koo JW. Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea. *Arch Virol*. 2009;154(6):987-91.
41. Lau SK, Yip CC, Lin AW, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus C in children and adults in Hong Kong reveals a possible distinct human rhinovirus C subgroup. *J Infect Dis*. 2009;200(7):1096-103.
42. Miller EK, Khuri-Bulos N, Williams JV, Shehabi AA, Faouri S, Al Jundi I, et al. Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalised children in the Middle East. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;46(1):85-9.

43. Piralla A, Rovida F, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Locatelli F, et al. Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(4):311-7.
44. Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, Vang F, Pappas T, Zhang G, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J*. 2011;37(5):1037-42.
45. Iwane MK, Prill MM, Lu X, Miller EK, Edwards KM, Hall CB, et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis*. 2011;204(11):1702-10.
46. Huynh KN, Oliver BG, Stelzer S, Rawlinson WD, Tovey ER. A new method for sampling and detection of exhaled respiratory virus aerosols. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):93-5.
47. Winther B, McCue K, Ashe K, Rubino J, Hendley JO. Rhinovirus contamination of surfaces in homes of adults with natural colds: transfer of virus to fingertips during normal daily activities. *Journal of medical virology*. 2011;83(5):906-9.
48. La Rosa G, Fratini M, Della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Ann Ist Super Sanita*. 2013;49(2):124-32.
49. Winther B, Hayden FG, Hendley JO. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *Journal of medical virology*. 2006;78(5):644-50.
50. Rosenbaum MJ, De Berry P, Sullivan EJ, Pierce WE, Mueller RE, Peckinpaugh RO. Epidemiology of the common cold in military recruits with emphasis on infections by rhinovirus types 1A, 2, and two unclassified rhinoviruses. *Am J Epidemiol*. 1971;93(3):183-93.
51. Chantzi FM, Papadopoulos NG, Bairamis T, Tsiakou M, Bournousouzis N, Constantopoulos AG, et al. Human rhinoviruses in otitis media with effusion. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(7):514-8.

52. Savolainen-Kopra C, Korpela T, Simonen-Tikka ML, Amiryousefi A, Ziegler T, Roivainen M, et al. Single treatment with ethanol hand rub is ineffective against human rhinovirus--hand washing with soap and water removes the virus efficiently. *Journal of medical virology*. 2012;84(3):543-7.
53. Thibaut HJ, De Palma AM, Neyts J. Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(2):185-92.
54. Hayden FG, Turner RB, Gwaltney JM, Chi-Burris K, Gersten M, Hsyu P, et al. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled studies of rupintrivir nasal spray 2-percent suspension for prevention and treatment of experimentally induced rhinovirus colds in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(12):3907-16.
55. Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(6):1190-9; quiz 200-1.
56. McIntyre CL, McWilliam Leitch EC, Savolainen-Kopra C, Hovi T, Simmonds P. Analysis of genetic diversity and sites of recombination in human rhinovirus species C. *Journal of virology*. 2010;84(19):10297-310.
57. Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*. 2009;324(5923):55-9.
58. Huang T, Wang W, Bessaud M, Ren P, Sheng J, Yan H, et al. Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PloS one*. 2009;4(7):e6355.
59. Borman A, Jackson RJ. Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site. *Virology*. 1992;188(2):685-96.
60. Kim H, Kim K, Kim DW, Jung HD, Min Cheong H, Kim KH, et al. Identification of Recombinant Human Rhinovirus A and C in Circulating Strains from Upper and Lower Respiratory Infections. *PloS one*. 2013;8(6):e68081.
61. Tsatsral S, Xiang Z, Fuji N, Maitsetseg C, Khulan J, Oshitani H, et al. Molecular Epidemiology of Human Rhinovirus infection in Mongolian 2008-2013. *Japanese journal of infectious diseases*. 2015.

62. Zeng SZ, Xiao NG, Xie ZP, Xie GC, Zhong LL, Wang J, et al. Prevalence of human rhinovirus in children admitted to hospital with acute lower respiratory tract infections in Changsha, China. *Journal of medical virology*. 2014;86(11):1983-9.
63. Daleno C, Piralla A, Scala A, Senatore L, Principi N, Esposito S. Phylogenetic analysis of human rhinovirus isolates collected from otherwise healthy children with community-acquired pneumonia during five successive years. *PloS one*. 2013;8(11):e80614.
64. Kiyota N, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Harada S, Kusaka T, et al. Genetic analysis of human rhinovirus species A to C detected in patients with acute respiratory infection in Kumamoto prefecture, Japan 2011-2012. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;21:90-102.
65. Wills L, Paterson D. A Study of Gastric Acidity in Infants. *Archives of disease in childhood*. 1926;1(4):232-44.
66. Maffei HV, Nobrega FJ. Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. *Gut*. 1975;16(9):719-26.
67. Mitchell DJ, McClure BG, Tubman TR. Simultaneous monitoring of gastric and oesophageal pH reveals limitations of conventional oesophageal pH monitoring in milk fed infants. *Archives of disease in childhood*. 2001;84(3):273-6.
68. Skern T, Torgersen H, Auer H, Kuechler E, Blaas D. Human rhinovirus mutants resistant to low pH. *Virology*. 1991;183(2):757-63.
69. Blough HA, Tiffany JM, Gordon G, Fiala M. The effect of magnesium on the intracellular crystallization of rhinovirus. *Virology*. 1969;38(4):694-8.
70. Puenpa J, Mauleekoonphairoj J, Linsuwanon P, Suwannakarn K, Chieochansin T, Korkong S, et al. Prevalence and characterization of enterovirus infections among pediatric patients with hand foot mouth disease, herpangina and influenza like illness in Thailand, 2012. *PloS one*. 2014;9(6):e98888.
71. Tapparel C, Junier T, Gerlach D, Van-Belle S, Turin L, Cordey S, et al. New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(5):719-26.

72. Schibler M, Gerlach D, Martinez Y, Belle SV, Turin L, Kaiser L, et al. Experimental human rhinovirus and enterovirus interspecies recombination. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 1):93-101.





ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

1. Phosphate Buffer Saline (PBS)

PBS	9.88	กรัม
-----	------	------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารเคมีสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base	54	กรัม
-----------	----	------

Boric acid	27.5	กรัม
------------	------	------

EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
---------------	----	-----------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	2	กรัม
-------------	---	------

1 x TBE	100	มิลลิลิตร
---------	-----	-----------

เขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าไปไมโครเวฟจนกว่า agarose gel ละลายหมด

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
------------------	----	-----------

น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

5. DEPC water

DEPC	0.1	มิลลิลิตร
------	-----	-----------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

เขย่าแล้วนำไป incubate ที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำไป autoclave

การเตรียมสารเคมีสำหรับการ cloning

1. LB agar/ampicillin

Yeast extract	0.5	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Peptone	1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch², 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลง จากนั้นเติม ampicillin 100 µg/ml แล้วเตรียมเทใส่ plate ปริมาณ 35 มิลลิลิตร

2. LB broth

Yeast extract	0.25	กรัม
NaCl	0.25	กรัม
Peptone	0.5	กรัม

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนมีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave

3. SOC medium

Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	2	กรัม
NaCl	1	มิลลิลิตร
KCl	0.25	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกลูโคส 100 µl และ Mg²⁺ 100 µl

ภาคผนวก ข
ข้อมูลของตัวอย่างที่มีเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัสพร้อมรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์
(GenBank Accession Number)

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HRV specie	HRV serotype	Accession number
1	A529	1 ปี 8 เดือน	13 ก.ค. 55	C	12	KR054522
2	A667	N/A	24 ก.ค. 55	A	12	KR054523
3	A799	2 ปี	6 ส.ค. 55	B	69	KR054524
4	A1089	1 ปี	18 เม.ย. 56	C	43	KR054525
5	A1320	1 ปี	11 มิ.ย. 57	C	25	KR922045
6	B801	6 เดือน	11 เม.ย. 53	B	84	KR054526
7	B929	1 ปี 4 เดือน	1 ธ.ค. 53	A	13	KR054527
8	B934	3 ปี 6 เดือน	7 ธ.ค. 53	C	45	KR054528
9	B977	8 เดือน	5 ม.ค. 54	A	101	KR054529
10	B1008	1 ปี 1 เดือน	16 ม.ค. 54	A	45	KR054530
11	B1013	9 เดือน	17 ม.ค. 54	C	45	KR054531
12	B1055	9 เดือน	2 ก.พ. 54	A	88	KR054532
13	B1080	1 ปี	14 ก.พ. 54	A	88	KR054533
14	B1084	1 ปี 11 เดือน	14 ก.พ. 54	B	84	KR054534
15	B1266	1 ปี 4 เดือน	22 ธ.ค. 54	A	15	KR054535
16	B1331	11 เดือน	2 ก.พ. 55	B	37	KR054536
17	B1346	1 ปี 11 เดือน	23 ก.พ. 55	C	5	KR054537
18	B1365	8 เดือน	13 มี.ค. 55	C	7	KR054538
19	B1380	1 ปี	23 มี.ค. 55	A	19	KR054539
20	B1400	1 ปี 4 เดือน	5 เม.ย. 55	B	6	KR054540
21	B1447	10 เดือน	5 พ.ค. 55	C	11	KR054541

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HRV specie	HRV serotype	Accession number
22	B1497	2 ปี 7 เดือน	26 พ.ค. 55	C	2	KR054542
23	B1515	63 ปี	23 มิ.ย. 55	A	54	KR054543
24	B1533	N/A	6 ก.ค. 55	A	53	KR054544
25	B1672	9 เดือน	4 ธ.ค. 55	B	79	KR054545
26	B1681	26 วัน	19 ธ.ค. 55	C	11	KR054546
27	B1746	1 เดือน	15 มี.ค. 56	C	27	KR054547
28	B1748	7 เดือน	16 มี.ค. 56	C	48	KR054548
29	B1768	8 เดือน	27 เม.ย. 56	A	40	KR054549
30	B1784	5 เดือน	30 พ.ค. 56	C	16	KR054550
31	B1811	1 ปี	2 ก.ย. 56	A	57	KR054551
32	B1816	1 ปี	24 ก.ย. 56	A	94	KR054552
33	B1838	1 ปี 4 เดือน	3 ธ.ค. 56	C	30	KR922046
34	B1938	5 เดือน	28 มี.ค. 57	A	39	KR054553
35	B1953	5 เดือน	31 พ.ค. 57	A	68	KR054554

หมายเหตุ: N/A = Not Available

ข้อมูลของตัวอย่างที่มีการเกิด recombination ในบริเวณ 5'UTR ของเชื้อฮิวแมนโรโนไวรัส
พร้อมรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank Accession Number)

อันดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HRV specie	Accession number
1	B934	3 ปี 6 เดือน	7 ธ.ค. 53	C	KR922047
2	B1013	9 เดือน	17 ม.ค. 54	C	KR922048
3	B1672	9 เดือน	4 ธ.ค. 55	B	KR922049



ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร PLOS ONE หัวข้อเรื่อง Prevalence and molecular characterization of human rhinovirus in stool samples of individuals with and without acute gastroenteritis.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล ประภาพร คุณทา เพศ หญิง

อายุ 24 ปี เกิดวันที่ 9 กันยายน 2533

สถานที่เกิด โรงพยาบาลรวมแพทย์ จังหวัดสุรินทร์

ที่อยู่ 2/11 ถ. พรหมเทพ ต. ในเมือง อ. เมือง จ. สุรินทร์ 32000

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2552-2555

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2556

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : Prevalence and molecular characterization of human rhinovirus in stool samples of individuals with and without acute gastroenteritis. เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร PLOS ONE

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY