

การศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส
ในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2552-2555

นางสาวพรรมิณี ศรีวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERIZATION OF HUMAN ADENOVIRUS
INFECTION IN THAILAND, 2009-2012

Miss Punsinee Sriwanna

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2552-2555

โดย

นางสาวพรรษินี ศรีวรรณ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิง วิไล ชินชนก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตยุชัย พยุงกร)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารยาเวก)

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

พรหมินี ศรีวรรณ : การศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2552-2555. (MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERIZATION OF HUMAN ADENOVIRUS INFECTION IN THAILAND, 2009-2012) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. นพ. ยง ภู่วรรณ, 79 หน้า.

เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้หลากหลายโรค งานวิจัยนี้ได้ศึกษาระบาดของวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสของกลุ่มประชากรในประเทศไทยในช่วงเดือนมกราคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2555 โดยวิธีเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดนี้ด้วย Polymerase chain reaction โดยศึกษาจากสิ่งส่งตรวจสองชนิดคือ 1.) น้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกจากกรุงเทพมหานคร จังหวัดขอนแก่น และจังหวัดนครราชสีมา 2.) สิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระจากจังหวัดกรุงเทพและจังหวัดขอนแก่น พบว่าในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกตรวจให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส 1.04% (82/7,921) และในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส 5.84% (76/1,301) HAdV-B3 (32%) และ HAdV-C1 (31%) พบมากในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ ในการศึกษาครั้งนี้ รองลงมาคือ HAdV-C2 (13%), HAdV-C5 (12%) ในขณะที่ HAdV-F41 พบมากในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระถึง 25% และมีจีโนไทป์อื่นได้แก่ HAdV-C1 18%, HAdV-C2 16%, HAdV-B3 13% เด็กในช่วงวัย 0 - <3 ขวบ พบว่ามีอัตราการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสมากที่สุด (63.29%) การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสไม่ขึ้นกับฤดูกาลสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดปี แต่ในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงสุดในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายน สำหรับสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระนั้นอัตราการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงสุดในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม และเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม จึงแนะนำให้เฝ้าระวังและป้องกันการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในเด็กวัยขวบปีแรก และในอนาคตควรที่จะเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลในด้านระบาดของไวรัสชนิดนี้สำหรับการพัฒนาวัคซีนต่อไป

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

5474141830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : HAdV, HEXON, RESPIRATORY VIRUS INFECTION, GASTRO VIRAL INFECTION, EPIDEMIOLOGY

PUNSINEE SRIWANNA : MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERIZATION OF HUMAN ADENOVIRUS INFECTION IN THAILAND, 2009-2012. ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D. 79 pp.

Human adenovirus (HAdV) can cause a wide spectrum of human diseases worldwide. Using Polymerase chain reaction, This study investigated HAdV infection prevalence in the Thai population for four years from January 2009 to December 2012. Nasopharyngeal swab/aspirate (NP) specimens were collected from patients in Bangkok, Khon Kaen, and Nakhon Si Thammarat province and fecal specimens were collected from Bangkok and Khon Kaen province. HAdV infection was found in 1.04% (82/7,921) of NP samples and in 5.84% (76/1,301) of fecal specimens. HAdV-B3 (32%) and HAdV-C1 (31%) were the genotypes most commonly associated with NP specimens followed by HAdV-C2 (13%) and HAdV-C5 (12%). In fecal specimens, we found that 25% harbored HAdV-F41 followed by HAdV-C1 (18%), HAdV-C2 (16%), HAdV-B3 (13%). Out of all population subsets, children younger than 3 years old were the most likely to be HAdV positive (63.29%). In addition, HAdV infection occurred throughout the year without a seasonal distribution pattern, although HAdV infection of NP samples peaked from January-April while HAdV infection peaked from January to March and then again from May to July in fecal samples. We recommend that the study of HAdV infection in this region should be increased in order to provide increased epidemiological information that can be applied to novel therapeutic approaches and vaccine development.

Field of Study : Medical Science Student's Signature

Academic Year : 2012 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ได้ปฏิบัติการณ์ในห้องที่มีอุปกรณ์เพียบพร้อมและทันสมัย พร้อมทั้งกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีประโยชน์และคุณค่าต่องานวิจัยนี้มาโดยตลอด อีกทั้งยังกรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนที่มีส่วนร่วมในการเก็บและรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของเจ้าหน้าที่แพทย์ พยาบาล และห้องปฏิบัติการจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลในเครือบางปะกอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช และโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญาโทมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่ๆน้องๆทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ ที่มีค่าและประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า ให้การสนับสนุน ให้ความรัก และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษานี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐาน.....	3
กรอบความคิดของโครงการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย.....	5
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
การค้นพบเชื้ออะดิโนไวรัส.....	6
การจำแนกและสัณฐานวิทยาของเชื้ออะดิโนไวรัส.....	6
โครงสร้างของฮิวแมนอะดิโนไวรัส.....	8
สารพันธุกรรมของฮิวแมนอะดิโนไวรัส.....	10
องค์ประกอบของจีโนมอะดิโนไวรัส.....	10
การเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส.....	11
ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์และความสำคัญทางคลินิกของ เชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส.....	13
Phylogenetic ของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส.....	16

	หน้า
พยาธิสภาพของการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส	16
ลักษณะอาการทางคลินิก	17
การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส	18
อุบัติการณ์ของโรค	19
การแพร่เชื้อของฮิวแมนอะดีโนไวรัส	21
การรักษาและป้องกัน	21
การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	25
รูปแบบการวิจัย	25
ประชากรศึกษา	25
ขนาดของประชากรตัวอย่าง	26
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	26
การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	29
การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส	30
การตรวจสอบผลการสกัด DNA	31
การเตรียม Positive control ด้วยวิธี cloning	32
การออกแบบไพรเมอร์ (primer)	34
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR	35
การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์	37
การวิเคราะห์ข้อมูล	38
การทำ phylogenetic analysis ในบริเวณฮีน hexon ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนที่ตรวจพบ	39
การคำนวณอัตราการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส ต่อสปีด้าห์ในตัวอย่างของผู้ป่วย	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง	40
ผลการวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส	40
ผลการเพิ่มจำนวนของ Internal control	42
ผลการวิเคราะห์อายุและเพศผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนอะดีโนด้วยวิธี PCR	43

	หน้า
ผลการวิเคราะห์ฤดูกาลและปีที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส.....	44
ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree และ HAdV typing.....	46
ผลการวิเคราะห์การกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555.....	49
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	52
รายการอ้างอิง.....	57
ภาคผนวก.....	68
ภาคผนวก ก.....	69
ภาคผนวก ข.....	71
ภาคผนวก ค.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	79

สารบัญญัตินำ

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการจำแนกเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสตาม subgroup และ serotype.....	7
2 แสดงหน้าที่ของโปรตีนของอีวแมนอะดิโนไวรัส.....	12
3 แสดงสายพันธุ์ของเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัส.....	13
4 แสดงความชุกของเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสในประเทศต่างๆ.....	20
5 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH.....	32
6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการ แสดงออกของยีน GAPDH.....	32
7 แสดงสภาวะที่ใช้ทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน GAPDH.....	32
8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HAdV.....	35
9 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ Semi-Nested PCR เพื่อ Screening เชื้อ HAdV รอบที่ 1 และ รอบที่ 2.....	36
10 แสดงสภาวะที่ใช้ทำ Semi-Nested PCR เพื่อ Screening เชื้อ HAdV รอบที่ 1 และ รอบที่ 2.....	36
11 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ Positive for ADV screening.....	36
12 แสดงสภาวะที่ใช้ทำ PCR สำหรับ Positive for ADV screening.....	37
13 แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	41
14 แสดงความชุกและช่วงอายุของผู้ติดเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัส.....	43
15 แสดงความชุกของเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสในปี พ.ศ. 2552-2555.....	45
16 แสดงการกระจายของเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจ ในช่วงปี พ.ศ.2552-2555.....	51

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงโปรตีนที่ประกอบกันเป็นโครงสร้างของอะดีโนไวรัส.....	8
2 แสดงอนุภาคของอะดีโนไวรัส.....	9
3 แสดงจีโนมและโปรตีนที่ encode จากยีนของฮิวแมนอะดีโนไวรัส.....	11
4 แสดงการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส.....	12
5 แสดงขั้นตอนในการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR	23
6 แสดงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย Nested-PCR.....	24
7 แสดงวิธีการเก็บน้ำล้างโพรงจมูก.....	29
8 แสดงผลการ BLAST ของ ADV_FO เทียบกับในฐานข้อมูล.....	35
9 แสดงผลการ BLAST ของ ADV_FO เทียบกับในฐานข้อมูลที่ใกล้เคียง.....	35
10 แสดงผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.01).....	38
11 ผลการใช้โปรแกรม Seqman TM II (version 6.0) ในการตรวจสอบและแก้ไขผลของ ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	38
12 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 486 bp ที่ได้จากการทำ nested-PCR ในการคัดกรอง เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส.....	40
13 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 956 bp ที่ได้จากการทำ PCR ใน typing เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส	41
14 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 490 bp ที่ได้จากการทำ PCR ของ GAPDH gene.....	42
15 กราฟแท่งแสดงช่วงอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้ออะดีโนไวรัสในตัวอย่างที่ส่งตรวจ.....	44
16 กราฟแท่งแสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละสัปดาห์ ในสิ่งส่งตรวจที่เป็น NP.....	44
17 กราฟแท่งแสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละสัปดาห์ใน สิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระ.....	45
18 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกจีโนไทป์ในส่วนของยีน hexon ของตัวอย่างที่ วิเคราะห์.....	47
19 แสดงจีโนไทป์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจ.....	48

ภาพที่	หน้า
20 แสดง Subgroup ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจ.....	48
21 แสดงการกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจจาก NP ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555.....	49
22 แสดงการกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555.....	50

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
1 กรอบความคิดของโครงการวิจัย.....	4

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
CAR	Coxsackie-adenovirus receptor
CPE	Cytopathic effect
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HAdV	Human adenovirus
ITR	Inverted terminal repeat
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Milliliter
mM	Milimolar
NaOAc	Sodium acetate
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment-length polymorphism
μl	Microliter
μM	Micromolar
VTM	Viral transport media

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ฮิวแมนอะดีโนไวรัส (Human Adenovirus: HAdV) เป็นไวรัสที่สามารถติดเชื้อและก่อให้เกิดโรคได้ในอวัยวะหลายระบบ ได้แก่ ตา ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และทางเดินปัสสาวะ ทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะอ้วน [1-3] นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้จากผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง [4-5] เชื้อไวรัสสามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการสัมผัส การหายใจ และการกิน [6] การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสเกิดขึ้นในเซลล์เยื่อ (epithelial cell) โดยมีระยะฟักตัวของโรคนานประมาณ 7-13 วัน [7]

การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี ไม่มีฤดูกาล จากการศึกษาระบาดวิทยาพบ 5-7% ของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเด็กทั่วโลกมีสาเหตุมาจากเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส อาการของโรคที่พบบ่อย ได้แก่ ไอ คัดจมูก เจ็บคอ ต่อม้ำเหลืองบริเวณลำคอโต ซึ่งอาการเหล่านี้ไม่สามารถแยกออกจากโรกระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่นได้ [6] ในขณะที่เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสพบมากเป็นอันดับสามในการก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร มีความชุกประมาณ 4-12% อาการที่พบบ่อย ได้แก่ ท้องร่วง อาเจียน มีไข้ โดยครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมักมีอาการในระบบทางเดินหายใจร่วมด้วย [8] ถึงแม้ว่าผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ส่วนใหญ่จะไม่ปรากฏอาการหรืออาการป่วยไม่รุนแรง แต่บางครั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถทำให้เกิดอาการรุนแรงได้ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือในผู้ป่วยปกติได้ [9] ซึ่งการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจเนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล [10] ถึงแม้จะมีการผลิตวัคซีนตัวเป็นชนิดกิน (Oral Live Vaccine) มาใช้เฉพาะในค่ายทหารของสหรัฐอเมริกา [11] แต่วัคซีนนี้ยังไม่สามารถใช้ในเด็กได้ เนื่องจากยังไม่สามารถทำให้เชื้อไวรัสอ่อนฤทธิ์ลงได้และยังมีความกังวลเกี่ยวกับความสามารถในการก่อเนื้องอกของเชื้อไวรัสในเด็ก [12]

ฮิวแมนอะดีโนไวรัสจำแนกโดยอาศัยการศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยา ชีววิทยา ชีวเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการก่อเนื้องอกในหนู ลักษณะการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (haemagglutination) ความยาวของ fiber และเปอร์เซ็นต์ของเบส G+C ในจีโนม ปัจจุบันมีการแบ่งเชื้อ HAdV ออกเป็น 7 subgroups (species) ตั้งแต่ A-G ซึ่งมีสมาชิกอยู่ 57 serotypes [13-16] โดยไวรัสที่อยู่แต่ละ serotype จะมีค่า Neutralization assay ต่างกันมากกว่า 16 เท่า [17] ในการติดเชื้อ HAdV serotype ต่างๆจะทำให้มีอาการแตกต่างกันออกไป เช่น HAdV serotypes 1, 2, 3, 5, 6 และ 7 ส่วนมากก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ [6] ในขณะที่ HAdV serotypes 40 และ 41 พบบ่อยในการ

ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร [18] มีรายงานว่า serotypes บางชนิดก่อโรคที่มีอาการรุนแรง [19] การศึกษาของมอร์ฟีนพบว่าความไวต่อยาค้านไวรัสของเชื้ออะดิโนไวรัสชนิดนั้นมีความจำเพาะในแต่ละจีโนไทป์ [20] ดังนั้นการตรวจหาเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในระดบ จีโนไทป์ จึงมีความจำเป็นต่อการรักษาที่เหมาะสมในการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสต่างจีโนไทป์ ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล อาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *Hexon* โดยวิธีเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (Polymerase chain reaction : PCR) [21] ซึ่งวิธีนี้ทำได้รวดเร็ว สะดวก และจำเพาะกว่าการแบ่ง serotype แบบเดิม [22] การศึกษาระบาดวิทยาของการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสมีการรายงานทั่วโลก [23-32] อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงในประเทศไทยมีรายงานน้อยมาก [33]. ในการศึกษาของมาเลเซียพบว่าในสิ่งส่งตรวจสารคัดหลั่งในจมูกของผู้ป่วยพบการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสประมาณ 2 % และพบมีการติดเชื้อ HAAdV-C มากที่สุด [24] นอกจากนี้การศึกษาในประเทศบังกลาเทศปี 2547-2548 พบโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันที่เกิดจากเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในเด็ก 1.9% [34] ในประเทศไทยปี 2550 มีรายงานการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในกลุ่มประชากรพบประมาณ 1.5% [35] และตั้งแต่ปี 2551 เป็นต้นมา ยังไม่มีการศึกษาการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทย.

ดังนั้นวัตถุประสงค์การวิจัยนี้เพื่อจำแนกสายพันธุ์ และระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส ที่แพร่กระจายในช่วงปี 2552-2555 โดยใช้ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ด้วยวิธี PCR และ DNA sequencing ในส่วนของยีน *Hexon* โดยคาดหวังว่าความรู้ที่ได้จะช่วยในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มากขึ้น รวมถึงเป็นการเฝ้าระวัง เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคและพัฒนาความรู้ไปสู่การผลิตวัคซีนต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

คำถามงานวิจัย

ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555 ในประเทศไทยเป็นอย่างไร มีความแตกต่างจากข้อมูลของประเทศอื่นๆ หรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์งานวิจัย

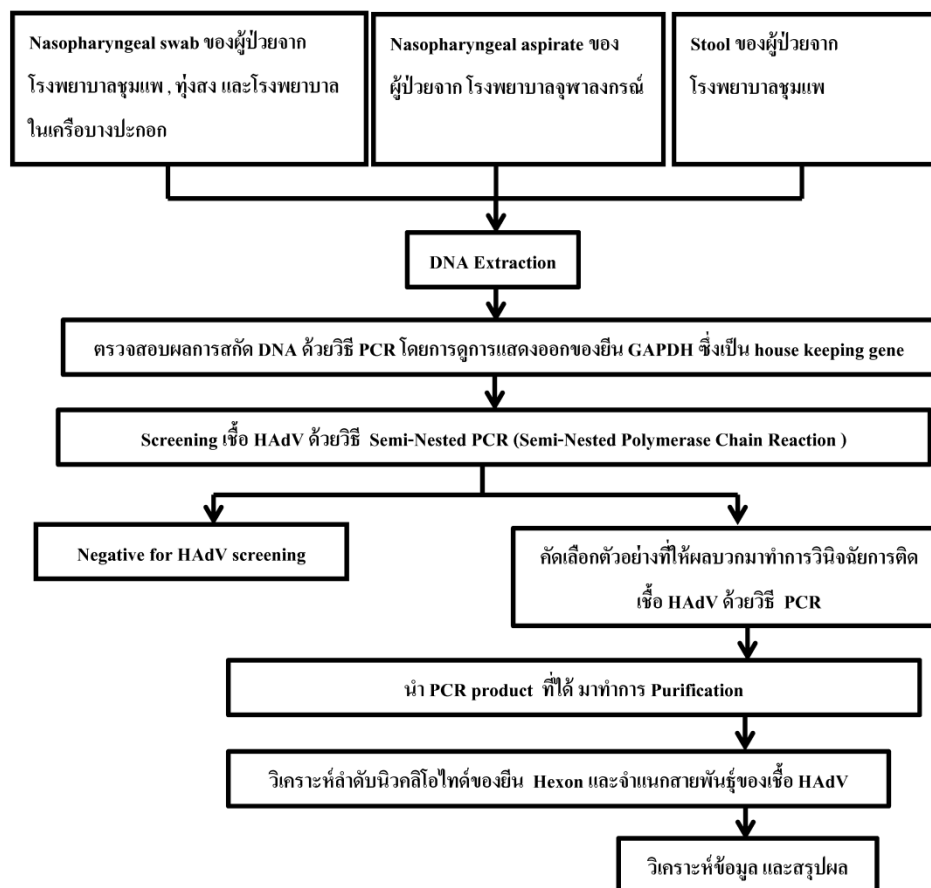
1. เพื่อศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส ที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหารในประเทศไทย
2. เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้กับต่างประเทศ

สมมติฐาน

ข้อมูลการระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส ในช่วงปี พ.ศ.2552-2555 ในประเทศไทยมีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการระบาดของต่างประเทศ

กรอบความคิดของโครงการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับการระบาดของไวรัสฮีโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2552-2555 ผู้วิจัยได้ศึกษาตามกรอบความคิดของโครงการวิจัยดังแผนภาพที่ 1 ดังนี้



แผนภาพที่ 1 กรอบความคิดของโครงการวิจัย

คำสำคัญ

HAdV, Hexon, Respiratory virus infection, gastro viral infection, Epidemiology

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย

1. Subgroup หรือ Species คือ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส (HAdV) ออกเป็นกลุ่มโดยดูจากรูปแบบการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (haemagglutination) ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 7 กลุ่มใหญ่ คือ HAdV กลุ่ม A-G ทั้งนี้ในงานวิจัยอื่นๆ อาจใช้คำที่แตกต่างกัน เช่น subspecies หรือ subgenera

2. Genotype เป็นการจัดจำแนกเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส (HAdV) ออกเป็นกลุ่มย่อย โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมบริเวณ Hexon gene เปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีอยู่แล้ว ในฐานข้อมูล NCBI

ข้อจำกัดในการวิจัย

การใช้ตัวอย่างที่เหลือจากโครงการอื่นนั้น สารพันธุกรรมของสารตัวอย่างอาจมีไม่เพียงพอ หรือสลายไป (degrade) จึงต้องทำการสกัดใหม่ในบางตัวอย่าง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสที่พบในประเทศไทย และสามารถนำข้อมูลนี้มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันควบคุมโรค และการผลิตวัคซีนในอนาคตต่อไป

2. ฝึกกระบวนการคิด การวิเคราะห์ และสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

3. ได้เรียนรู้และฝึกฝนการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ตลอดจนถึงวิธีการใหม่ในการวิจัยทางอณูชีววิทยา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การค้นพบเชื้ออะดีโนไวรัส

เชื้ออะดีโนไวรัส (Adenovirus, AdV) ถูกพบโดยกลุ่มนักวิจัย 2 กลุ่มที่ทำการศึกษาหาสาเหตุของการเกิด acute respiratory infection โดยกลุ่มแรกในปี 1953 Rowe และคณะได้นำ adenoid tissues ของคนมาเพาะเลี้ยงและพบว่าเชื้อไวรัสอยู่ใน culture นั้น [36] กลุ่มที่สองในปี 1954 Hilleman และ Werner ได้ทำการศึกษาระบาดของโรคในระบบทางเดินหายใจในค่ายทหารพบว่าเชื้อไวรัสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cytopathic effect) ในเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงจึงได้มีการให้ชื่อว่า adenoviruses [37] มีการศึกษาพบว่าเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพทางคลินิกได้ในหลายอวัยวะ สามารถเพาะแยกเชื้อ (isolate) ได้จากตัวอย่างส่งตรวจในระบบทางเดินหายใจและทางเดินอาหารของเด็กที่แสดงอาการ [2] ในปี 1962 พบว่า HAdV serotype 12 มีความสามารถสูงในการก่อเนื้องอกในแฮมสเตอร์แรกเกิด [38] แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่มีการรายงานว่าเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสมีความสามารถก่อเนื้องอกในคนได้ [39]

การจำแนกและสัณฐานวิทยาของเชื้ออะดีโนไวรัส

การจำแนกเชื้ออะดีโนไวรัส

เชื้ออะดีโนไวรัสสามารถแยกเชื้อได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์มีกระเปาะน้ำท่อน้ำเลี้ยงลูกจำพวกจิงโจ้ นก และ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก [40] ระบบการตั้งชื่อของอะดีโนไวรัสได้รับการรับรองมาตั้งแต่ ค.ศ. 1956 และมีการปรับปรุงใหม่ในปี ค.ศ.1999 [41-42] Family ของเชื้ออะดีโนไวรัสประกอบด้วย 5 genera ได้แก่ Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus, และ Ichtadenovirus. Human adenovirus (HAdV) ถูกจัดอยู่ใน genus Mastadenovirus ที่ประกอบด้วย simian, bovine, equine, porcine และ canine adenoviruses [40] สมาชิกใน genus Mastadenovirus จะมีการแบ่ง epitopes ในตำแหน่งของ hexon การจำแนกเชื้ออะดีโนไวรัสโดยหลักภูมิคุ้มกันวิทยาจะสามารถแบ่งเป็น serotypes และ serotype เหล่านี้จะถูกจัดเป็น subgroups หรือ species อีกครั้งหนึ่ง ซึ่ง subgroups ของเชื้ออะดีโนไวรัส แบ่งได้ตาม phylogenetic distance, DNA hybridization, restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis, ความเป็นไปได้ในการเกิด recombination, การก่อเนื้องอกในหนู และ degree of DNA

homology. DNA homology ถ้าเหมือนกันมากกว่า 50% จะถูกจัดอยู่ใน subgroup เดียวกัน แต่ถ้าน้อยกว่า 20% จะจัดอยู่ต่าง subgroup กัน [41] ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสตาม subgroup และ serotype

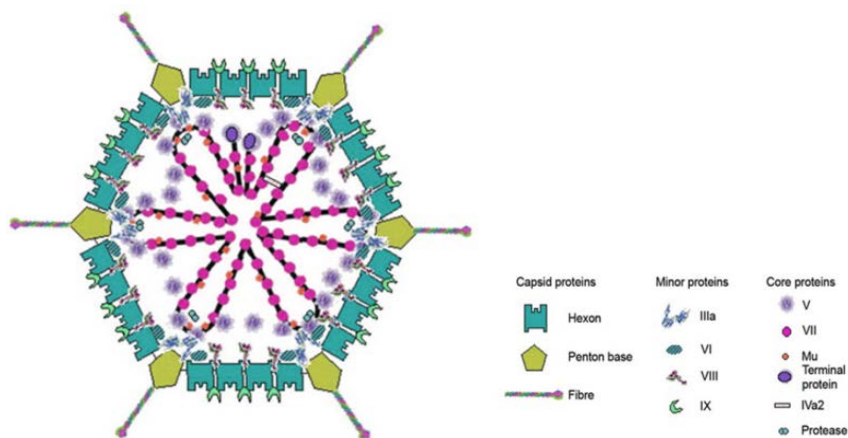
Subgroup	Serotypes	Haemagglutination	การก่อก้อนในหนู	G+C %	Fibre length (nm)
A	12,18,31	IV	High	48-49	28-31
B1	3,7,16,21,50,55	I	Weak	50-52	9-11
B2	11,14,24,35	I	Weak	50-52	9-11
C	1,2,5,6	III	None	57-59	23-31
D	8-10,13,15,17,19, 20,22-30,32,33, 36-39,42-49,51, 53,54	II	None	58	12-13
E	4	III	None	57-61	17
F	40,41	III	None	57-59	29
G	52			55	

สัณฐานวิทยา

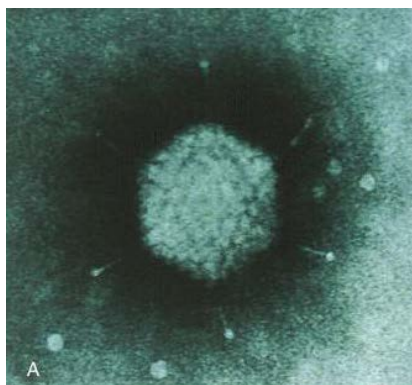
อิวแมนอะดีโนไวรัสถูกจัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Adenoviridae* สกุล (genus) *Mastadenovirus* ไม่มี envelope มีสารพันธุกรรมเป็น ดีเอ็นเอสายคู่และเป็นเส้นตรง (Double-strand DNA) มีขนาดตั้งแต่ 26,000 ถึง 45,000 นิวคลีโอไทด์ จัดเป็นไวรัสขนาดกลางมีขนาดประมาณ 70-90 นาโนเมตร [17]

โครงสร้างของอิวแมนอะดีโนไวรัส

โครงสร้างอนุภาคอิวแมนอะดีโนไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 3 กลุ่ม คือ major capsid protein, minor capsid, และ core protein ดังรูปที่ 1 ซึ่ง major capsid protein เป็นโครงสร้างหลักของไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ hexon, penton, และ fiber โดย hexon มี 240 capsomers ประกอบกันเป็นรูปทรงกลมที่มีสามเหลี่ยมด้านเท่าจำนวน 20 ด้านประกอบกัน (icosahedral) โดยมี penton อยู่ที่มุมทั้ง 12 มุมของอนุภาคไวรัส ซึ่งบริเวณนี้มีเส้น fiber ยาวยื่นออกมา โดยที่บริเวณปลายของ fiber มีตุ่ม knob ที่สามารถจับกับเม็ดเลือดแดงในปฏิกิริยา hemagglutination test ได้ [43-44] ดังรูปที่ 2 ในขณะที่ minor capsid protein ประกอบด้วย IIIa, VI, VIII และ IX ส่วน core protein ประกอบด้วย V, VII, X, Iva2 และ terminal protein [45-46]



รูปที่ 1 แสดงโปรตีนที่ประกอบกันเป็นโครงสร้างของอะดีโนไวรัส [47]



รูปที่ 2 แสดงอนุภาคของอะดิโนไวรัสโดยการเตรียมตัวอย่างจาก negative stained แสดงให้เห็นถึง fiber ที่ยื่นออกมา [48]

Major capsid proteins

อนุภาคของอะดิโนไวรัสประกอบด้วยโมเลกุลของ polypeptide มากกว่า 7,200 โมเลกุล ที่มีน้ำหนักประมาณ 150×10^6 กิโลดาลตัน (kDa) โดยส่วนของโปรตีน hexon เป็นส่วนที่ใหญ่และพบมากที่สุดในโครงสร้างโปรตีนของอะดิโนไวรัส โดย 720 hexon monomers จะอยู่ใน virion ซึ่งประกอบด้วย 240 hexon homotrimers หรือ capsomers ประกอบกันเป็นรูปทรงกลมที่มีสามเหลี่ยมด้านเท่าจำนวน 20 ด้านประกอบกัน (icosahedral) โดยที่แต่ละด้านจะมี 12 capsomers ส่วน major capsid protein อีกสองชนิดคือ fiber และ penton base รวมกันเรียกว่า penton complexes ซึ่งประกอบด้วย protein IV 3 subunit และ protein III 5 subunit ซึ่งมีอยู่ที่มุมของอนุภาคของไวรัส Minor capsid protein IIIa จะอยู่บริเวณขอบของ capsomers และ hexamer ของ protein VI อยู่บริเวณใต้ penton base [49] ฉะนั้น 240 capsomers และ 12 penton complexes จะประกอบกันเป็นรูปทรง icosahedral โดยมี fiber ยาวยื่นออกมาจาก penton base ขนาดประมาณ 10-30 นาโนเมตร และจะแตกต่างกันไปในแต่ละ serotype ทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะของไวรัส [50]

Minor capsid protein

Protein IIIa : precursor ของ Protein IIIa มีน้ำหนัก 67 kDa และถูกตัดที่ตำแหน่ง N-terminal ขณะอยู่ในช่วง maturation ทำให้ได้ protein IIIa น้ำหนัก 63.5 kDa จะอยู่บริเวณขอบของ capsomers อาจมีหน้าที่ในการตอบสนองต่ออุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม [51]

Protein VI : มีน้ำหนัก 22 kDa อยู่บริเวณด้านล่างของ penton base ที่สำคัญคือเป็นทางที่ช่วยนำสารพันธุกรรมเข้ามาในอนุภาคของไวรัส [51]

Protein VIII : เป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณด้านล่างของ hexon capsomers มีหน้าที่ในการสร้างความแข็งแรงให้กับโครงสร้างของอะดีโนไวรัส [51]

Protein IX : เป็นโปรตีนที่มีเฉพาะใน genus *Mastadenovirus* เท่านั้น 12 โมเลกุลของ protein IX จะอยู่ระหว่าง hexon capsomers ที่เรียงกันเป็นรูปทรง icosahedral นอกจากนี้โปรตีนนี้ยังมีหน้าที่ส่งผลต่อขั้นตอน DNA-packaging และ ความสามารถในการถอดรหัสสารพันธุกรรมด้วย [49]

Core protein

Polypeptide VII : เป็น major core protein มีน้ำหนักโมเลกุล 19.4 kDa คิดเป็น 10% ของมวลโปรตีนทั้งหมดของ virion [52]

Polypeptide V : มีน้ำหนักโมเลกุล 41.7 kDa [52]

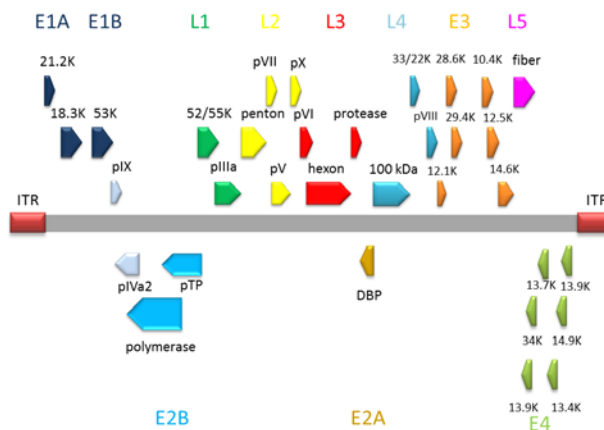
สารพันธุกรรมของฮิวแมนอะดีโนไวรัส

สารพันธุกรรมของอะดีโนไวรัสเป็น ดีเอ็นเอสายคู่ และเป็นเส้นตรง (Double-strand DNA) ซึ่งประกอบด้วย inverted terminal repeat (ITR) อยู่ที่ปลายของ 5'และ 3' โดยจะทำหน้าที่คล้าย Origins of replication อะดีโนไวรัสมีขนาดตั้งแต่ 26,000 ถึง 45,000 นิวคลีโอไทด์ และ ITR มีขนาด 36 - 371 bp เปอร์เซ็นต์ของเบส G+C มีประมาณ 33.7%-63.8% ในส่วนช่วงบริเวณกลางจีโนมของอะดีโนไวรัสจะเป็นช่วงอนุรักษ์นิยม (conserved) ในสมาชิกของวงศ์ *Adenoviridae* แต่ช่วงบริเวณปลายทั้งสองด้านของอะดีโนไวรัสเป็นช่วงที่มีความหลากหลายมาก [17]

องค์ประกอบของจีโนมอะดีโนไวรัส

องค์ประกอบของจีโนมอะดีโนไวรัสประกอบด้วยยีนที่สามารถถอดรหัสได้ทั้งหมด 12 ยีน ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสทั้ง 2 ทิศทาง โดยที่แต่ละยีนแบ่งตามระยะการแสดงออกได้เป็น early , intermediate, และ late regions โดยที่ early region ประกอบด้วยยีน 4 กลุ่ม คือ E1, E2, E3 และ E4 ซึ่งจำเป็นสำหรับการเพิ่มสารพันธุกรรมของไวรัส ซึ่งบริเวณ early regions มีความหลากหลายบริเวณตำแหน่ง E3 ซึ่งบริเวณที่มีความแตกต่างกันมากของลำดับนิวคลีโอไทด์แม้แต่ใน subgroup เดียวกัน บริเวณ E2 จะเป็นช่วงอนุรักษ์นิยม (conserved) ในสมาชิกของวงศ์ *Adenoviridae* ในขณะที่ความยาวและลำดับของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ E1, E3 และ E4 จะมีความแตกต่างกันมากในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัส ในขณะที่ intermediate region ประกอบด้วย IX และ IVa2 มีส่วนช่วย

กระตุ้นการ encode โปรตีนของ Late region ส่วน Late region ประกอบด้วยยีน 5 กลุ่ม คือ L1, L2, L3, L4 และ L5 ซึ่งจะประกอบกันเป็นโครงสร้างของไวรัส [17] ดังรูปที่ 3

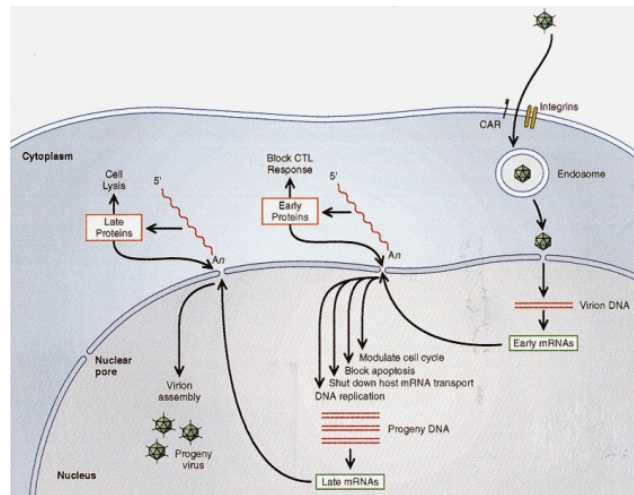


รูปที่ 3 แสดงจีโนมและโปรตีนที่ encode จากยีนของฮิวแมนอะดีโนไวรัส(ดัดแปลงจาก [53])

การเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส (replication cycle of HAdV)

เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์เยื่อ โดยเชื้อไวรัสจะใช้ส่วนของ knob ที่อยู่บริเวณปลาย fiber จับกับ coxsackie-adenovirus receptor (CAR) ซึ่งเป็น receptor บนผิวเซลล์ [54] ดังรูปที่ 4 หลังจากนั้นจะเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง penton base ของเชื้อไวรัสกับ integrins ของเซลล์ โดยเชื้อไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ในรูปของ endosome จากนั้น capsid ของไวรัสบางส่วนจะถูกย่อยโดย virus-coded protease และถูกขนส่งไปยังนิวเคลียสเพื่อเพิ่มจำนวนของไวรัส [55] โดยการเพิ่มจำนวนไวรัสแบ่งเป็น 3 phases คือ early phase, intermediated phase และ late phase โดยไวรัสจะเริ่มการถอดรหัสได้ early mRNAs ซึ่งมี 5 แห่งจากจีโนมทั้งสองสายของไวรัสคือ E1A, E1B, E2, E3 และ E4 โดยมีการสร้างโปรตีน E1A ขึ้นมาก่อนเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่กระตุ้น interferon บน โสสต์เซลล์ พร้อมทั้งกระตุ้นทำให้มีการถอดรหัสพันธุกรรมและทำให้เซลล์เข้าสู่ S phase แล้วจึงมีการสร้าง early proteins อื่นๆอีกประมาณ 20 ชนิด เพื่อใช้เพิ่มจำนวน DNA ของไวรัส นอกจากนั้นโปรตีน E1B ยับยั้งการเกิด apoptosis ของเซลล์ จากนั้นมีการสร้างโปรตีนจาก intermediated phase เพื่อกระตุ้นการถอดรหัสพันธุกรรมของ late genes เพื่อสร้าง structure protein โดยโปรตีนเหล่านี้จะประกอบเป็น empty-shell capsids ในนิวเคลียส จากนั้น naked DNA จะถูกใส่เข้ามาภายหลัง ตามด้วย precursor core proteins ซึ่งจะถูกละลาย และมีการเติม pentons

base เข้าไป รวมกันเป็นไวรัสที่สมบูรณ์ จากนั้นไวรัสจะออกจากเซลล์โดยทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสของโฮสต์เซลล์ [12]



รูปที่ 4 แสดงการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส[56]

ตารางที่ 2 แสดงหน้าที่ของโปรตีนของฮิวแมนอะดิโนไวรัส [47,57]

Transcription class	Function				
E1A	Non-structural proteins กระตุ้นให้มีการถอดรหัสพันธุกรรมและทำให้ cell เข้าสู่ s phase				
E1B	Non-structural proteins ยับยั้งการ apoptosis				
E2A	Non-structural proteins ช่วยในการ replication ของไวรัส				
E2B	Precursor ของ terminal protein และ DNA polymerase				
E3	Non-structural proteins เกี่ยวข้องกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันของ host				
E4	Non-structural proteins ช่วยในการ transcription และ post transcription ของไวรัส				
L1	52/55k Non-structural proteins ช่วยในการประกอบตัวของไวรัส				
L2	<table border="0"> <tr> <td>X</td> <td rowspan="3">} encode ได้โปรตีนที่เต็มไปด้วย arginine และ lysine ช่วยในการจับกับ DNA ของไวรัส</td> </tr> <tr> <td>VII</td> </tr> <tr> <td>V</td> </tr> </table>	X	} encode ได้โปรตีนที่เต็มไปด้วย arginine และ lysine ช่วยในการจับกับ DNA ของไวรัส	VII	V
X	} encode ได้โปรตีนที่เต็มไปด้วย arginine และ lysine ช่วยในการจับกับ DNA ของไวรัส				
VII					
V					
	III penton base protein				

ตารางที่ 2 แสดงหน้าที่ของโปรตีนของฮิวแมนอะดีโนไวรัส [47,57] (ต่อ)

Transcription class	Function
L3	Protease VI ช่วยให้โครงสร้างของ hexon คงรูป II Hexon protein
L4	33/22k Non-structural proteins precursor protein VIII ช่วยให้โครงสร้างของ hexon คงรูป 100kDa ทำให้ hexon protein พับเข้าเป็นทรงสามเหลี่ยม
L5	fiber
Intermediate	IX ช่วยกระตุ้นการ encode ของ Late region IVa2 ช่วยในการ packaging DNA ของไวรัส

ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์และความสำคัญทางคลินิกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสตัวแรกที่พบแยกเชื้อไวรัสได้จาก adenoid tissue [36] HAdV สามารถแบ่งได้ 7 subgroup (HAdV-A, HAdV-B, HAdV-C, HAdV-D, HAdV-E, HAdV-F, HAdV-G) ปัจจุบันมี 57 serotypes [58] ฮิวแมนอะดีโนไวรัสสามารถก่อให้เกิดโรคได้อย่างมากมาย ในหลายระบบ เช่น ระบบทางเดินหายใจ, ระบบทางเดินปัสสาวะ, ระบบทางเดินอาหาร, ตา [1] ผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ส่วนใหญ่สามารถหายเองได้ [50] ฮิวแมนอะดีโนไวรัสเป็นดีเอ็นเอไวรัสชนิดเดียวในจุลชีพที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ [59] โดยที่แต่ละ serotype ของเชื้ออะดีโนไวรัสก่อให้เกิดโรคในแต่ละระบบในมนุษย์อย่างชัดเจน [60] ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

Species	Serotypes	Common diseases syndromes
A	12, 18,31	Gastroenteritis
B	3,7,11,14,16,21,34,35,50,55	Upper and lower respiratory infection, Acute respiratory disease, pharyngoconjunctival fever
C	1,2,5,6	Upper and lower respiratory infection ในเด็ก

ตารางที่ 3 แสดงสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส (ต่อ)

Species	Serotype	Common diseases syndromes
D	8-10,13,15,17,19,20,22- 30,32,33,36-39,42-49,51,53,54	Epidemic keratoconjunctivitis , Conjunctivitis
E	4	Acute respiratory disease, pharyngoconjunctival fever
F	40,41	Gastroenteritis
G	52	Gastroenteritis

Subgroup A

HAdV-A (serotype 12, 18, 31) พบได้อย่างจำเพาะในการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร [61] แต่ยังคงพบได้น้อยในปัจจุบัน จากการศึกษาของ Kampmann และ Echavarría พบว่า HAdV-A มีความสามารถก่อให้เกิดเนื้องอกในหนูได้มากกว่าฮิวแมนอะดีโนไวรัสสายพันธุ์อื่น HAdV-A สามารถแยกเชื้อไวรัสจากเลือดของผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ [4-5] HAdV-31 พบได้ในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระและปัสสาวะของผู้ป่วย severe combined immunodeficiency disease (SCID) และผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไขกระดูกที่มีอาการปอดบวม ติดเชื้อที่ตับ ท้องร่วง และ acute haemorrhagic cystitis [62]

Subgroup B

HAdV-B แบ่งตามการตอบสนองต่อสิ่งเร้าและรูปแบบของ restriction cleavage ได้เป็น HAdV-B1 และ HAdV-B2 HAdV-3 และ HAdV-7 ซึ่งเป็นสมาชิกใน HAdV-B1 พบได้บ่อยในการระบาดของติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและการติดเชื้อที่ตาในหลายๆสองถึงสามปี โดยเชื้อไวรัสเหล่านี้มีรายงานว่าสามารถก่อความรุนแรงได้ในเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ซึ่งไวรัสจะทำความเสียหายอย่างรุนแรงในปอด [13] HAdV-B พบในการระบาดของ febrile respiratory tract infection และโรคปอดบวมในค่ายทหารในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2004 เชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้มีความสำคัญในการก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง [63] องค์การอนามัยโลกได้รายงานว่าสามารถแยกเชื้อ HAdV-B1 คือ HAdV-3 และ HAdV-7 คิดเป็น 13% และ 20% ตามลำดับ เมื่อคำนวณจากเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสทั้งหมดที่สามารถแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ และจะมีช่วงของการระบาดประมาณสี่ถึงห้าปีต่อการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ รูปแบบของการระบาดของ HAdV-7 มีสามรูปแบบดังนี้ 1.) ระบาดในช่วงฤดูหนาว 2.) ระบาดในกลุ่มเด็กในโรงเรียนหรือสถานรับเลี้ยงเด็ก 3.) ระบาดในค่ายทหาร ซึ่งสามารถพบ HAdV-4, HAdV-14, HAdV-21 ในการระบาดด้วย

[2, 19, 61, 63] ส่วน HAdV-B2 พบว่าแยกเชื้อได้จากระบบทางเดินปัสสาวะ [61] การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่ไตส่วนมากจะมีสาเหตุจาก HAdV-11, HAdV-34, HAdV-35 และเชื้อไวรัสเหล่านี้สามารถแยกได้จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก [2]

Subgroup C

HAdV-1, HAdV-2, HAdV-5, HAdV-6 เป็น serotype ที่พบได้บ่อยใน HAdV-C มีรายงานพบการติดเชื้อในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ ประมาณ 5%, 15% ในการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบน และทางเดินหายใจส่วนล่าง ตามลำดับ และ serotype เหล่านี้ยังมีรายงานการระบาดเกิดขึ้นทั่วโลก พบว่าครึ่งหนึ่งของเด็กอายุ 4 ขวบมีแอนติบอดีต่อ HAdV-1 หรือ HAdV-2 นอกจากนี้การติดเชื้อ HAdV-C สามารถ shedding ในร่างกายของ host แม้ว่าบริเวณที่ติดเชื้อไวรัสที่แรกจะเป็นระบบทางเดินหายใจ แต่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากอุจจาระ ซึ่งเชื้อไวรัสจะสามารถอยู่ในอุจจาระได้นานเป็นเดือน หรือแม้กระทั่งปี โดยที่การตรวจหาเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจมีผลเป็นลบ [64] นอกจากนี้องค์การอนามัยโลกได้รายงานไว้ว่า 50% ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่แยกได้เป็น HAdV-C [2]

Subgroup D

HAdV-D สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ยกเว้น HAdV-10 และ HAdV-19 มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคเยื่อปอดและกระจกตาอักเสบ [65] มีรายงานการระบาดของโรคเยื่อปอดและกระจกตาอักเสบเป็นระยะๆของ HAdV-19 และ HAdV-37 ซึ่งจะเป็นแหล่งชุมชนคนหนาแน่นประกอบกับมีสภาพอากาศแห้ง [66]

Subgroup E

HAdV-4 สามารถแยกได้จากค่ายฝึกทหารในสหรัฐอเมริกาที่มีการระบาดของ acute respiratory illness ในช่วงฤดูหนาวของปี ค.ศ.1952 ถึง 1953 [67] ในการศึกษาของ Purkayastha ในปี ค.ศ. 2005 โดยใช้วิธี early restriction enzyme digestion analysis พบว่า HAdV-4 อาจจะมีต้นกำเนิดมาจากการติดเชื้อไวรัสจากลิงชิมแปนซีผู้คน [68]

Subgroup F

Subgroup F ถูกจัดให้เป็น enteric HAdVs (HAdV40 และ HAdV-41) มีความสำคัญในการก่อโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็กทั่วโลก เป็นอันดับสามรองจากโรตาไวรัส และ โนโรไวรัส [69] การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่มีฤดูกาลที่แน่นอน บางครั้งสามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากคนปกติที่ไม่มีอาการ [2]

Subgroup G

HAdV-G (HAdV-52) แยกเชื้อได้ครั้งแรกใน Los Angeles ในปี 2003 จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารและพบว่าเป็น subgroup ล่าสุดของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส [15]

Phylogenetic ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการจำแนกเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสออกเป็น 7 subgroups (species) ตั้งแต่ A-G ซึ่งปัจจุบันมีสมาชิกอยู่ 57 serotypes [13-16] นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเชื้อ HAdV โดยใช้ความรู้ทางอนุชีววิทยาได้อีกด้วย ซึ่งยีนที่นำมาใช้คือ Hexon จะถอดรหัสออกมาได้เป็นโปรตีน Hexon ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 919-968 ตัว [56] มี hypervariable region (HRVs) 7 ตำแหน่ง โดยข้อมูลทางพันธุกรรมในบริเวณนี้ได้ถูกใช้ศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลเป็นหลัก [70]

พยาธิสภาพของการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

พยาธิสภาพของการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสต่างกันไปในแต่ละ subgroup, serotype, ความจำเพาะของอวัยวะ, และรูปแบบของการเกิดโรค [1, 71] อะดีโนไวรัสสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ในอวัยวะเดียวหรือมากกว่าหนึ่งอวัยวะก็ได้ ซึ่งเหตุผลนี้ทำให้การเกิดโรคนั้นแพร่กระจายไปในอวัยวะหลายระบบ จึงส่งผลให้มีการเพิ่มอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ [5] การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสเกิดขึ้นในเซลล์เยื่อ (epithelial cell) มีระยะฟักตัวของโรคนานประมาณ 7-13 วัน โดยทำให้เนื้อเยื่อเสียหายจากการเกิด cytotoxicity หรืออาจจะก่อให้เกิดการอักเสบขึ้น [7] ผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสทำให้ร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ serotype เดิมในครั้งที่สองและสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดิมแบบเรื้อรังได้ [72] ถึงแม้ว่าการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสจะไม่ก่อโรครุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต แต่มีหลักฐานรายงานว่าทำให้ก่อโรคเรื้อรังได้ โดยเฉพาะ HAdV-C [64] การศึกษาของ Leen และ Rooney พบว่า Non-specific effector cells เช่น natural killer cells และ macrophages และ antigen-specific T- และ B lymphocytes เป็นตัวตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของฮิวแมนอะดีโนไวรัส [60] ผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสร่างกายจะสร้าง specific antibodies ของ subgroup และ serotype ต่อสายพันธุ์ที่ทำให้ติดเชื้อนั้นๆ โดยที่ Group-specific antibodies ไม่สามารถทำปฏิกิริยา neutralizing ได้ ในขณะที่ Type-specific antibodies สามารถเกิดการ neutralizing ได้โดย แอนติบอดีจะเข้าจับตรงบริเวณ hypervariable ที่อยู่บนผิวอนุภาคของไวรัส เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสในร่างกาย [1, 60, 70] หลังจากทีแอนติบอดีจับกับไวรัสแล้วจะถูกกำจัดด้วย cellular immune

response โดย CD4⁺ และ CD8⁺ T cells [73] ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส เป็นหนึ่งในเชื้อฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดอาการรุนแรง เรื้อรัง และบางครั้งอาจถึงแก่ชีวิตได้ [60]

ลักษณะอาการทางคลินิก

การติดเชื้ออะดีโนไวรัสส่วนใหญ่จะพบได้ทั่วไปในเด็กช่วงอายุขวบปีแรกทั่วโลก ผู้ป่วยหนึ่งคนสามารถติดเชื้ออะดีโนไวรัสได้มากกว่าหนึ่ง serotype เพราะวาระบบภูมิคุ้มกันด้านทานของร่างกายต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นแบบ type-specific [62]

การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่กระเพาะอาหารและลำไส้

HAdV-40 และ HAdV-41 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในเด็กประมาณ 4% – 5% นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสสายพันธุ์อื่นในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระได้ เช่น HAdV-C1, HAdV-C2, HAdV-B3, HAdV-C5, HAdV-B7, HAdV-A31 มีระยะการเพาะเชื้อไวรัส 8-10 วัน และระยะเวลาที่แสดงออกของโรค ท้องเสียหลังได้รับเชื้อไวรัสมาประมาณ 3-11 วัน [7] ลักษณะของอุจจาระเป็นของเหลว ไม่มีเลือดและเมือกเลือดขาวออกมา นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้ มีไข้ ปวดช่องท้อง และขาดน้ำร่วมด้วย [2,74] อาการท้องเสียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสส่วนมากพบบ่อยในเด็กอายุต่ำกว่า 4 ปี และไม่สามารถแยกได้จากอาการที่เกิดจากเชื้อโรตาไวรัสได้ [42, 75] กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ enteric HAdV (HAdV-F40 และ HAdV-F41) จะมีระยะเวลาการแสดงออกของโรคนานกว่าการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก non enteric HAdV และพบว่า HAdV-F41 มีระยะเวลาการแสดงออกของโรคนานมากกว่า HAdV-F40 [7] ในผู้ป่วยระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องส่วนมากที่มีอาการกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบได้บ่อยคือ HAdV-A31, HAdV-C2, HAdV-F40 และ HAdV-F41 ในขณะที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอดส์ (AIDS) จะพบ HAdV-D serotype 42 ถึง 49 เป็นส่วนมาก [62] ซึ่งถ้าตรวจพบเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่ shedding มาในอุจจาระจะมีความเกี่ยวข้องกับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและมีอัตราการเสียชีวิตสูง [76]

การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในระบบทางเดินหายใจ

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (Upper respiratory tract infection ; URTI) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสนั้นไม่สามารถแยกได้จากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนที่มาจากเชื้อไวรัสอื่นๆ ลักษณะอาการที่พบบ่อย ได้แก่ ไอ คัดจมูก เจ็บคอ ต่อม้ำเหลืองบริเวณลำคอโต การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ส่วนใหญ่พบในเด็กในช่วงวัยขวบปีแรกและสามารถหายได้เองหรือมีอาการเพียงเล็กน้อย [74] การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

(Lower respiratory tract infection ; LRTI) เช่น หลอดลมอักเสบ หลอดลมฝอยอักเสบ ปอดบวม ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสส่วนมากจะพบ HAdV-B3, HAdV-B7, HAdV-B21 และ HAdV-E4 ส่วน HAdV-C5 มีความสัมพันธ์กับการเกิด pertussis-like syndrome ในขณะที่ HAdV-E4 และ HAdV-B7 มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอย่างเฉียบพลันในค่ายทหารของสหรัฐอเมริกา [77]

โรคตาอักเสบ

เชื้อไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดโรคตาอักเสบได้ เช่น pharyngoconjunctival fever , keratoconjunctivitis และ conjunctivitis pharyngoconjunctival ซึ่งคิดได้จากสละเยื่อ น้ำ ส่วนใหญ่พบในเด็ก [78] อาการเริ่มต้น คือ มีไข้สูง เจ็บคอ อาเจียน ท้องเสีย เยื่อบุตาอักเสบ เป็นโรคที่ติดต่อกันง่าย จึงทำให้สามารถระบาดได้เป็นวงกว้างตามโรงเรียน ค่ายทหาร หรือ โรงพยาบาล [7] HAdV-C (-1, -2, และ -5) ที่ก่อให้เกิดโรคตาอักเสบมีรายงานการระบาดในระดับท้องถิ่น ในขณะที่ HAdV-B3 และ HAdV-B7 เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดเป็นวงกว้างของ pharyngoconjunctival fever โรคนี้จะมีระยะเวลาฟักตัวประมาณ 6 วัน [2]

การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในทางเดินปัสสาวะและในระบบสืบพันธุ์

Haemorrhagic cystitis ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสมีความเกี่ยวข้องกับ HAdV-B11 และพบว่าการติดเชื้อไวรัสในเด็กตรวจพบในเด็กผู้ชายมากกว่าเด็กผู้หญิง [7] HAdV-C2, HAdV-D19 และ HAdV-D37 สามารถทำให้เกิด herpes-like genital lesion ได้ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบที่บริเวณอวัยวะ, ปากมดลูก หรือท่อปัสสาวะได้ [79]

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

Serology

การตรวจ Group-specific ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสสามารถทำได้โดยใช้วิธี EIA หรือ complement fixation assay แต่ในขณะที่ serotype-specific ตรวจได้จาก haemagglutination inhibition หรือ neutralization assay แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวอาจให้ผลบปปลอม ที่มาจากผู้ป่วยที่ร่างกายไม่ได้มีหรือมีน้อยในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส หรือ อาจจะให้ผลบปปลอมในผู้ป่วยที่มี heterotypic anamnestic response [5, 79]

Viral isolation

วิเคราะห์ผลโดยดูจากลักษณะของ cytopathic effect (CPE) ภายใน 2 ถึง 7 วัน หลังจากเพาะเชื้อไวรัส จากนั้นนำ cell culture มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี fluorescent antibody staining [42, 77]

Viral detection

Electron microscopy

การวิเคราะห์หาเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องทำการย้อมสิ่งส่งตรวจด้วย negative stain ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน [80]

Viral antigen detection

Rapid diagnosis ของเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายวิธีเช่น EIA, radioimmunoassay (RIA), direct IF antibody techniques และ immunochromatographic assay [81]

Molecular- based method

การตรวจวิธีนี้จะเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัส อีกทั้งยังมีความไว และจำเพาะในการตรวจและเมื่อเปรียบเทียบกับ PCR method กับวิธีตรวจอื่นๆที่กล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้พบว่ามีความไวและจำเพาะมากกว่า [7]

อุบัติการณ์ของโรค

เชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสสามารถก่อโรคได้ในทุกกลุ่มอายุ แต่กลุ่มอายุที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้มากที่สุดคือในเด็กอายุช่วงขวบปีแรก โดยผู้ป่วยสามารถหายจากโรคได้เองหรือแสดงอาการเล็กน้อย [82] การระบาดของเชื้ออีวแมนอะดิโนไวรัสเกิดขึ้นทั่วโลก หรือมีการระบาดระดับท้องถิ่น หรือเกิดการระบาดเฉพาะที่ [72] การระบาดเกิดขึ้นในชุมชนแออัด เช่น โรงเรียน , สถานที่เลี้ยงเด็ก , ค่ายทหาร การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีการระบาดช่วงปลายฤดูหนาว ฤดูใบไม้ผลิ และช่วงต้นฤดูร้อน [83]

ตารางที่ 4 แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในประเทศต่างๆ

ประเทศ	ตัวอย่าง	กลุ่มทดสอบ	วิธีทดสอบ	ความชุก	ปีที่ทำการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
ปาเลสไตน์	Nasopharyngeal aspirate	เด็กอายุต่ำกว่า 7 ขวบ	PCR	4.20%	2005-2010	[25]
อิสราเอล	Nasopharyngeal aspirate	เด็กอายุต่ำกว่า 18 ขวบ	PCR	18.30%	2006-2008	[31]
บราซิล	Nasopharyngeal aspirate	เด็กไม่บอกอายุ	PCR	7.10%	2000-2007	[26]
ไทย	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 15 ขวบ	PCR	1.50%	2006-2007	[35]
ไต้หวัน	Throat/nasal swab	เด็กอายุต่ำกว่า 18 ขวบ	PCR	10%	2011	[84]
ไทย	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 7 ขวบ	ELISA	6.20%	1988	[85]
จีน	Throat/nasal swab	เด็กอายุต่ำกว่า 14 ขวบ	PCR	0.90%	2005-2007	[23]
อินเดีย	fecal	เด็กไม่บอกอายุ	PCR	7.80%	2005-2007	[86]
ฮ่องกง	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 18 ขวบ	Multiplex PCR	3%	2008	[87]
ฝรั่งเศส	fecal	เด็กไม่บอกอายุ	ELISA	5%	2007	[88]
เวเนซุเอล่า	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ	PCR	5%	2003	[89]
เกาหลี	fecal	ไม่กำหนดอายุ	PCR	2.60%	2001-2005	[90]
ญี่ปุ่น	rectal swab	เด็กอายุต่ำกว่า 14 ขวบ	PCR	4.80%	2003-2005	[69]
มาเลเซีย	Throat/nasal swab	เด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ	Immunofluorescence staining และ viral isolation	5%	1982-2008	[33]
เปรู	Oropharyngeal swabs	ไม่กำหนดอายุ	PCR	6.20%	2000-2010	[27]

ตารางที่ 4 ความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในประเทศต่างๆ (ต่อ)						
ประเทศ	ตัวอย่าง	กลุ่มทดสอบ	วิธีทดสอบ	ความชุก	ปีที่ทำการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
จีน	Throat/pharyngeal swab	เด็กอายุต่ำกว่า 14 ขวบ	PCR	4.90%	2006-2008	[91]
มาเลเซีย	Nasopharyngeal aspirate	เด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ	PCR	<2%	1999-2005	[24]
แคนาดา	Throat/nasal swab	เด็กอายุต่ำกว่า 4 ขวบ	PCR	7.73%	2007-2008	[28]
ฮังการี	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 15 ขวบ	PCR	81%	2003-2006	[92]
บังคลาเทศ	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 4 ขวบ	PCR	1.90%	2004-2005	[34]
ญี่ปุ่น	fecal	เด็กอายุต่ำกว่า 15 ขวบ	PCR	7.90%	1995-2009	[93]

การแพร่เชื้อของฮิวแมนอะดีโนไวรัส

เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสสามารถแพร่กระจายได้ง่ายโดยเชื้อไวรัสจะเข้าทางปาก ทางเดินหายใจ และ เยื่อบุตา [94] ดังนั้นการระบาดของเชื้ออะดีโนไวรัสจึงมีโรคที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับรูปแบบการติดเชื้อโดยจะขึ้นอยู่กับ serotype ที่เข้าไปและอายุของผู้ป่วย [42] การแพร่กระจายหลักของเชื้อไวรัสคือติดต่อจากคนสู่คน โดยการสัมผัส หายใจ และการกิน [6] ทั้งนี้มีรายงานว่าสามารถติดเชื้อไวรัสจากสหรน้ำเพราะเชื้อไวรัสมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม [17]

การรักษาและป้องกัน

มีรายงานการรักษาผู้ที่ติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสโดยใช้ ribavirin และ cidofovir แต่การรักษาตอบสนองได้ในบางส่วนของผู้ป่วย [2, 7] ขณะที่การป้องกันการติดเชื้อไวรัสในแหล่งชุมชนก็ยังไม่ประสบความสำเร็จ [74] ในการป้องกันเชื้อไวรัสในโรงพยาบาลสามารถทำได้โดยรักษาความสะอาดของอุปกรณ์ที่ใช้และล้างมือก่อนและหลังทำการรักษาผู้ป่วย [7]

การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) [95]

เทคนิคนี้ค้นพบโดย Kary Mullis ในปี 1986 เป็นการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมให้มีจำนวนมากในเวลาอันสั้น อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวขึ้น โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 18-20 เบส (ไพรเมอร์) คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของเอนไซม์คือสามารถทนความร้อนได้กว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้เอนไซม์ไม่เสียสภาพในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีอุณหภูมิสูง-ต่ำต่างกันมาก ซึ่งเทคนิคนี้มีประโยชน์เป็นอย่างมากและใช้กันอย่างกว้างขวาง

หลักการ PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นกระบวนการที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยๆ (1-10 นาโนกรัม) เพื่อที่จะใช้ประโยชน์ต่อไป

ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และ ปลาย 3'
3. ดีโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP
4. DNA polymerase
5. โคแฟกเตอร์ของ DNA polymerase ได้แก่ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+}

PCR มีอยู่ 3 ขั้นตอนหลัก จะวนซ้ำๆกัน 3 ขั้นตอนเพื่อเพิ่มสารพันธุกรรมให้มากขึ้น ทวีคูณตามรอบของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นจนสามารถวัดได้ ดังรูปที่ 5 มีขั้นตอนดังนี้

1. การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของดีเอ็นเอ (DNA denaturation)
เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ(DNA)ที่เป็นเกลียวคู่ หรือ Double Strand DNA ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆจนกลายเป็นดีเอ็นเอ(DNA)สายเดี่ยว หรือ Single Strand DNA (คือ สภาพ Denatured DNA) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้แตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของเบส (%GC content) ในสายดีเอ็นเอที่ทำให้ความสามารถในการทนความร้อนต่างกัน

การคำนวณค่า Melting temperature (T_m)

กรณี DNA primer มีความยาวน้อยกว่า 14 เบส

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

กรณี DNA primer มีความยาวมากกว่า 14 เบส

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

กำหนดให้ A, T, G, C แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์ในแต่ละไพรเมอร์

N แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

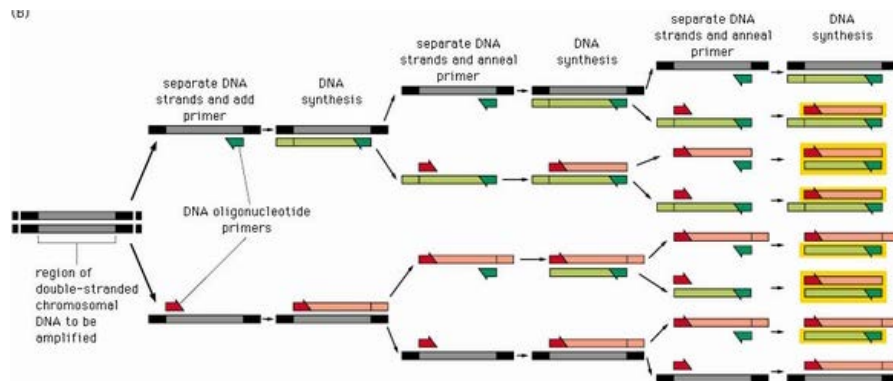
2. การจับเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอต้นแบบกับดีเอ็นเอไพรเมอร์ (Annealing)

เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆและใส่ไพรเมอร์ ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส(Complementary base pair)ระหว่างไพรเมอร์ (Primer) กับ Template DNA โดยอุณหภูมิที่ใช้ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

3. การต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส

(Extension)

เป็นขั้นตอนการ ใส่ DNA polymerase ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ(DNA)สายใหม่ หรือ เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ(DNA)ให้มากขึ้น โดยอุณหภูมิที่ใช้ในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส

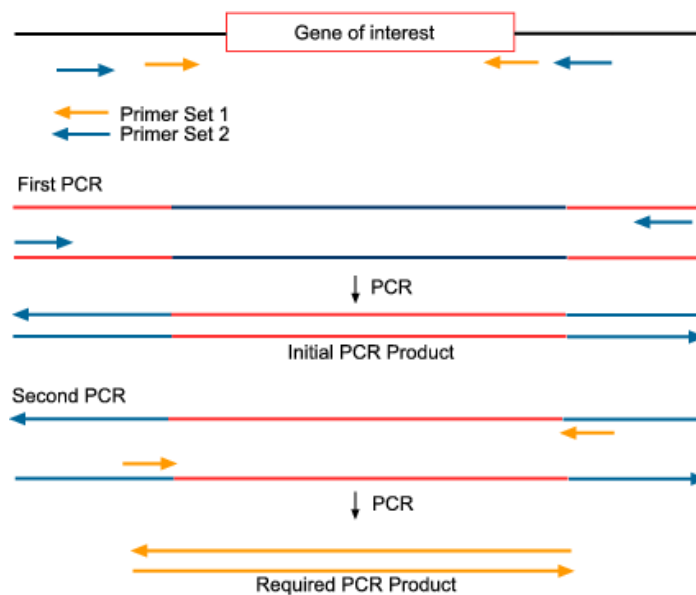


รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนในการเพิ่มสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR แหล่งที่มา

(http://www.atom.rmutphysics.com/charud/oldnews/0/286/15/12/DNA/DNA/polymerase_chain_reaction.htm) สืบค้น ณ วันที่ 13 มีนาคม 2556

Nested- Polymerase chain reaction (Nested-PCR)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทาง PCR เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น Nested-PCR เป็นการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์สองคู่ คู่แรกเป็นการทำ PCR ในวงกว้างเพื่อกำหนดบริเวณช่วงของยีนที่ต้องการ จากนั้นไพรเมอร์คู่ที่สองจะอยู่บริเวณที่แคบลง ทำให้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย Nested-PCR

แหล่งที่มา: (<http://resources.jorum.ac.uk/xmlui/bitstream/handle/123456789/12070/page44.htm>)

สืบค้น ณ วันที่ 13 มีนาคม 2556

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Cross-sectional study) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB No.281/55

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ น้ำล้างโพรงจมูก (nasopharyngeal aspirate), สารคัดหลั่งจากโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) และ อุจจาระ (fecal)

1. ตัวอย่างจากน้ำล้างโพรงจมูกแช่แข็งที่เหลือเก็บจากโครงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนเรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัส โดยกลุ่มตัวอย่างมาจากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2553 ถึงเดือนธันวาคม 2555 จำนวน 501 ตัวอย่าง

2. ตัวอย่างจากสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก แช่แข็งที่เหลือเก็บจากงานตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 หรือ Influenza pH1N1 ซึ่งเป็นงานบริการประจำวันของทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยกลุ่มตัวอย่างมาจาก

โรงพยาบาลชุมแพ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2555 จำนวน 3,414 ตัวอย่าง

โรงพยาบาลทุ่งสง ตั้งแต่เดือนกันยายน 2552 ถึงเดือนมกราคม 2554 จำนวน 1,903 ตัวอย่าง

โรงพยาบาลในเครือบางปะกอก ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2555 จำนวน 3,414 ตัวอย่าง

3. ตัวอย่างที่เป็นอุจจาระแช่แข็งที่เหลือเก็บจากโครงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัส กลุ่มตัวอย่างมาจากโรงพยาบาลชุมแพ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2555 จำนวน 933 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2555 จำนวน 368 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้จะถูกเก็บในรูปแบบนิรนามเพื่อปกป้องสิทธิของผู้ป่วย

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 อัตราความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสของตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินหายใจในการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.28% โดยเฉลี่ย และอัตราความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสของตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินอาหารในการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.65% โดยเฉลี่ย

q คือ 1-p

d คือ ค่าความผิดพลาด เท่ากับ 0.05

เมื่อแทนค่าต่างๆ ในสมการแล้วจะได้จำนวนตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินหายใจเท่ากับ 104 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินอาหารเท่ากับ 122 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยที่สุดที่จะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมกับการศึกษารั้งนี้

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml (Pyrex, USA)
- 1.2 Cuvett: 5 µl, 10 µl (MiralBio, Japan)
- 1.3 Cylinder: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.4 Flask: 250 ml (Pyrex, USA)
- 1.5 Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
- 1.6 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGen, USA)
- 1.7 Parafilm (American Nation Can, USA)
- 1.8 Pipet tip: 10 µl, 200 µl และ 1,000 µl (AxyGen, USA)
- 1.9 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- 1.10 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)
- 1.11 Stirring-magnetic bar

2. อุปกรณ์

- 2.1 Autoclave (Sanyo, Japan)
- 2.2 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)
- 2.3 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- 2.5 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 2.6 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- 2.7 Freezer-20°C (Sanyo, Japan)
- 2.8 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.9 Incubator (Mettmert, Germany)
- 2.10 LightCycler® 480 (Roche, Germany)
- 2.11 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- 2.12 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.13 PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)
- 2.14 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.15 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.16 Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.17 Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)
- 2.18 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.19 UV transilluminator (Fotodyne, USA)
- 2.20 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.21 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1 สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง
 - 3.1.1 Dry cotton or polyester swab
 - 3.1.2 Polypropylene conical tube: 15 mL (AxyGen® Scientific)
 - 3.1.3 Phosphate Buffer Saline (BIO BASIC INC., NY, USA)
 - 3.1.4 Penicillin-Streptomycin (10,000 units/mL)(GIBCO., CA, USA)

3.2 สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (DNA extraction)

3.2.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)

3.2.2 Chloroform (Sigma, MO, USA)

3.2.3 Glycogen (USB, Ohio, USA)

3.2.4 Isoamyl alcohol (BDH, UK)

3.2.5 Isopropanol (Sigma, Singapore)

3.2.6 Phenol (Amresco, OH, USA)

3.2.7 Proteinase K (5PRIME, Germany)

3.2.8 Sodium acetate (Sigma, Singapore)

3.2.9 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)

3.2.10 Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan)

3.3 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR

3.3.1 5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)

3.4 สารเคมีสำหรับทำ gel electrophoresis

3.4.1 Agarose molecular grade (Reserch Organics, OH, USA)

3.4.2 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

3.4.3 GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)

3.5 สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

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

Taiwan)

3.6 สารเคมีสำหรับ cloning และ transformation ใน E.coli

3.6.1 Agar Bacteriological (GIBCO, NY, USA)

3.6.2 FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)

3.6.3 IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendorf,

Germany)

3.6.4 One Shot TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen, NY,

USA)

3.6.5 pGEM-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)

3.6.6 Tryptone powder (BIO BASIC INC., NY, USA)

3.6.7 X-Gal (Promega, CA, USA)

3.6.8 Yeast Extract (GIBCO, NY, USA)

4. โปรแกรมสำหรับ bioinformatics และการวิเคราะห์ข้อมูล

- 4.1 BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1)
- 4.2 Chromas Lite (version 2.01)
- 4.3 OLIGOS primer design software (version 9.1)
- 4.4 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 5.05)
- 4.5 Editseq (version 6.0)
- 4.6 Seqman™II (version 6.0)

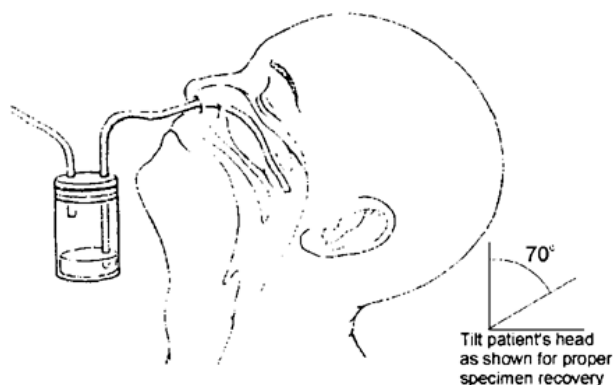
การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

1. Nasopharyngeal swab

การทำ nasopharyngeal swab อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บสิ่งตัวอย่างคือไม้พันสำลี โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือวัดระยะความลึกไม้พันให้พอดีกับ Nasal cavity ให้ผู้ป่วยหายใจเข้ายาว 1 ครั้ง และหายใจออกเต็มที่ หลังจากนั้นกลืนหายใจ สอดไม้พันสำลีเข้าไปในบริเวณโพรงจมูกของผู้ป่วย จากนั้นหมุนไม้ประมาณ 2-3 วินาที แล้วดึงไม้ออก จุ่มปลายไม้ลงใน viral transport media (VTM) โดยหักปลายค้ำไม้ส่วนมือจับทิ้ง ปิดหลอดเก็บตัวอย่างให้สนิท หลังจากนั้นจึงทำการแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube เพื่อทำการสกัดสารพันธุกรรม ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -70°C

2. น้ำล้างโพรงจมูก (Nasopharyngeal aspirate)

การเก็บน้ำล้างโพรงจมูก อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บสิ่งตัวอย่างคือ กระบอกสำหรับเก็บน้ำล้างโพรงจมูก หลอดยางสำหรับสอดเข้าโพรงจมูก และหลอดยางสำหรับต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่ใช้ในการดูด โดยมีขั้นตอนการเก็บดังนี้



รูปที่ 7 แสดงวิธีการเก็บน้ำล้างโพรงจมูก (nasopharyngeal aspirate) [96]

ในขั้นแรกแพทย์หรือพยาบาลจะทำการฉีดย้ำเกลือประมาณ 3-4 มิลลิลิตรเข้าไปในโพรงจมูก จากนั้นจะทำการสอดอุปกรณ์ ดังรูปที่ 7 แล้วทำการดูดน้ำล้างโพรงจมูกเข้าสู่กระบอกเก็บ จากนั้น ตัวอย่างจะถูกเก็บใน viral transport media (VTM) ที่ประกอบด้วยสารละลาย PBS ที่มียาปฏิชีวนะ (Penicillin G (2x10⁶ U/L), Streptomycin 200 mg/liter) หลังจากได้รับตัวอย่างแล้วจะทำการแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube เพื่อทำการสกัดสารพันธุกรรม ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C

3. Fecal sample

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

การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส

ตัวอย่างที่ได้จะนำมาทำการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) โดยมีขั้นตอนดังนี้

แบ่งตัวอย่าง (Nasopharyngeal swab, Nasopharyngeal aspirate, Fecal sample)

ปริมาตร 200 µl ใส่ใน 1.5 microcentrifuge tube



ใส่ VB Lysis 400 µl แล้วผสมให้เข้ากัน



บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

เติม 95% ethanol 500 µl

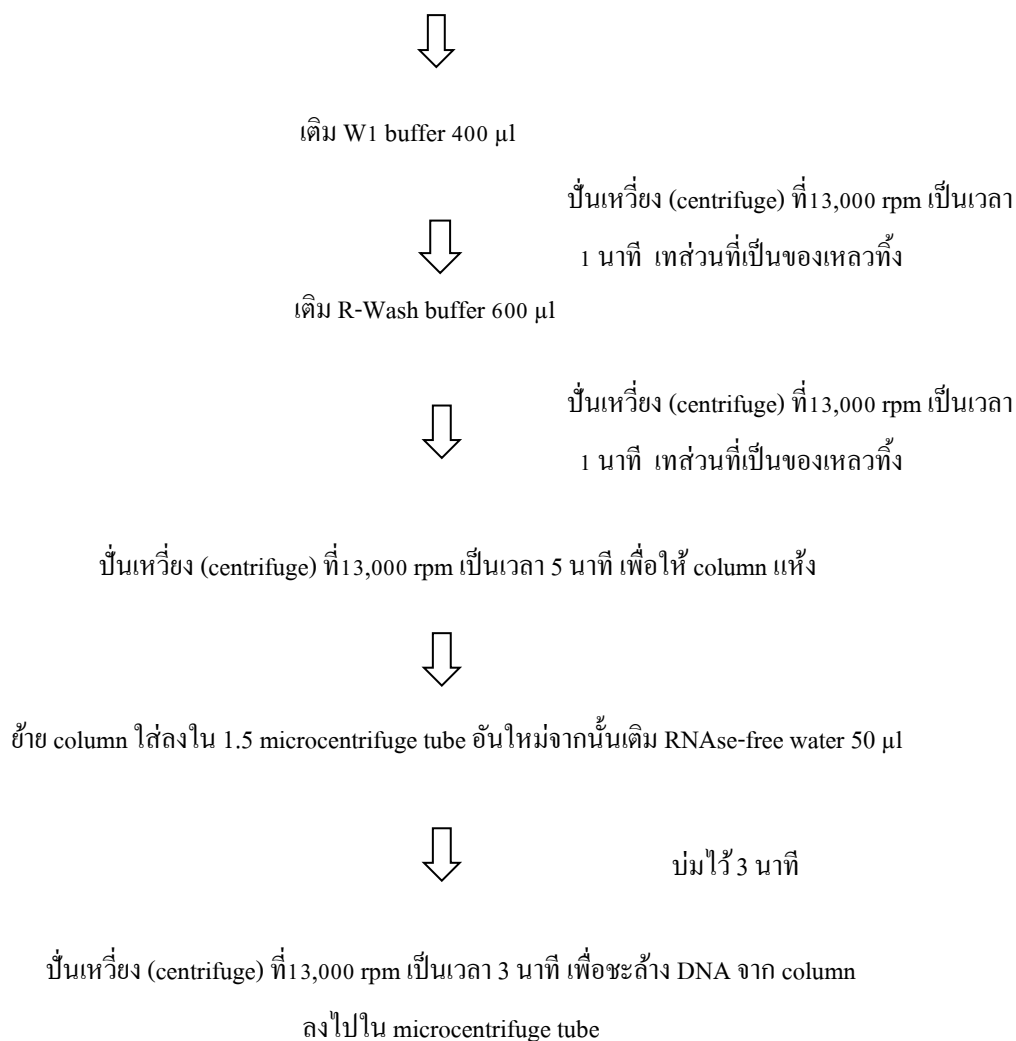


vortex

นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ใน VB lysis



ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง



การตรวจสอบผลการสกัด DNA

1. ทำการตรวจสอบผลการสกัด DNA ด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH ซึ่งเป็น universal housekeeping gene ของ human โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ปริมาณสารต่างๆ และสถานะสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 5-7

2. ตรวจสอบผลการทำ PCR โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR มาผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ 100-1,000 bp DNA ladder (DNA marker) ผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transluminator)

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH

สารละลาย	ปริมาตร (volume/tube)
Distilled water	4.5 μ l
Master Mix	7.5 μ l
Forward primer	0.25 μ l
Reverse primer	0.25 μ l
DNA template	1 μ l
Total volume	13.5 μ l

ตารางที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH

Primer name	Sequence (5' \longrightarrow 3')
GAPDH_F112	GTG AAG GTC GGA GTC AAC GG
GAPDH_R603	GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC

ตารางที่ 7 แสดงสภาวะที่ใช้ทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน GAPDH

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา
1. Pre-denaturation	94 °C	3 นาที
2. Denaturation	94 °C	18 วินาที
3. Annealing	50 °C	21 วินาที
4. Extension	72 °C	1: 30 นาที
ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ		
Final extension	72 °C	10 นาที
	25 °C	5 นาที

การเตรียม Positive control ด้วยวิธี cloning

1. Ligation ระหว่าง PCR product กับ plasmid (pGEM[®]-T Easy Vector) เตรียม mixture ดังนี้

2x Rapid Ligation buffer	5.0 μ l
T4 DNA ligase	1.0 μ l

pGEM[®]-T Easy Vector 1.0 μ l

PCR product 5.0 μ l

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน

2. Transformation

เตรียม competent cells ปริมาตร 50 μ l ใน tube 1.5 ml จากนั้นเติมสารละลาย ligation ปริมาตร 3 μ l

นำ tube ไป chill ice เป็นเวลา 20 นาที

จากนั้นนำ tube ไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วกลับมา chill ice อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที

เติม SOC medium ปริมาตร 950 μ l, 2M Mg²⁺ 10 μ l, 2M glucose 10 μ l

Shaking ที่ประมาณ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง แล้ว Centrifuge 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้น เท supernatant ทิ้ง ให้เหลือ pallet ประมาณ 100 μ l

เติม x-gal 15 μ l และ 200 mg/ml IPTG 4 μ l mix ให้เข้ากัน

Spread plate และนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน

3. Colony selection

สังเกตดู colony ที่ขึ้นบน plate โดยจะเลือก colony ที่ใส แล้ว Pick colony ใส ลง ใน LB broth จากนั้น Shaking 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4. Plasmid extraction ด้วย Fast Plasmid mini

นำ bacterial culture 1.5 ml มาใส่ลงใน tube 1.5 ml แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

เท supernatant ทิ้ง จะเหลือ pallet

เติม PD1 (แซ่เย็น) ที่เติม RNase A ปริมาตร 200 μ l จากนั้น vortex 30 วินาที

เติม PD2 ปริมาตร 200 μ l และพลิกหลอดกลับไปมา บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

เติม PD3 ปริมาตร 300 μ l และพลิกหลอดกลับไปมา

นำสารละลาย lysate ลงใน spin column แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

เทส่วน filtrate ทิ้ง และเติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน spin column แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

เทส่วน filtrate ที่ และเติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน spin column
 เทส่วน filtrate ที่ แล้ว centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
 จากนั้นนำ spin column ลงใน collection tube
 เติม elution buffer ปริมาตร 50 μ l และตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้ว centrifuge 13,000 rpm
 เป็นเวลา 2 นาที
 ได้สารละลาย positive control เป็นปริมาตร 50 μ l

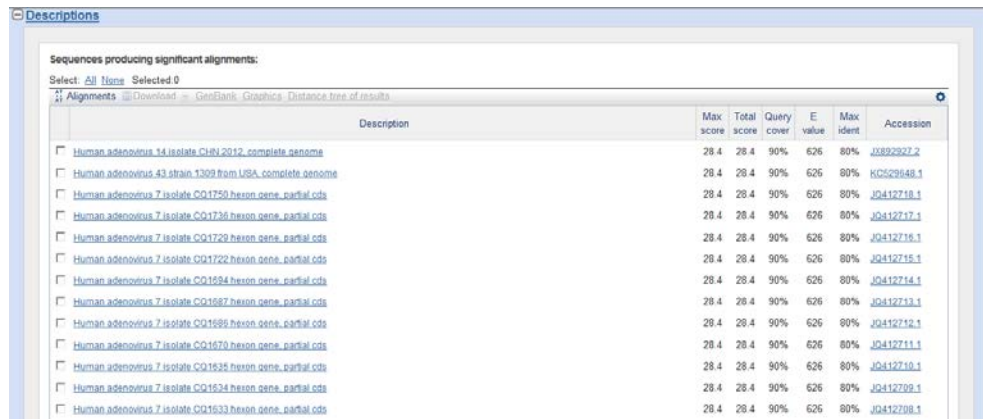
การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจหาการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส
 ในตัวอย่างที่กล่าวข้างต้นพร้อมทั้งจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส
 โดยจะเลือกออกแบบที่บริเวณยีน *hexon* เนื่องจากเป็นบริเวณที่มี hypervariable region ซึ่งข้อมูล
 ทางพันธุกรรมในบริเวณนี้ได้ถูกใช้ศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดีโน
 ไวรัสเป็นหลัก [70] ขั้นแรกจะทำการเลือกลำดับเบสของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสทั้ง 7 subgroups
 โดยเลือกจากสายพันธุ์ที่เจอในภูมิภาคเอเชีย จากฐานข้อมูล Genbank มาทำการ alignment โดยใช้
 โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1) จากนั้นเลือกบริเวณที่มีบริเวณ
 อนุรักษ์ (conserve region) หรือบริเวณที่มีเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด
 ซึ่งจะมีความยาวประมาณ 17-28 bases โดยจะต้องมีค่า GC content ประมาณ 50-60% และ ค่า
 melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75°C โดยที่ไพรเมอร์คู่เดียวกันควร
 มีค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ค่า T_m มีสูตรในการคำนวณดังนี้

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

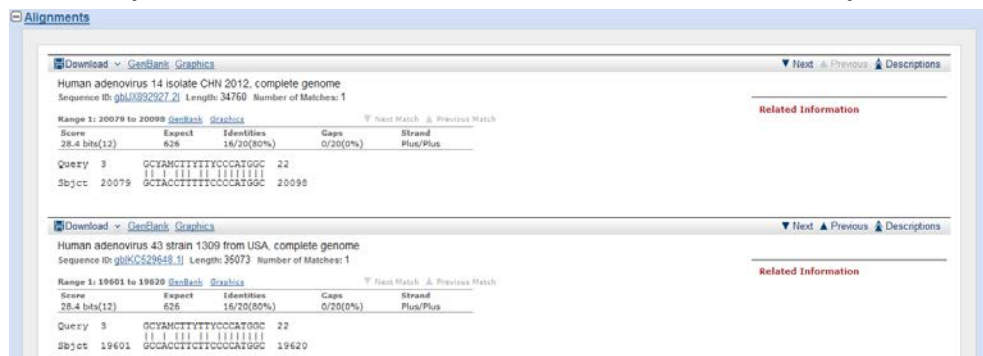
จากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณยีน *hexon* ทำให้ได้ไพรเมอร์ 2 คู่ สำหรับ screening เชื้อฮิว
 แมนอะดีโนไวรัส: ADV_FO/ADV_R ในการทำ PCR รอบที่ 1 , ADV_F/ADV_R ในการทำ PCR
 รอบที่ 2 มีขนาด 482 bp โดยคัดแปลงไพรเมอร์มาจากการศึกษาของ Wanhong Xu และคณะ [97]
 และ ไพรเมอร์ 1 คู่ สำหรับ typing เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส: ADV_F2/ ADV_R2 มีขนาดประมาณ
 956 bp โดยคัดแปลงไพรเมอร์มาจากการศึกษาของ Lu x และ Erdman ในปี 2006 [98]
 จากนั้นตรวจสอบผลการออกแบบไพรเมอร์โดยการนำไพรเมอร์ไป BLAST เปรียบเทียบกับใน
 ฐานข้อมูล NCBI ได้ผลดังนี้

ตัวอย่างผลการนำ ADV_FO BLAST เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Human adenovirus 14 isolate CHN 2012, complete genome	28.4	28.4	90%	626	80%	JX892927.2
Human adenovirus 43 strain 1309 from USA, complete genome	28.4	28.4	90%	626	80%	KC529148.1
Human adenovirus 7 isolate CO1750 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412718.1
Human adenovirus 7 isolate CO1736 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412717.1
Human adenovirus 7 isolate CO1729 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412716.1
Human adenovirus 7 isolate CO1722 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412715.1
Human adenovirus 7 isolate CO1694 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412714.1
Human adenovirus 7 isolate CO1687 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412713.1
Human adenovirus 7 isolate CO1689 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412712.1
Human adenovirus 7 isolate CO1670 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412711.1
Human adenovirus 7 isolate CO1638 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412710.1
Human adenovirus 7 isolate CO1634 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412709.1
Human adenovirus 7 isolate CO1633 hexon gene, partial cds	28.4	28.4	90%	626	80%	JQ412708.1

รูปที่ 8 แสดงผลการ BLAST ของ ADV_FO เทียบกับในฐานข้อมูล



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.4 bits(12)	626	16/20(80%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query 3	GCYAMCTTYYTCCCATGGC 22			
Sbjct 20079	GCTACCTTTTCCCCATGGC 20098			

ภาพที่ 9 แสดงผลการ BLAST ของ ADV_FO เทียบกับในฐานข้อมูลที่ใกล้เคียง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

นำ DNA ที่ได้ไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ในบริเวณ Hexon gene โดยวิธี Semi-Nested PCR สำหรับคัดเลือก (screening) ตัวอย่างที่มีเชื้อ HAdV โดยใช้ primer ADV_FO และ ADV_R ในการทำ PCR รอบที่ 1 และ primer ADV_F และ ADV_R ในการทำ PCR รอบที่ 2 นำตัวอย่างที่ screening positive มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เพื่อ typing HAdV โดยใช้ primer ADV_F2 และ ADV_R2 ซึ่งมีปริมาณของ mixture และ condition ของ PCR ดังตารางที่ 8-12 ตารางที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HAdV

Primer name	Sequence (5'→3')
ADV_F	TYT TYC CCA TGG CNC ACA ACA C
ADV_R	AAR CCC TGR TAN CCD ATR TTG TA
ADV_FO	AYG CYA MCT TYT TYC CCA TGG C
ADV_F2	TTY CCC ATG GCN CAC AAC AC
ADV_R2	GYY TCR ATG AYG CCG CGG TG

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ Semi-Nested PCR เพื่อ Screening เชื้อ HAdV รอบที่ 1 และ รอบที่ 2

สารละลาย	ปริมาตร(volume(μ l)/tube)	
	PCR รอบที่ 1	PCR รอบที่ 2
Distilled water	7	7
Master Mix	15	15
Primer forward 10 uM (ADV_FO)	0.5	-
Primer reverse 10 uM (ADV_R)	0.5	0.5
Primer forward 10 uM (ADV_F)	-	0.5
DNA template	2	2
Total volume	25	25

ตารางที่ 10 แสดงสภาวะที่ใช้ทำ Semi-Nested PCR เพื่อ Screening เชื้อ HAdV รอบที่ 1 และ รอบที่ 2

PCR Cycle	PCR รอบที่ 1		PCR รอบที่ 2	
	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา
1. Pre-denaturation	94	3 นาที	94	3 นาที
2. Denaturation	94	18 วินาที	94	18 วินาที
3. Annealing	53	21 วินาที	55	21 วินาที
4. Extension	72	1:30 นาที	72	1:30 นาที
ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ				
5. Final extension	72	10 นาที	72	10 นาที

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ Positive for ADV screening

สารละลาย	ปริมาตร (volume/tube)	
Distilled water	7	μ l
Master Mix	15	μ l
Primer forward 10 uM (ADV_F2)	0.5	μ l
Primer reverse 10 uM (ADV_R2)	0.5	μ l
DNA template	2	μ l
Total volume	25	μ l

ตารางที่ 12 แสดงสถานะที่ใช้ทำ PCR สำหรับ Positive for ADV screening

PCR Cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. Pre-denaturation	94	3 นาที
2. Denaturation	94	30 วินาที
3. Annealing	50	30 วินาที
4. Extension	72	1:45 นาที
ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ		
5. Final extension	72	10 นาที

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR นำมาวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี gel electrophoresis ใน 2% agarose gel เป็นเวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที แล้วจึงนำไปดูผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transluminator) โดยขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการ screening และ typing คือ 482 , 956 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ 100-1,000 bp ladder DNA

การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยดูผ่านแสง UV จากนั้นตัด gel ในส่วนที่มีแถบของ DNA ที่ต้องการ ทำให้บริสุทธิ์โดยชุด HiYield™ Gel/PCR DNA fragment extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan) ขั้นตอนพอมิดังนี้

1. เติมนสารละลาย PS buffer 500 ul ลงใน microcentrifuge tube ที่มี gel อยู่ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่า gel ละลาย
2. คูด gel ที่ละลายทั้งหมดลงใน column filter แล้ว centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
3. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer 600 ul แล้ว centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
4. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer 500 ul แล้ว centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
5. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้น centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ column แห้ง

6. เปลี่ยน column filter ใส่ microcentrifuge tube จากนั้นเติม elution buffer ประมาณ 50 ul แล้วทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที

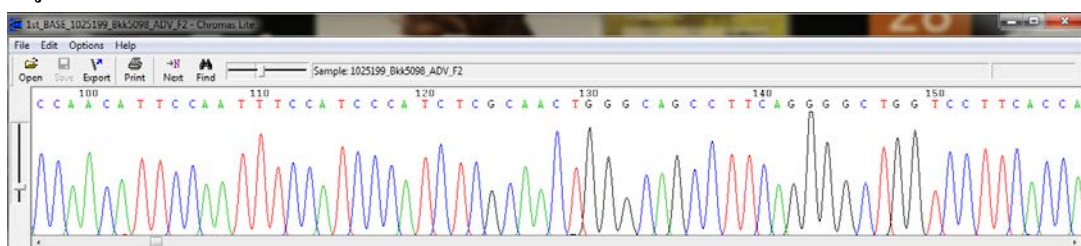
7. centrifuge 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ แล้วตกลงไปใน microcentrifuge tube

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลิตภัณฑ์ ที่ได้จำนวน 5 ul มาทำการวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อตรวจสอบว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วจึงส่งไปทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ยังบริษัท First Base laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยวิธีของ Sanger

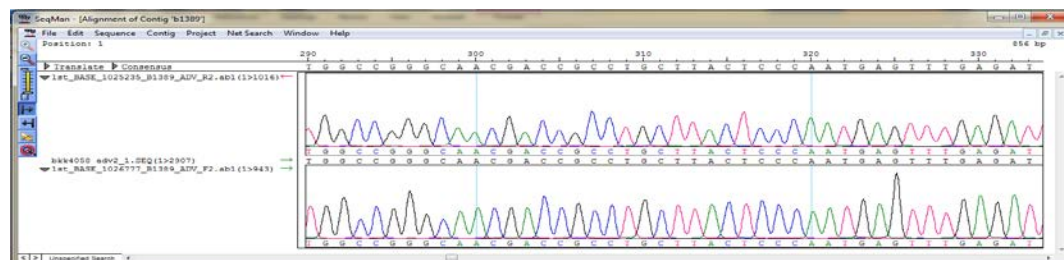
การวิเคราะห์ข้อมูล

การตรวจสอบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing จะถูกวิเคราะห์รูปแบบของยีน (genotype) โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast แล้วจึงทำการอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite (version 2.01) เพื่อแปลผล chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป โดยใช้ Seqman™II (version 6.0) ในการตรวจสอบและแก้ไขผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งนี้ยังใช้เชื่อมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Forward และ Reverse ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสให้เข้าด้วยกัน



รูปที่ 10 แสดงผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.01)



รูปที่ 11 ผลการใช้โปรแกรม Seqman™II (version 6.0) ในการตรวจสอบและแก้ไขผลของลำดับนิวคลีโอไทด์

การทำ phylogenetic analysis ในบริเวณยีน *hexon* ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่ตรวจพบ

การวิเคราะห์นี้ใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1) และ Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 5.05) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสจากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะที่บริเวณ *hexon* gene มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสทุกสายพันธุ์ ในฐานข้อมูล GenBank database เพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสจากตัวอย่างของผู้ป่วย โดยการศึกษานี้กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์คือ Neighbor-joining method โดยมีค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

การคำนวณอัตราการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสต่อสัปดาห์ในตัวอย่างของผู้ป่วย

อัตราการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสต่อสัปดาห์ =

ตัวอย่างของผู้ป่วยให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสัปดาห์นั้น $\times 100$

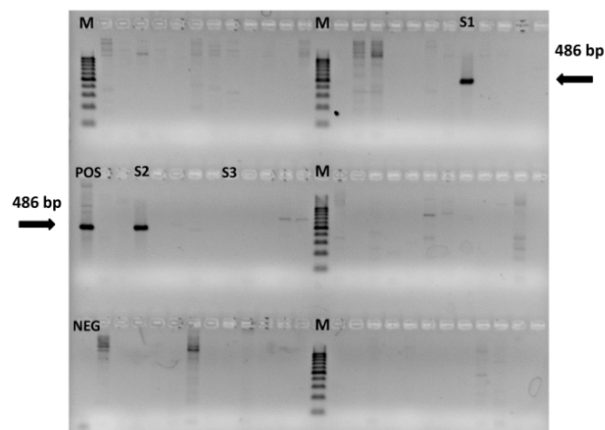
ตัวอย่างทั้งหมดที่ส่งมาในสัปดาห์นั้นๆ

บทที่ 4

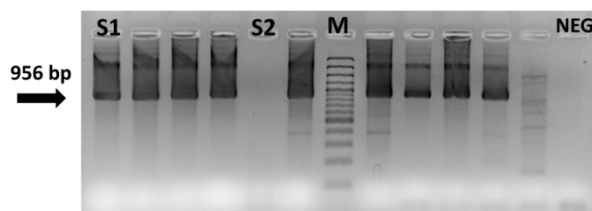
ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์การตรวจหาเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

จากการคัดกรองเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสโดยใช้ screening HAdV primers จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการคัดกรองมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้ typing HAdV primers จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 9,222 ตัวอย่าง ในช่วงปี 2552-2555 แบ่งเป็นสิ่งส่งตรวจที่มาจากระบบทางเดินหายใจจำนวน 7,921 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส 82 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 1.04 โดยจำแนกออกไปตามจังหวัด ประกอบด้วยจังหวัดขอนแก่น 31 ตัวอย่าง (0.91%) จังหวัดนครราชสีมา 12 ตัวอย่าง (1.1%) และ กรุงเทพมหานคร 39 ตัวอย่าง (1.14%) ในขณะที่สิ่งส่งตรวจที่มาจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารทั้งหมดจำนวน 1,301 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส 76 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 5.84



รูปที่ 12 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 486 bp ที่ได้จากการทำ nested-PCR ในการคัดกรองเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส โดยที่ M แทน 100 bp marker, S1 และ S2 เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ให้ผลบวก, S3 เป็นตัวแทนตัวอย่างที่ให้ผลลบ, POS แทน Positive control, NEG แทน Negative control และทุกหลุมบน agarose gel ได้ run ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการคัดกรองทุกหลุม



รูปที่ 13 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 956 bp ที่ได้จากการทำ PCR ใน typing เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส โดยที่ M แทน 100 bp marker, S1 เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ให้ผลบวก, S2 เป็นตัวแทนตัวอย่างที่ให้ผลลบ, NEG แทน Negative control และทุกหลุมบน agarose gel ได้ run ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ typing ทุกหลุม

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

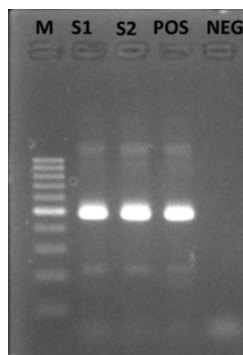
Characteristic	NP specimen (n=7,921)		Fecal specimen (n=1,301)	
	No. specimens	Positive HAdV (%)	No. specimens	Positive HAdV (%)
เพศ				
ชาย, n (%)	4,103 (58.8)	44 (53.7)	776 (59.7)	49 (64.5)
หญิง, n (%)	3,818 (48.2)	38 (46.3)	525 (40.4)	27 (35.5)
อายุ(ปี)				
Median	5	2	1	1
Mode	1	1	1	1
Mean (SD)	9.76 (13.4)	4.86 (13.3)	3.14 (5.3)	2.93 (9.3)
ช่วงกลุ่มของอายุ				
0-2, n (%)	2,194 (27.7)	39 (47.6)	1,019 (78.3)	61 (80.3)
3-5, n (%)	1,263 (15.9)	23 (28.1)	90 (6.9)	6 (7.9)
6-15, n (%)	1,909 (24.1)	9 (11.0)	29 (2.2)	2 (2.6)
>15, n (%)	2,243 (28.3)	4 (4.9)	124 (9.5)	2 (2.6)
missing, n	312	7	39	5

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

Characteristic	NP specimen (n=7,921)		Fecal specimen (n=1,301)	
	No. specimens	Positive HAdV (%)	No. specimens	Positive HAdV (%)
จังหวัด				
กรุงเทพ, n (%)	3,414 (43.1)	39 (1.1)	368 (28.3)	19 (5.2)
ขอนแก่น, n (%)	3,414 (43.1)	31 (0.9)	933 (71.7)	57 (6.1)
นครศรีธรรมราช, n (%)	1,093 (13.8)	12 (1.1)	-	-

ผลการเพิ่มจำนวนของ Internal control

การตรวจหาเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส จะใช้ GAPDH gene ของ Human ซึ่งเป็น housekeeping gene เป็น Internal control ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 490 bp และให้ผลบวกในการทำ PCR ของ GAPDH ในทุกตัวอย่างที่มาจากสิ่งส่งตรวจที่มาจากระบบทางเดินหายใจ



รูปที่ 14 แสดงผลิตภัณฑ์ขนาด 490 bp ที่ได้จากการทำ PCR ของ GAPDH gene โดยที่ M แทน 100 bp marker, S1 และ S2 เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ตรวจ, POS แทน Positive control, NEG แทน Negative control

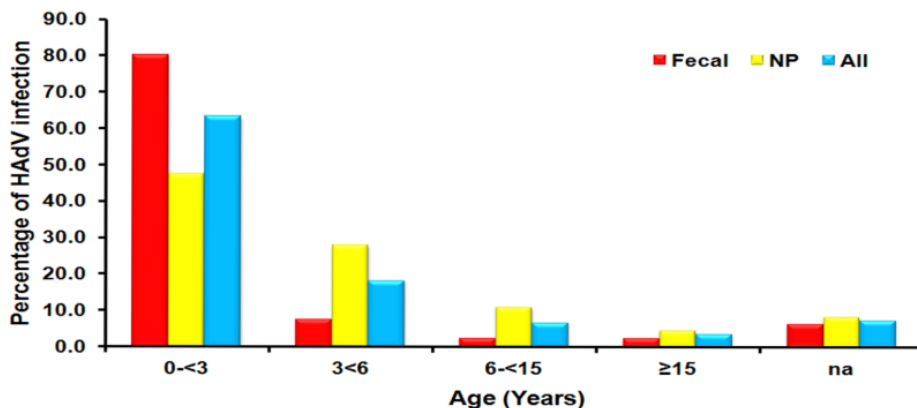
ผลการวิเคราะห์อายุและเพศผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสด้วยวิธี PCR

ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจที่ให้ผลบวกเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสคิดเป็น 1.04% (82/7291) พบว่าเป็นเพศหญิง 46.34% (38/82) และเพศชาย 53.66% (44/82) โดยอัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายเท่ากับ 1:1.16 ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ป่วยอายุ 0-<3 ปี พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้มากที่สุดคือ 47.56% (39/82) รองลงมาคือ อายุ 3-<6 ปี 28.05% (23/82), 6-<15 ปี 10.98% (9/82) โดยอายุเฉลี่ยของผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เท่ากับ 3.41 ปี (min=4 เดือน, max=43 ปี, SD= 5.27, mode=1, median= 2)

ตัวอย่างอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยในระบบทางเดินอาหารที่ให้ผลบวกเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสคิดเป็น 5.84% (76/1301) พบว่าเป็นเพศหญิง 35.53% (27/76) และเพศชาย 64.47% (49/76) โดยอัตราส่วนของเพศหญิงต่อเพศชายคือ 1:1.82 โดยที่ผู้ป่วยในช่วงอายุ 0-<3 ปีติดเชื้อไวรัสมากที่สุดคือ 80.26% (61/76) รองลงมาคือ 3-<6 ปี และ 6-<15 ปีคิดเป็น 7.89% (6/76), 2.63% (2/76) ตามลำดับ อายุเฉลี่ยของผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เท่ากับ 2.93 ปี (min=26 วัน, max=68 ปี, SD= 9.29, mode=1, median= 1)

ตารางที่ 14 แสดงความชุกและช่วงอายุของผู้ติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส

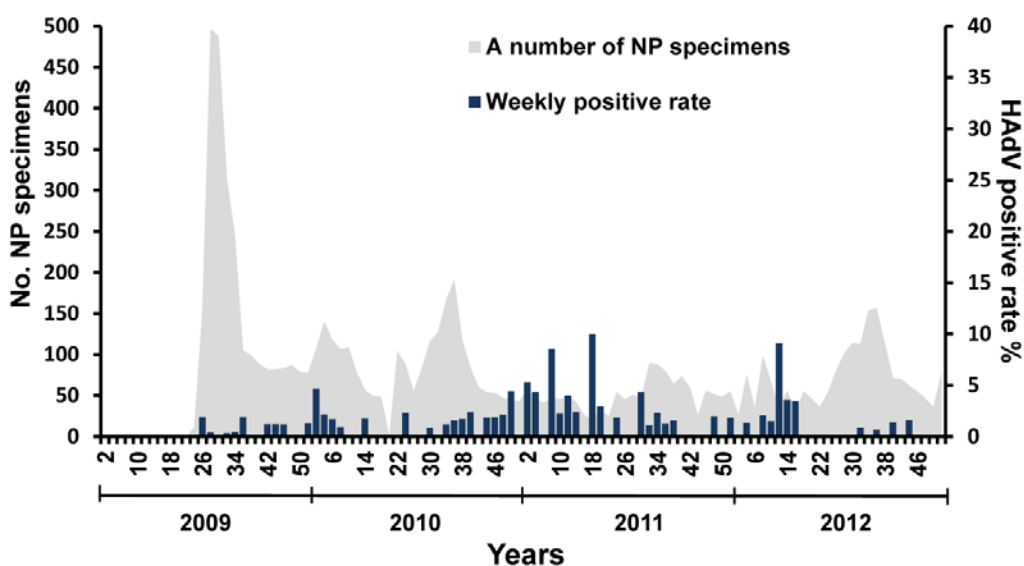
	Total samples (n)	HAdV positive samples (n)	HAdV positive rate (%)
NP	7,921	82	1.04
Fecal	1,301	76	5.84
ช่วงอายุ (ปี)			
0-<3	3,213	100	3.11
3-<5	1,353	29	2.14
6-<15	1,938	11	0.57
≥15	2,367	6	0.25
missing	351	12	3.41



รูปที่ 15 กราฟแท่งแสดงช่วงอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้ออะดีโนไวรัสในตัวอย่างที่ส่งตรวจ

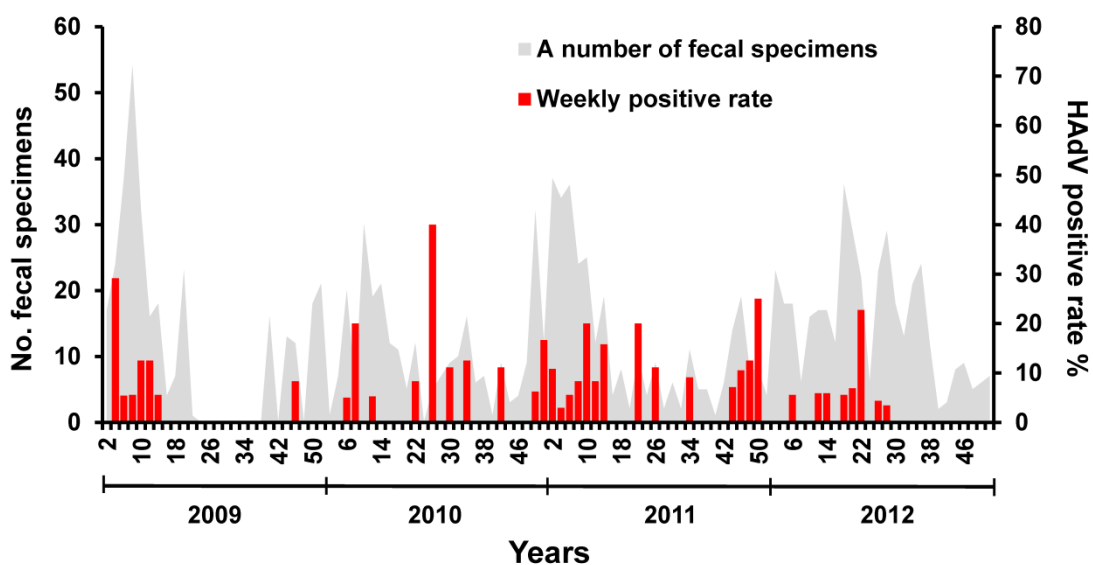
ผลการวิเคราะห์ฤดูกาลและปีที่ตรวจพบเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส

การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในผู้ป่วยระบบทางเดินหายใจเพิ่มขึ้น 3.7 เท่าจากปีพ.ศ. 2552 จนถึงปี 2554 และอัตราการติดเชื้อลดลงในปีพ.ศ. 2555 โดยการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละสัปดาห์ได้มาจากจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในแต่ละสัปดาห์คูณด้วย 100หารด้วยจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจภายในสัปดาห์นั้นๆ (min 0%, max 50% , mean 1.04%/weeks, SD 3.94) ดังรูปที่16 ความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในช่วงปี 2552-2555 คือ 0.52% (13/2497), 1.29% (29/2246), 1.97% (26/1318), 0.75% (14/1860) ตามลำดับ การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี โดยช่วงเวลาจะอยู่ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงธันวาคม และ มกราคมถึงมีนาคม และจะสูงสุดในช่วงมกราคม ถึง มีนาคม (ฤดูหนาว)



รูปที่ 16 กราฟแท่งแสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละสัปดาห์ในสิ่งส่งตรวจที่เป็น NP

การติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในผู้ป่วยระบบทางเดินอาหารมีอัตราการติดเชื้อในปี 2555 ลดลง 2.54 เท่าจากในปี 2554 การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี ช่วงจะอยู่ระหว่างเดือน มกราคมถึงมีนาคม และพฤษภาคมถึงกรกฎาคม และจะเด่นชัดในช่วง มกราคม ถึง มีนาคม (ฤดูหนาว) ความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละสัปดาห์ แสดงดังรูปที่ 17 (min 0%, max 100% , mean 4.19%/weeks, SD 10.61) ผลบวกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ระหว่างปี 2552 ถึง 2555 คือ 6.39% (20/313), 5.13% (14/273), 8.89% (28/315), 3.50% (14/400) ตามลำดับ



รูปที่ 17 กราฟแท่งแสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละสัปดาห์ใน
สิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระ

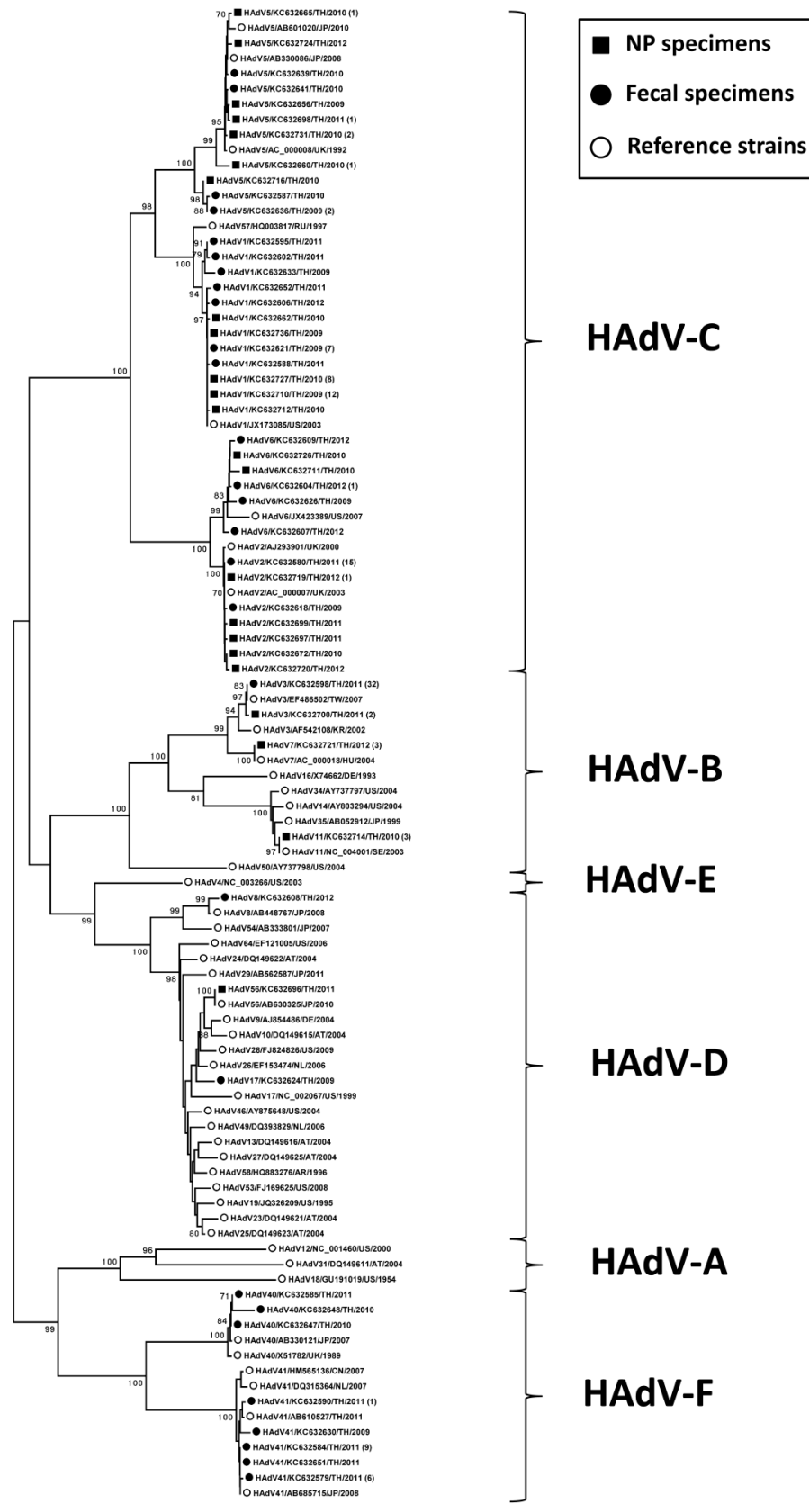
ตารางที่ 15 แสดงความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในปี พ.ศ. 2552-2555

ปี	NP specimens			fecal specimens		
	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่ ให้ผลบวก	ความชุกของ เชื้ออะดีโน ไวรัส	จำนวน ตัวอย่าง ทั้งหมด	จำนวน ตัวอย่างที่ ให้ผลบวก	ความชุกของ เชื้ออะดีโน ไวรัส
2552	2,497	13	0.52%	313	20	6.39%
2553	2,246	29	1.29%	273	14	5.13%
2554	1,387	26	1.97%	315	28	8.89%
2555	1,860	14	0.75%	400	14	3.50%

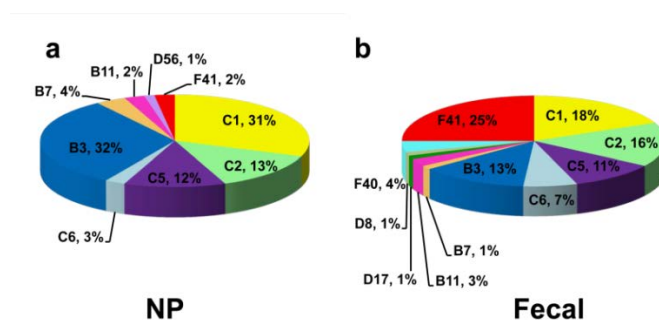
ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree และ HAdV typing

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้ออะดีโนไวรัสที่ได้ทำการ direct sequencing มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.05 วิธี Neighbor-Joining Method กำหนดค่า bootstap ไว้ที่ 1000 สร้าง Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *hexon* ทำให้สามารถจัดกลุ่ม HAdV genotype ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยเปรียบเทียบกับ reference strains ที่ได้ถูกฝากไว้ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) ดังรูป 18

รูปที่ 18 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกจีโนไทป์ในส่วนของยีน *hexon* ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นๆที่ถูกฝากไว้ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank), โดยที่ ■ แสดง ตัวอย่างที่มาจาก NP, ● แสดง ตัวอย่างที่มาจาก อุจจาระ, ○ แสดง reference strains ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส ตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

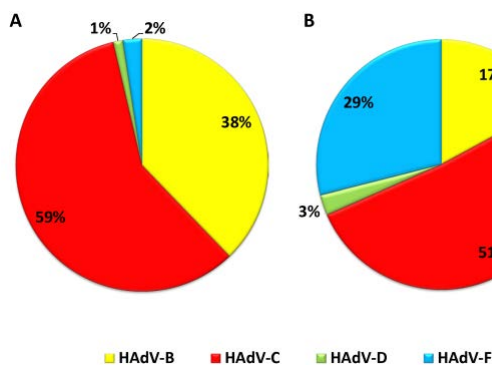


ในตัวอย่างจากน้ำล้างโพรงจุกและสารคัดหลั่งจากโพรงจุกพบว่าการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสจีโนไทป์ที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งคือ HAdV-B3 32% (26/82) อันดับสองคือ HAdV-C1 31% (25/82) ลำดับถัดมาคือ HAdV-C2 13% (11/82), HAdV-C5 12% (10/82) ส่วนสายพันธุ์ของฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่มีการติดเชื้อน้อยมีดังนี้ HAdV-B7 4%, HAdV-C6 3%, HAdV-B11 2%, HAdV-F41 2% และ HAdV-D56 1% ถ้าพิจารณาแยกเป็น subgroup พบว่า HAdV-C เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยในการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของฮิวแมนอะดีโนไวรัส ดังรูปที่ 19A และรูปที่ 20A



รูปที่ 19 A แสดงจีโนไทป์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจ NP B แสดงจีโนไทป์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระ

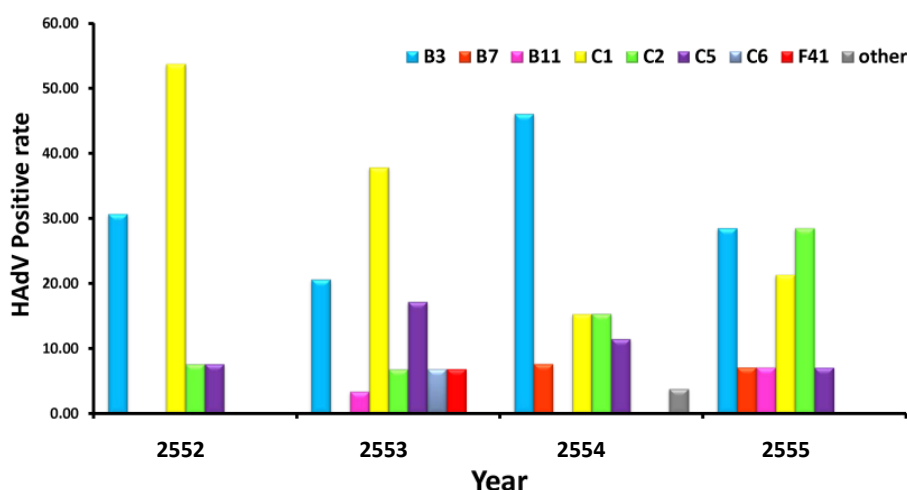
HAdV-C พบมากที่สุดในตัวอย่างไม่จากอุจจาระคือ 51% (39/76) ถ้าวิเคราะห์แยกในแต่ละจีโนไทป์พบว่า HAdV-F41 พบมากที่สุดในการติดเชื้อ 25% (19/76) ตามด้วย HAdV-C2 20% (15/76), HAdV-C1 18% (14/76), HAdV-B3 13% (10/76), HAdV-C5 11% (8/76), HAdV-F40 4% (3/76), HAdV-B11 3% (2/76), HAdV-C6 3% (2/76) จีโนไทป์ที่พบได้น้อยที่สุดคืออย่างละ 1% (1/76) คือ HAdV-B7, HAdV-D8 และ HAdV-D17 ดังรูปที่ 19B และรูปที่ 20B



รูปที่ 20 A แสดง Subgroup ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจ NP B แสดง Subgroup ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระ

ผลการวิเคราะห์การกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555

จีโนไทป์ของฮิวแมนอะดีโนไวรัสในแต่ละปีนั้นมีการกระจายไม่เท่ากัน โดยพบว่าในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก จีโนไทป์ของฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบได้ทุกปีที่ทำการศึกษานั้นคือ HAAdV-B3, HAAdV-C1, HAAdV-C2 และ HAAdV-C5 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2552 HAAdV-C1 (53.85%) พบมากที่สุดเกินครึ่งหนึ่งของจีโนไทป์ทั้งหมด ตามมาด้วย HAAdV-B3 (30.77%) ส่วนในปี 2553 รูปแบบจีโนไทป์ของฮิวแมนอะดีโนไวรัสยังคงเหมือนเดิมแต่เปอร์เซ็นต์ลดลงคือพบ HAAdV-C1 (37.93%), HAAdV-B3 (20.69%) และ HAAdV-C5 (17.24%) ในปี 2554 HAAdV-B3 พบว่ามีความโดดเด่นขึ้นมาถึง 46.15% ตามด้วย HAAdV-C1 และ HAAdV-C2 อย่างละ 15.38% ซึ่งยังพบว่า HAAdV-C1 ลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งในปีที่ผ่านมา ในการศึกษาของปี 2555 ความชุกของ HAAdV-B3 28.6 % ซึ่งค่าได้ลดลงจากปีก่อนหน้านี้ครึ่งหนึ่ง และพบว่า HAAdV-C2 โดดเด่นขึ้นมาด้วยเป็น 28.6% ดังรูปที่ 21

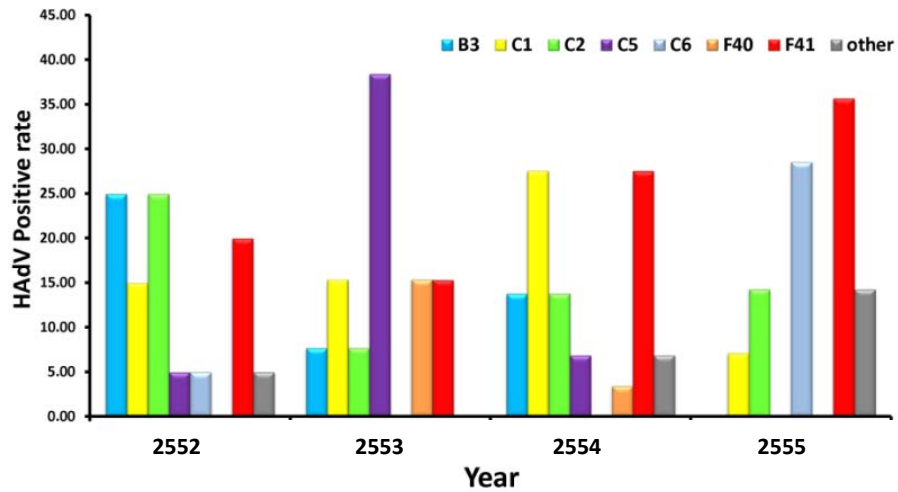


รูปที่ 21 แสดงการกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจจาก NP ในช่วงปี พ.ศ.

2552-2555

จีโนไทป์ของฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่ตรวจพบได้ในสิ่งส่งตรวจจากอูจาระทุกปีในการศึกษาครั้งนี้คือ HAAdV-F41, HAAdV-C1, HAAdV-C2 ตามลำดับ โดยในปี 2552 จีโนไทป์ที่โดดเด่นมากที่สุดคือ HAAdV-B3, HAAdV-C2, HAAdV-F41 ตามลำดับ ปี 2553 HAAdV-C5 มีเปอร์เซ็นต์ของผลบวกมากกว่าจีโนไทป์อื่นๆ ถึงสองเท่าตัว คือ 38.5% ปี 2554 HAAdV-C1 และ HAAdV-F41 พบมากที่สุดอย่างละ 28.6% ส่วนในปี 2555 HAAdV-F41 ยังโดดเด่นเหมือนปีที่แล้วคิดเป็น 35.71%

และจีโนไทป์ที่พบได้บ่อยในปีนี้เป็นคือ HAdV-C2 35.71 % ส่วน HAdV-F40 พบในปี 2553 แล้วลดลงในปี 2554 ถึงห้าเท่า ในปี 2555 ไม่สามารถตรวจพบ HAdV-F40 ได้อีก ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงการกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระในช่วงปี

พ.ศ. 2552-2555

ตารางที่ 16 แสดงการกระจายของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสที่พบในสิ่งส่งตรวจในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555

HAdV genotype	Positive of NP specimens (n=82)					Positive of fecal specimens (n=76)				
	2009	2010	2011	2012	Total	2009	2010	2011	2012	Total
B3	4	6	12	4	26	5	1	4	0	10
B7	0	0	2	1	3	0	0	1	0	1
B11	0	1	0	1	2	0	0	1 ^b	1 ^b	2
C1	7	11	4	3	25	3	2	8	1	14
C2	1	2	4	4	11	5	1	4	2	12
C5	1	5	3	1	10	1	5	2	0	8
C6	0	2	0	0	2	1 ^b	0	0	4	5
D8	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^b	1
D17	0	0	0	0	0	1 ^b	0	0	0	1
D56	0	0	1 ^a	0	1	0	0	0	0	0
F40	0	0	0	0	0	0	2	1	0	3
F41	0	2	0	0	2	4	2	8	5	19

^a แทนที่ Other HAdV genotypes ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูก และสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกในรูปที่ 21

^b แทนที่ Other HAdV genotypes ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระในรูปที่ 2

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสก่อให้เกิดโรคในมนุษย์มากมายหลายโรค เช่น โรคในระบบทางเดินหายใจ ท้องร่วง ตาอักเสบ หรือแม้กระทั่งมีความเกี่ยวข้องกับภาวะอ้วน การติดเชื้อไวรัสส่วนใหญ่จะอยู่ในเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปี ทั่วโลก [27, 93] ซึ่งการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสได้มีการศึกษาและตีพิมพ์วารสารออกมามากมายทั่วโลก แต่ในส่วนของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทยยังมีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัสชนิดนี้น้อยมาก

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสโดยวิธี PCR ในประชากรไทย เป็นเวลาสี่ปีตั้งแต่ พ.ศ. 2552 ถึง 2555 โดยใช้สิ่งส่งตรวจสองชนิดคือ 1.) น้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกจากกรุงเทพมหานคร, จังหวัดขอนแก่น และจังหวัดนครศรีธรรมราช 2.) สิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร และขอนแก่น พบว่าในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกตรวจพบเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส 1.04% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในประเทศแถบเอเชียเช่น ประเทศจีน 0.9% [23] มาเลเซีย 1.85% [24] ความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในการศึกษานี้ พบว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำเมื่อเทียบกับอีกหลายๆประเทศ ได้แก่ บราซิล 7.1% [26] เปรู 6.2% แคนาดา 7.73% [28] โคลัมเบีย 5% [29] เยอรมัน 12.9% [30] ในขณะที่ประเทศอิสราเอลมีความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสถึง 18.3% [31] ซึ่งความชุกที่มากกว่าที่พบในการศึกษานี้ อาจเป็นเพราะได้มีการนำเอาผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเข้าร่วมด้วย จึงทำให้มีอัตราการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้ที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีอาการ influenza-like illness เท่านั้น ส่วนความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระพบ 5.84% ซึ่งมากกว่าการศึกษาในประเทศไทยปี 2550 ซึ่งพบ 1.5% ถึงสี่เท่าที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการศึกษาในปี 2550 ใช้กลุ่มประชากรในการศึกษาจำนวนน้อยและศึกษาในช่วงเวลาที่สั้นกว่าการศึกษานี้ [32] แต่อย่างไรก็ตามอัตราการติดเชื้อของฮิวแมนอะดีโนไวรัสในการศึกษานี้ใกล้เคียงกับการอัตราการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ทั่วโลก ได้แก่ อินเดีย 7.8%, ฮองกง 3%, ฝรั่งเศส 5%, เวเนซุเอลา 5%, เกาหลี 2.6 %, ญี่ปุ่น 4.8 %, อังกฤษ 8.1% [69, 86- 90, 92] ความชุกของการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระที่เก็บตัวอย่างมากจากจังหวัดขอนแก่นมีมากกว่าในกรุงเทพมหานคร เป็นเพราะว่าตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดขอนแก่นนั้นมาจากอำเภอชุมแพซึ่งเป็นเขตชนบทซึ่งอาจมีสุขอนามัยที่ต่ำกว่าเขตในเมืองเช่น กรุงเทพมหานคร

ประชากรที่ติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก มีอัตราส่วน ชาย:หญิงเป็น 1.16:1 ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าคือ อิสราเอล 1.48:1 [31], ไต้หวัน 1.3:1 [84], เปรู 1.3:1 [27], สหรัฐอเมริกา 1.4:1 [99] ในขณะที่การศึกษาของปาเลสไตน์มีอัตราส่วนเป็น 2.4:1 [25] อัตราส่วนของชาย:หญิงในการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระคือ 1.82:1 ซึ่งพบว่าอัตราส่วนได้เพิ่มขึ้นจากการศึกษาในประเทศไทยเมื่อปี 2550 ซึ่งพบว่าอัตราส่วนเป็น 1:1 แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของชายต่อหญิงในครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาในต่างประเทศ [69, 89] และปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่สามารถอธิบายถึงเหตุผลว่าเพราะเหตุใดในเพศชายจึงมีอัตราส่วนการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสมากกว่าเพศหญิง

เด็กช่วงวัย 0-3 ขวบ พบว่ามีอัตราการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสมากที่สุดทั้งในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูก, สารคัดหลั่งจากโพรงจมูก และอุจจาระ ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของทั่วโลก [24-26, 31, 33- 35, 69, 84, 86, 89, 90, 100, 101] สาเหตุที่เด็กอายุต่ำกว่าสามขวบมีอัตราการติดเชื้อสูงสุดอาจเป็นเพราะเด็กในช่วงวัยขวบปีแรกยังไม่มียุติภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคชนิดนี้ และเป็นที่น่าสนใจว่าเด็กในช่วงอายุ 6 ถึง 15 ปี มีอัตราการติดเชื้อที่ต่ำอาจเป็นผลมาจากเด็กเคยได้รับเชื้อมาก่อนในวัยขวบปีแรกดังนั้นจึงทำให้เด็กมียุติภูมิคุ้มกันต่อเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส [102]

จากการศึกษาการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในช่วงเวลาสี่ปีในประเทศไทย พบว่าการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจทั้งสองประเภทนั้น ในปี 2554 พบว่ามีความชุกของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสมากที่สุด เนื่องจากในช่วงปีนั้นเกิดการระบาดของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสที่ประเทศจีน [103] กับไต้หวัน [84] และอัตราการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสลดลงอย่างมากในปี 2555 การติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสไม่มีฤดูกาลสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดปี ซึ่งเหมือนกับหลายประเทศที่ได้ทำการศึกษามา [27, 32, 69, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 104, 105, 106] แต่ในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะสูงสุดในช่วงเดือนมกราคมถึงเมษายน (สัปดาห์ที่ 2-18) หรือช่วงปลายฤดูหนาวถึงฤดูร้อน ซึ่งใกล้เคียงกับประเทศในภูมิภาคเอเชียเช่น จีน [91] มาเลเซีย [33] การศึกษาของบราซิลการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะพบมากในฤดูใบไม้ผลิ [26] ส่วนประเทศอิสราเอลจะพบมากในช่วงฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว [31] ในสหรัฐอเมริกาก็จะพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในฤดูหนาว [102] ซึ่งการที่ฤดูกาลของการติดเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะภูมิอากาศของแต่ละประเทศนั้นๆ [107] สิ่งส่งตรวจจากอุจจาระนั้น มีอัตราการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สูงสุดในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม และพฤษภาคมถึงกรกฎาคม ซึ่งเหมือนกับการศึกษาในประเทศไทยในปี 2550 [35] และใกล้เคียงกับการศึกษาของญี่ปุ่น [93] และบังคลาเทศ [34]

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูก และสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกระดับอนุชีวโมเลกุลครั้งแรกในประเทศไทย พบว่า HAdV subgroup C พบมากที่สุดในกลุ่มประชากร ลำดับสองคือ HAdV subgroup B และ subgroup ที่พบน้อยที่สุดคือ HAdV subgroup F และ HAdV subgroup D ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลนี้คล้ายกับของประเทศอิสราเอล [31] บราซิล [26] เปรู [27] และประเทศเพื่อนบ้าน มาเลเซีย [24] ที่มี HAdV subgroup C โดดเด่นที่สุด ในทางตรงข้ามกับ HAdV subgroup B จะพบอัตราการติดเชื้อมากใน สหรัฐอเมริกา อังกฤษ ญี่ปุ่น จีน เกาหลี ไต้หวัน และแคนาดา [28, 84, 91, 100, 103, 108-110, 111, 112] ซึ่งเหตุผลที่ HAdV subgroup ต่างกันในแต่ละประเทศนั้นยังไม่สามารถทราบได้ อาจจะเป็นเพราะ HAdV subgroup C พบมากในเขตร้อนชื้น ส่วนประเทศเขตอบอุ่นจะพบ HAdV subgroup B เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามข้อมูลในแถบประเทศใกล้เคียงหรือประเทศในเขตภูมิอากาศร้อนชื้นยังมีการศึกษาน้อยอยู่มาก ถ้าวิเคราะห์ตาม จีโนมไทป์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสแล้ว พบว่า HAdV-B3 และ HAdV-C1 มีอัตราการติดเชื้อมากที่สุดใกล้เคียงกัน รองลงมาคือ HAdV-C2, HAdV-C5 ส่วน HAdV-B7, HAdV-C6, HAdV-B11, HAdV-F41, และ HAdV-D56 พบได้น้อยมากในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่ายังไม่มีรายงานใดที่พบอัตราการติดเชื้อของ HAdV-B3 และ HAdV-C1 มากเป็นอัตราใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาที่พบว่ามี HAdV-B3 โดดเด่นมากที่สุดคือ ปาเลสไตน์ [25] สหรัฐอเมริกา [100] จีน [91, 111, 103] แคนาดา [28] ส่วนประเทศที่พบว่ามี HAdV-C1มากที่สุดในการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสคือ มาเลเซีย [24] อิสราเอล [31] HAdV subgroup C พบมากที่สุดเป็นสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระ รองลงมาคือ HAdV subgroup F, HAdV subgroup B, และ HAdV subgroup D ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในปี 2550 ในการศึกษาครั้งนั้นพบว่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็น HAdV subgroup F [35] แต่ถ้าวิเคราะห์ตาม HAdV genotype พบว่า HAdV-F41 มีอัตราการติดเชื้อมากที่สุดถึง 25% ซึ่งข้อมูลนี้คล้ายคลึงกับการศึกษาทั่วโลก เช่น อินเดีย [86] ส่องกง [87] ฝรั่งเศส [88] เกาหลี [90], ฮังการี [92] ญี่ปุ่น [93] จีน [101, 113] ทั้งนี้จากข้อมูลพบว่า HAdV-F41 ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท้องเสียเฉียบพลันในเด็ก [114] ในขณะที่การศึกษาของประเทศบังคลาเทศปี 2547-2548 พบว่ามีอัตราการติดเชื้อของ HAdV-F40 ในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลันมากที่สุดแต่ไม่พบการติดเชื้อของ HAdV-F41 ซึ่งยังไม่สามารถหาสาเหตุที่แน่ชัดได้ว่าเป็นเพราะเหตุใด [34] การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ามี HAdV genotype อื่นๆที่สามารถตรวจพบได้ในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระได้แก่ HAdV-C1, HAdV-C2, HAdV-B3, HAdV-C5, HAdV-C6, HAdV-F40, HAdV-B11, HAdV-B7, HAdV-D8, และ HAdV-D17 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของคุณลีลา กิตติกุลและคณะซึ่งพบเพียง 3 จีโนมไทป์ คือ HAdV-F41, HAdV-C2, และ HAdV-D38 เป็นเพราะว่าในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้ตัวอย่างจำนวน

มากและใช้ระยะเวลาในการศึกษาการติดเชื้อไวรัสนานกว่าจึงทำให้พบจีโนมใหญ่ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสได้มากกว่า [35]

HAdV genotype มีการกระจายไม่เท่ากันต่างกันไปในแต่ละปีที่ได้ทำการศึกษา พบว่าในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก HAdV genotype ที่พบว่ามีการศึกษาการติดเชื้อมากในทุกปีคือ HAdV-B3, HAdV-C1, HAdV-C2 และ HAdV-C5 ซึ่งเหมือนกับการศึกษาการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในระบบทางเดินหายใจก่อนหน้านี้ เช่น ปาเลสไตน์ [25] อิสราเอล [31] บราซิล [26] ใต้หวัน [84] เปรู [27] จีน [91] มาเลเซีย [24] และ แคนาดา [28] ในปี 2552 พบว่า HAdV-C1 มีการติดเชื้อมากกว่า 50% ของการติดเชื้อที่เกิดจากฮิวแมนอะดีโนไวรัสทั้งหมด รองลงมาคือ HAdV-B3 แต่ในทางตรงข้ามกัน การศึกษาของ Tsung-Pei Tsou ในประเทศใต้หวัน ในปีเดียวกันพบว่า HAdV-B3 พบได้มากที่สุด รองลงมาคือ HAdV-C2 และ HAdV-C1 ในปี 2553 อัตราการติดเชื้อของ HAdV-C1 ลดลงแต่ยังคงโดดเด่นกว่า HAdV-B3 และ HAdV-C5 ซึ่งเพิ่มมาถึงสองเท่าจากปีที่แล้ว ในปี 2554 พบว่า HAdV-B3 โดดเด่นมากที่สุด ซึ่งข้อมูลนี้มีความสัมพันธ์กับการระบาดของ HAdV-B3 ในใต้หวันที่มีอัตราการติดเชื้อถึง 73% [84] และที่จีน [103] ในปี 2555 ความชุกของ HAdV-B3 ลดลงมาครึ่งหนึ่งจากปีที่แล้ว และ HAdV-C2 เพิ่มขึ้นมาสองเท่าจากปีที่แล้ว HAdV genotype ในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระนั้น พบว่า HAdV-F41, HAdV-C1, และ HAdV-C2 พบมากในทุกปีที่ทำการศึกษาเรียงตามลำดับ ในปี 2552 HAdV-B3, HAdV-C2 และ HAdV-F41 พบมากที่สุดเรียงตามลำดับ ในปี 2553 HAdV-C5 พบว่ามีการศึกษาการติดเชื้อมากที่สุดในกลุ่มตัวอย่างโดยเพิ่มมาถึงหกเท่าจากปีก่อน ในปี 2554 HAdV-C1 และ HAdV-F41 พบมากที่สุด ปี 2555 HAdV-F41 ยังคงโดดเด่นเหมือนเดิม พร้อมกับมี HAdV-C6 ซึ่งไม่พบว่ามีการศึกษาการติดเชื้อในกลุ่มตัวอย่างในสองปีก่อนหน้านี้ ในขณะที่ HAdV-F40 ถึงแม้จะเป็น enteric adenovirus เหมือนกับ HAdV-F41 แต่ก็พบได้ไม่บ่อยนักในการศึกษาครั้งนี้คือปี 2553-2554 และตรวจไม่พบในปี 2555 และสาเหตุที่มี non-enteric adenovirus โดดเด่นในการติดเชื้อในบางปีจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระนั้นเป็นเพราะว่าเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสสามารถติดเชื้อแบบ fecal oral route ได้ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อจาก HAdV-F41 ยังคงพบบ่อยที่สุดในการศึกษาการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในระบบทางเดินอาหารเหมือนกับการศึกษาทั่วโลก [114]

สรุปเนื่องจากการศึกษาการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีข้อมูลน้อยมาก ดังนั้นการศึกษานี้ได้รายงานการศึกษาการติดเชื้อของฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากน้ำล้างโพรงจมูกและสารคัดหลั่งจากโพรงจมูกเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากอุจจาระในระหว่างปี 2552-2555 นอกจากนี้การศึกษานี้ยังวิเคราะห์ อายุและเพศของผู้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ฤดูกาลในการติดเชื้อ

ไวรัส สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัส และการกระจายสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในแต่ละปี จึงแนะนำให้เฝ้าระวังและป้องกันการติดเชื้อฮิวแมนอะดีโนไวรัสในเด็กวัยขวบปีแรก และในอนาคตควรที่จะเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลในด้านระบาดวิทยาของไวรัสชนิดนี้ สำหรับใช้ในการพัฒนาวัคซีนต่อไป

รายการอ้างอิง

- [1] Horwitz MS. 2001. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamp RA, Marrtin MA, Roizman B, Straus SE(eds), *Virology*, 4th ed., P. 2301-2326. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
- [2] Wadell G. 1999. Adenoviruses (Adenoviridae): general features of adenoviruses. In: Granoff A, Webster RG(eds), *Encyclopedia of Virology*, 2nd ed., Volum 1.,P. 1-7. New York: Academic Press.
- [3] Charles Gabbert, Michael Donohue, John Arnold, and Jeffrey B. Schwimmer. 2010. Adenovirus 36 and Obesity in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 126: 721-726.
- [4] Kampmann B, Cubitt D, Walls T, Naik P, Depala M, Samarasinghe S., et al. 2005. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol*. 130: 595-603.
- [5] Echavarria M. 2008. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*. 21: 704-715.
- [6] Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ., et al. 1969. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol*. 90: 485-500.
- [7] Ruuskanen O, Metcalf JP, Meurman O, and Akusjärvi G. 2009. Adenoviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG.(eds), *Clinical Virology*, 3th ed., P. 559-574. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- [8] Van der Avoort HG, Wermenbol AG, Zomerdijk TP., et al. 1989. Characterization of fastidious adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralizing monoclonal antibodies. *Virus Res*. 12: 139-157.
- [9] Kajon A and Wadell G. 1994. Genome analysis of South American adenovirus strains of serotype 7 collected over a 7-year period. *J Clin Microbiol*. 32: 2321-2323.
- [10] Gompf SG, Oehier RL. 2005. Adenoviruses [Online]. Available from: <http://www.emedicine.com/med/topics57.html>[2011,July 3]
- [11] Top FH Jr. 1975. Control of adenovirus acute respiratory disease in US Army trainees. *J Biol Med* 48: 185-195.

- [12] Echavarria M. 2004. Adenoviruses. In: A. J. Zuckerman, J. E. Banatvala, J. R. Pattison, P. D. Griffiths and B.D. Schoub (eds), *Principle and Practice of Clinical Virology*, 5th ed., P.343-360. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- [13] De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-van Dillen P, Van Doornum GJ, et al. 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol.* 37: 3940-3945.
- [14] Davison, A. J., M. Benko, and B. Harrach. 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.* 84: 2895-2908.
- [15] Jones II MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, de la Cruz WP, Riedel B, et al. 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol.* 81: 5978-5984.
- [16] Walsh, M. P., et al. 2010. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. *J Clin Microbiol.* 48: 991–993.
- [17] Benkő M, Harrach B, Both GW, Russell WC, Adair BM, Adam E, et al. 2005. Adenoviruses. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses (8th report of the International Committee on the taxonomy of viruses)*, P. 213-228. New York: Elsevier Academic Press.
- [18] Uhnoo, I., G. Wadell, L. Svensson, and M. E. Johansson. 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol.* 20: 365–372.
- [19] Carballal, G., C. Videla, A. Misirlian, P. V. Requeijo, and M. Del Carmen Aguilar. 2002. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr.* 2: 6.
- [20] Morfin F, Dupuis-Girod S, Mundweiler S., et al. 2005. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir Ther* 10(2): 225-229
- [21] Lu, X., and D. D. Erdman. 2006. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol.* 151: 1587–1602.

- [22] Gray, G. C., et al. 2007. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis*. 45: 1120-1131.
- [23] L Ren, R. Gonzalez, Z. Wang, et al. 2009. Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005-2007. *Clin Microbiol Infect* 15: 1146-1153.
- [24] Juraina Abd-Jamil, Boon-Teong Teoh, Eddy H Hassan, et al. 2010. Molecular identification of adenovirus causing respiratory tract infection in pediatric patients at the University of Malaya Medical Center. *BMC Pediatrics* 10: 46
- [25] Lina Qurei, Donald Seto, Zaidoun Salah, Maysa Azzeh. 2012. A Molecular Epidemiology Survey of respiratory Adenoviruses Circulating in Children Residing in Southern Palestine. *PLoS ONE* 7(8): e42732. doi: 10.1371/journal.pone.0042732
- [26] Lysa Nepomuceno Luiz, Jose Paulo Gagliardi Leite, Jonny Yokosawa, et al. 2010. Molecular characterization of adenovirus from children presenting with acute respiratory disease in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(5): 712-716.
- [27] Julia S. Ampuero, Victor Ocana, Jorge Gomez, et al. 2012. Adenovirus Respiratory Tract Infection in Peru. *PLoS ONE* 7(10): e46898. doi: 10.1371/journal.pone.0046898
- [28] Rani Yeung, Alireza Eshaghi, Ernesto Lombos, et al. 2009. Characterization of culture-positive adenovirus serotype from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virology* 6: 11. doi: 10.1186/1743-422x-6-11
- [29] L. J. Rojas, C. A. Jaramillo, M. F. Mojica, et al. 2011. Molecular typing of adenovirus circulating in a Colombian paediatric population with acute respiratory infection. *Epidemiol Infect* 140:818-822
- [30] Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, et al. 1999. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infection by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 37:1-7
- [31] Michal Mandelboim, Pnina Dror, Roberto Azar, et al. 2011. Adenovirus Infection in Hospitalized Patients in Israel: Epidemiology and Molecular Characterization. *J Clin Microbiol* 49(2):597-601

- [32] Chaimongkol N, Khamrin P, Suantai B, et al. 2012. A wide variety of diarrhea viruses circulating in pediatric patients in Thailand. *Clin Lab* 58(1-2):117-123
- [33] Chee-Sieng Khor, I-Ching Sam, Poh-Sim Hool, et al. 2012. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatrics* 12:32
- [34] Shuvra Kanti Dey, Hideaki Shimizu, Tung Gia Phan, et al. 2009. Molecular epidemiology of adenovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *Infect. Genet. Evol* 9:518-522
- [35] Leera Kittigul, Kannika Pombubpa, Yuthana Taweekate, et al. 2009. Molecular Characterization of Rotaviruses, Noroviruses, Sapovirus, and Adenoviruses in Patients with Acute Gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 81:345-353
- [36] Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, et al. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 84: 570-573.
- [37] Enders JF, Bell JA, Dingle JH, et al. 1956. "Adenoviruses": Group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 124: 119-120.
- [38] Trentin JJ, Yabe Y, and Taylor G. 1962. The quest for human cancer viruses. *Science*. 137: 835-849.
- [39] Mackey JK, Rigden PM, and Green M. 1976. Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73: 4657-4661.
- [40] Seiradake E and Cusack S. 2005. Crystal structure of enteric adenovirus serotype 41 short feber head. *J Virol* 79: 14088-14094.
- [41] Benko M, Harrach B, and Russell WC. 2000. Family Adenoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bisshop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB(eds), In virus taxonomy, 7th ed., P. 227-238. San Diego: Academic Press.
- [42] Wold WSM and Horwitz MS. 2007. Adenoviruses. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM, Martin MA, Roizman B(eds), Fields Virology, 5th., volume 2. P. 2398-2408. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

- [43] Arnberg, N., Pring-Akerblom, P., and Wadell G. 2002. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *J Virol* 76: 8834–8841.
- [44] Wu E., Trauger S.A., Pache L., Mullen T.M., et al. 2004. Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol* 78: 3897-3905.
- [45] Smith J.G., Wiethoff C.M., Stewart P.L., and Nemerow G.R. 2010. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 343: 195–224.
- [46] Wiethoff C.M., Wodrich H., Gerace L., and Nemerow G.R. 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol*, 79:1992–2000.
- [47] Russell W.C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 81: 2573-2604.
- [48] Dimmock NJ, Easton AJ, and Leppard KN. 2001. Introduction to Modern Virology, 5th ed., P. 37. United State of America: Blackwell Publishing.
- [49] Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. 1993. Difference imaging of adenovirus-bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron-microscopy. *EMBO J*. 12: 2589-2599.
- [50] Levy JA, Fraenkel-Conrat H, and Owens RA. 1994. Virology, 3rd edition. P. 185-192. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- [51] Vellinga J, Van der Heijdt S, and Hoeben RC. 2005. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol*. 86: 1581-1588.
- [52] Soumitra R, Shirley PS, McClelland A, and Kaleko M. 1998. Circumvention of immunity to the adenovirus major core protein hexon. *J Virol*. 72:6875-6879.
- [53] Soeren Hofmayer, Ijad Madisch, Sebastian Darr, Fabienne Rehren, and Albert Heim. 2009. Unique sequence features of the Human Adenovirus 31 complete genomic sequence are conserved in clinical isolates. *BMC Genomics*. 10:557.
- [54] Carson SD. 2001. Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses:CAR. *REV MED VIROL*. 11: 219-226.
- [55] Greber, U.F., Webster, P., et al. 1996. The role of the adenovirus protease on virus entry into cell. *EMBO J*. 15: 1766-1777.

- [56] Shenk T. 1996. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds), *Fields Virology*, 3rd ed., vol. 2. P. 2111-2171. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- [57] Ya-Fang Mei, Johan Skog, Kristina Lindman, and Goran Wadell. 2003. Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C. *J Gen Virol*. 84: 2061-2071.
- [58] Jones II MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, de la Cruz WP, et al. 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*. 81:5978-5984.
- [59] He JW, and Jiang S. 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol* 71: 2250-2255.
- [60] Leen AM, and Rooney CM. 2004. Adenovirus as an emerging pathogen in immune compromised patients. *Br. J. Haematol*. 128: 135-144.
- [61] Kidd AH, Jonsson M, Garwicz D, Kajon AE, et al. 1996. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. *J Clin Virol* 34: 622-627.
- [62] Hierholzer JC. 1992. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 5: 262-274.
- [63] Booth JL, Coggeshall KM, Gordon BE, Metcalf JP. 2004. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 in a lung slice model and requires activation of Erk. *J Virol*. 78: 4156-4164.
- [64] Garnett CT, Erdman D, Xu W, and Gooding LR. 2002. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 76: 10608-10616.
- [65] Lord A, Bailey AS, Klapper PE, Snowden N, and Khoo SH. 2000. Impaired humoral responses to subgenus D adenovirus infection in HIV-positive patients. *J Med Virol* 62: 405-409.
- [66] Jernigan JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, Conway BP, et al. 1993. Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic risk factors and control. *J Infect Dis* 167: 1307-1313.

- [67] Hilleman MR. 1956. Acute respiratory illness caused by adenoviruses; a military problem. U.S. Armed Force Medical Journal 7: 1717-1725.
- [68] Purkayastha A, Ditty SE, Su J, McGraw J, Hadfield TL, Tibbetts C, and Seto D. Genomic and bioinformatics analysis of HAdV-4, a human adenovirus causing acute respiratory disease: implications for gene therapy and vaccine vector development. J Virol 79: 2559-2572.
- [69] Kaori Nakanishi, Takeshi Tsugawa, Shinjiro Honma, et al. 2009. Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan. J Clin Virol 46:94-97.
- [70] Crawford-Miksza L, and Schnurr DP. 1996. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. J Virol 70: 1836-1844.
- [71] Kojaoghlanian T, Flomenberg P, and Horwitz MS. 2003. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. Rev Med Virol 13: 155-171.
- [72] Desselberger U, and Gray J. 2003. Viral gastroenteritis: enteric adenoviruses. P. 383-445. New York: Elsevier.
- [73] Lee HK, and Jeong YS. 2004. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. Appl Environ Microbiol 70: 3632-3636.
- [74] Echavarria M. 2009. Adenoviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P (eds), Principles and Practice of Clinical Virology, 6th ed. P. 463-488. Wiley-Blackwell: John Wiley & Sons, Ltd.
- [75] Reina J, Hervas J, and ROs MJ. 1994. Differential clinical characteristics among pediatric patients with gastroenteritis caused by rotavirus and adenovirus. Enferm Infecc Microbiol Clin 12: 378-384.
- [76] Sabin CA, Clewley GS, Deayton JR, Mocroft A, et al. 1999. Shorter survival in HIV-positive patients with diarrhea who excrete adenovirus from the GI tract. J Med Virol 58: 280-285.
- [77] Swenson PD. 1999. Adenoviruses. In: Lennette EH, Smith TF. (eds), Laboratory Diagnosis of Viral Infections. P. 287-303. New York: Marcel Dekker, Inc.

- [78] Turner M, Istre GR, Beauchamp H, et al. 1987. Community outbreak of adenovirus type 7a infections associated with a swimming pool. South Med J. 80: 712-715.
- [79] Wiedbrauk DL, and Johnston SJG. 1993. Adenoviruses: Manual of Clinical Virology. P. 54-63. New York: Raven Press.
- [80] Martin AL, and Kudesia G. 1990. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting adenoviruses in stool specimens: comparison with electron microscopy and isolation. J Clin Pathol 43: 514-515.
- [81] Tsutsumi H, Ouchi K, Ohsaki M, et al. 1999. Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: comparison with virus isolation in tissue culture. J Clin Virol 37: 2007-2009.
- [82] Ryan MAK, Gray GC, Malasig MD, et al. 2001. Two fatal cases of adenovirus-related illness in previously healthy young adults-Illinois, 2000. Morbidity and Mortality Weekly Report 50: 553-555.
- [83] Kolavic-Gray SA, Binn LN, sanchez JL, et al. 2002. Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: epidemiological, clinical, and laboratory studies. Clin Infect Dis 35: 808-818.
- [84] Tsung-Pei Tsou, Boon-Fatt Tan, Hsin-Yu, Chang et al. 2012. Community Outbreak of Adenovirus, Taiwan, 2011. Emerg Infect Diseases 18:1825-1832.
- [85] John E. Herrmann, Neil R. Blacklow, et al. 1988. Incidence of Enteric Adenoviruses among Children in Thailand and the Significance of these Viruses in Gastroenteritis. J Clin Virol 26: 1783-1786.
- [86] Harsha Verma, Shobha D. Chitambar, and Gopalkrishna Varanasi. 2009. Identification and Characterization of Enteric Adenovirus in Infants and Children Hospitalized for Acute Gastroenteritis. J Med Virol 81:60-64.
- [87] Cheryl S.Y. Li, Paul K.S. Chan, and Julian W. Tang. 2009. Prevalence of Diarrhea Viruses in Hospitalized Children in Hong Kong in 2008. J Med Virol 81:1903-1911.
- [88] Adissa Tran, Deborah Talmud, Benoit Lejeune et al. 2010. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, and Astrovirus Infections and Coinfections among Hospitalized Children in Northern France. J Clin Microbiol 48: 1943-1946.

- [89] German G, Gonzalez, Ferdinando Liprandi, and Juan E. Ludert. 2011. Molecular Epidemiology of Enteric Viruses in Children with Sporadic Gastroenteritis in Valencia, Venezuela. J Med Virol 83: 1972-1982.
- [90] Jeong-Weon Huh, Woon-Ho Kim, Su-Gyeong Moon et al. 2009. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in Gyeonggi province, South Korea. J Clin Virol 44: 152-156.
- [91] Lirong Zou, Jie Zhou, Hui Li, et al. 2012. Human adenovirus infection in children with acute respiratory tract disease in Guangzhou, China. APMIS 120:683-688
- [92] K. Banyai, P. Kisfali, A. Bogdan et al. 2009. Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28:997-999.
- [93] S. K. DEY, I. HOQ, S. OKITSU et al. 2012. Prevalence, seasonality, and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995-2009. Epidemiol Infect. doi:10.1017/S0950268812001586
- [94] Gu Z, Belzer SW, Gibson CS, Bankowski MJ, and Hayden RT. 2003. Multiplex, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. J Clin Virol 41: 4636-4641.
- [95] ตริทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้น : มห้ศจรรยข์องค้เ็นเอ. กรุงเทพมหานคร: แอคทีฟ พรินท์.
- [96] Bohmer, K. 2010. Nasopharyngeal aspiration vacuum-assisted method [Online]. Available from:http://home.caregroup.org/departments/pathology/lab_manual/PLM_specimen_nasoph.htm [2011, May 12]
- [97] Wanhong Xu, Mike C. Mcdonough, and Dean D. Erdman. 2000. Species-Specific Identification of Human Adenoviruses by a Multiplex PCR Assay. J Clin Microbiol 38:4114-4120.
- [98] X. LU and D. D. Erdman. 2006. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. Arch Virol 151:1587-1602.
- [99] Fairchok MP, Martin ET, Chambers S, et al. 2010. Epidemiology of viral respiratory tract infections in a prospective cohort of infants and toddlers attending daycare. J Clin Virol 49:16-20.

- [100] Suresh B. Selvaraju, Michelle Kovac, Laura M. Dickson, et al. 2011. Molecular epidemiology and clinical presentation of human adenovirus infections in Kansas City children. *J Clin Virol* 51:126-131.
- [101] Wang YX, Li DD, Jin Y, et al. 2012. Molecular epidemiological and clinical feature of human calicivirus and adenovirus among children with diarrhea less than 5 years old from 2010 to 2011 in Lanzhou, Gansu province. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 26:8-10.
- [102] Cooper RJ, Hallett R, Tullo AB, and Klapper PE. 2000. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol Infect* 125:333-345.
- [103] Li Xie, Xin-Fen Yu, Zhou Sun et al. 2012. Two Adenovirus Serotype 3 Outbreaks Associated with Febrile Respiratory Disease and Pharyngoconjunctival Fever in Children under 15 Years of Age in Hangzhou, China, during 2011. *J Clin Microbiol* 50(6):1879-1888
- [104] Yun BY, Kim MR, Park JY, et al. 1995. Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 14:1054-1059
- [105] Chew FT, Doraisingam S, Ling AE, et al. 1998. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiol Infect* 121:121-128
- [106] Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, et al. 2006. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:21-24.
- [107] Ji W, Chen ZR, Guo HB, et al. 2011. Characteristics and the prevalence of respiratory viruses and the correlation with climatic factors of hospitalized children in Suzhou children's hospital. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 45:205-210
- [108] Fox JP, Hall CE, Cooney MK. 1977. The Seattle virus watch. IV. Observation adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 105:362-386.
- [109] Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, et al. 2001. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 32:1423-1429.
- [110] Li QG, Zheng QJ, Liu YH, Wadell G. 1996. Molecular epidemiology of adenovirus types 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing. *J Med Virol* 49:170-177.

- [111] Liuying Tang, Li Wang, Xiaojuan Tan, Wenbo Xu. 2011. Adenovirus serotype 7 associated with a severe lower respiratory tract disease outbreak in infants in Shaanxi Province, China. Virology 8:23.
- [112] Dean D. Erdman, Wanhong Xu, Susan I. Gerber, et al. 2002. Molecular Epidemiology of Adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. Emerg Infect Diseases 8:269-277.
- [113] Qi HM, Jin Y, Duan ZJ, et al. 2009. Molecular epidemiology of human adenovirus diarrhea among infants and young children in Lanzhou from July 2005 to June 2008. Zhonghua Er Ke Za Zhi 47:922-925.
- [114] Li L, Phan TG, Nguyen TA, et al. 2005. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. Microbiol Immunol 49:121-128.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

1. Phosphate Buffer Saline (PBS)

PBS	9.88	กรัม
-----	------	------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไป autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารเคมีสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	2	กรัม
1 x TBE	100	มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าไปไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

2. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

4. Loading dye

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

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

การเตรียมสารเคมีในการทำ cloning

1. LB agar 100 ml

agar	1.5	กรัม
yeast extract	0.5	กรัม
peptone	1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml แล้วนำไปผ่านการ autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลง เติม ampicilin 100 µg/ml แล้วเตรียมเทปริมาณ 35 mL ใส่ plate

2. LB broth 50 ml

yeast extract	0.25	กรัม
peptone	0.5	กรัม
NaCl	0.25	กรัม

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 ml แล้วนำไปผ่านการ autoclave

3. SOC medium 100 ml

yeast extract	0.5	กรัม
peptone	2	กรัม
NaCl	1	มิลลิลิตร
KCl	0.25	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml จากนั้นเติมกลูโคส 100 µl และ Mg^{2+} 100 µl

ภาคผนวก ข

ข้อมูลของตัวอย่างที่มีเชื้ออะดีโนไวรัสพร้อมรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	acssesion no.
1	CU-B388	1 ปี	11 ม.ค. 52	C	2	KC632617
2	CU-B399	1 ปี	17 ม.ค. 52	C	2	KC632618
3	CU-B404	1 ปี	20 ม.ค. 52	F	41	KC632619
4	CU-B438	4 เดือน	24 ม.ค. 52	C	1	KC632620
5	CU-B445	1 ปี 2 เดือน	29 ม.ค. 52	C	1	KC632621
6	CU-B447	7 เดือน	29 ม.ค. 52	C	2	KC632622
7	CU-B495	2 เดือน	19 มี.ค. 52	B	3	KC632623
8	CU-B501	6 เดือน	19 มี.ค. 52	D	17	KC632624
9	CU-B512	1 ปี 8 เดือน	17 ก.พ. 52	B	3	KC632625
10	CU-B513	11 เดือน	19 ก.พ. 52	C	6	KC632626
11	CU-B515	na	20 ก.พ. 52	B	3	KC632627
12	CU-B526	9 เดือน	24 ก.พ. 52	F	41	KC632628
13	CU-B531	8 เดือน	2 มี.ค. 52	B	3	KC632629
14	CU-B536	2 ปี	4 มี.ค. 52	F	41	KC632630
15	CU-B559	1 ปี	23 มี.ค. 52	B	3	KC632631
16	CU-B560	1 ปี 5 เดือน	2 มี.ค. 52	C	2	KC632632
17	CU-B611	na	11 ม.ค. 52	C	1	KC632633
18	CU-B614	na	11 ม.ค. 52	C	2	KC632634
19	CU-B622	na	13 ม.ค. 52	F	41	KC632635
20	CU-B640	1 ปี	12 พ.ย. 52	C	5	KC632636
21	CU-B716	1 ปี 4 เดือน	6 ก.พ. 53	C	5	KC632637
22	CU-B726	9 เดือน	15 ก.พ. 53	C	2	KC632638
23	CU-B768	1 ปี	19 มี.ค. 53	C	5	KC632639
24	CU-B835	1 เดือน	23 มิ.ย. 53	F	41	KC632640

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	accession no.
25	CU-B844	8 เดือน	30 มิ.ย. 53	C	5	KC632641
26	CU-B855	1 เดือน	21 ก.ค. 53	C	1	KC632642
27	CU-B858	1 ปี	3 ก.ค. 53	B	3	KC632643
28	CU-B885	1 ปี 6 เดือน	25 ส.ค. 53	C	5	KC632644
29	CU-B888	7 เดือน	28 ส.ค. 53	F	41	KC632645
30	CU-B905	8 เดือน	13 ต.ค. 53	C	1	KC632646
31	CU-B939	2 ปี 8 เดือน	8 ธ.ค. 53	F	40	KC632647
32	CU-B946	2 ปี 4 เดือน	11 ธ.ค. 53	F	40	KC632648
33	CU-B967	5 ปี	28 ธ.ค. 53	C	5	KC632649
34	CU-B971	11 เดือน	1 ม.ค. 54	F	41	KC632650
35	CU-B975	4 ปี	03 ม.ค. 54	F	41	KC632651
36	CU-B986	11 เดือน	10 ม.ค. 54	C	1	KC632652
37	CU-B987	1 ปี 2 เดือน	11 ม.ค. 54	C	1	KC632653
38	CU-B992	9 เดือน	12 ม.ค. 54	C	2	KC632654
39	CU-B1061	1 ปี 4 เดือน	04 ก.พ. 54	C	2	KC632580
40	CU-B1033	3 ปี 11 เดือน	26 ม.ค. 54	F	41	KC632579
41	CU-B1072	1 ปี	06 ก.พ. 54	C	1	KC632581
42	CU-B1091	8 เดือน	19 ก.พ. 54	C	5	KC632582
43	CU-B1094	1 ปี 2 เดือน	22 ก.พ. 54	C	1	KC632583
44	CU-B1107	1 ปี	1 มี.ค. 54	F	41	KC632584
45	CU-B1111	8 เดือน	2 มี.ค. 54	F	40	KC632585
46	CU-B1113	1 ปี 1 เดือน	3 มี.ค. 54	C	1	KC632586
47	CU-B1121	8 เดือน	7 มี.ค. 54	C	5	KC632587
48	CU-B1122	1 ปี 4 เดือน	8 มี.ค. 54	C	1	KC632588
49	CU-B1131	6 เดือน	19 มี.ค. 54	F	41	KC632589
50	CU-B1137	1 ปี	28 มี.ค. 54	F	41	KC632590

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	accession no.
51	CU-B1142	1 ปี	1 เม.ย. 54	B	7	KC632591
52	CU-B1148	2 ปี 4 เดือน	2 เม.ย. 54	C	2	KC632592
53	CU-B1171	10 เดือน	24 พ.ค. 54	F	41	KC632593
54	CU-B1179	10 เดือน	4 มิ.ย. 54	F	41	KC632594
55	CU-B1188	1 ปี 9 เดือน	27 มิ.ย. 54	C	1	KC632595
56	CU-B1209	3 ปี	23 ก.ย. 54	B	11	KC632596
57	CU-B1233	9 เดือน	26 ต.ค. 54	C	2	KC632597
58	CU-B1249	2 ปี 11 เดือน	8 พ.ย. 54	B	3	KC632598
59	CU-B1257	2 ปี	15 พ.ย. 54	B	3	KC632599
60	CU-B1267	4 ปี 1 เดือน	23 พ.ย. 54	B	3	KC632600
61	CU-B1273	2 ปี 3 เดือน	5 ธ.ค. 54	B	3	KC632601
62	CU-B1277	5 เดือน	14 ธ.ค. 54	C	1	KC632602
63	CU-B1342	2 ปี 4 เดือน	11 ก.พ. 55	C	2	KC632603
64	CU-B1435	2 ปี 4 เดือน	2 พ.ค. 55	C	1	KC632606
65	CU-B1389	1 ปี	30 มี.ค. 55	C	2	KC632605
66	CU-B1368	child	14 มี.ค. 55	C	6	KC632604
67	CU-B1447	10 เดือน	5 พ.ค. 55	C	6	KC632607
68	CU-B1458	7 ปี	12 พ.ค. 55	D	8	KC632608
69	CU-B1472	8 เดือน	10 พ.ค. 55	C	6	KC632609
70	CU-B1478	40 ปี	22 พ.ค. 55	F	41	KC632610
71	CU-B1480	5 ปี	20 พ.ค. 55	F	41	KC632611
72	CU-B1482	26 วัน	25 พ.ค. 55	F	41	KC632612
73	CU-B1488	68 ปี	26 พ.ค. 55	F	41	KC632613
74	CU-B1500	1 ปี	28 พ.ค. 55	F	41	KC632614
75	CU-B1522	8 ปี	30 มิ.ย. 55	B	11	KC632615
76	CU-B1535	1 ปี	6 ก.ค. 55	C	6	KC632616

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	accession no.
77	CU-Bkk19	4 ปี	14 มิ.ย. 52	B	3	KC632661
78	CU-Bkk43	4 ปี 10 เดือน	16 มิ.ย. 52	C	1	KC632673
79	CU-Bkk50	4 ปี	17 มิ.ย. 52	B	3	KC632681
80	CU-Bkk164	9 ปี 1 เดือน	28 มิ.ย. 52	B	3	KC632658
81	CU-Bkk1194	3 ปี	31 ก.ค. 52	C	1	KC632655
82	CU-Bkk1466	3 ปี	25 ก.ย. 52	C	5	KC632656
83	CU-Bkk1521	2 ปี	4 ก.ย. 52	C	1	KC632657
84	CU-Bkk1808	10 ปี	6 ม.ค. 53	C	1	KC632659
85	CU-Bkk1864	9 ปี	20 ม.ค. 53	C	5	KC632660
86	CU-Bkk1910	3 ปี	27 ม.ค. 53	C	1	KC632662
87	CU-Bkk1931	1 ปี	29 ม.ค. 53	C	1	KC632663
88	CU-Bkk2055	4 ปี	9 ก.พ. 53	C	5	KC632665
89	CU-Bkk3714	4 ปี	18 ก.ย. 53	B	3	KC632670
90	CU-Bkk3775	4 ปี	20 ก.ย. 53	F	41	KC632671
91	CU-Bkk2003	1 ปี	4 ก.พ. 53	C	1	KC632664
92	CU-Bkk4058	3 ปี	2 ต.ค. 53	C	2	KC632672
93	CU-Bkk3250	2 ปี	3 ก.ย. 53	B	3	KC632669
94	CU-Bkk3242	5 ปี	3 ก.ย. 53	B	3	KC632668
95	CU-Bkk2697	4 ปี	18 ส.ค. 53	C	1	KC632666
96	CU-Bkk3218	3 ปี	2 ก.ย. 53	C	2	KC632667
97	CU-Bkk4519	6 ปี	10 ม.ค. 54	B	3	KC632674
98	CU-Bkk4617	3 ปี	21 ก.พ. 54	B	3	KC632677
99	CU-Bkk4627	4 ปี	26 ก.พ. 54	B	3	KC632678
100	CU-Bkk5690	2 ปี	14 ก.ย. 54	B	3	KC632683
101	CU-Bkk5098	1 ปี	2 ส.ค. 54	B	7	KC632682
102	CU-Bkk4888	2 ปี	17 ก.ค. 54	C	1	KC632680

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	accession no.
103	CU-Bkk4663	4 ปี	30 มี.ค. 54	B	3	KC632679
104	CU-Bkk4539	2 ปี	19 ม.ค. 54	B	7	KC632675
105	CU-Bkk4543	5 ปี	22 ม.ค. 54	B	3	KC632676
106	CU-Bkk6169	7 ปี	30 มี.ค. 55	B	11	KC632684
107	CU-Bkk7021	2 ปี	26 ก.ย. 55	C	2	KC632685
108	CU-C73	14 ปี	4 ก.ย. 52	B	3	KC632715
109	CU-C296	1 ปี	7 ต.ค. 52	C	1	KC632710
110	CU-C550	1 ปี	6 ม.ค. 53	C	6	KC632711
111	CU-C553	2 ปี	6 ม.ค. 53	C	1	KC632712
112	CU-C561	2 ปี	14 ม.ค. 53	C	1	KC632713
113	CU-C663	4 ปี	17 ก.พ. 53	B	11	KC632714
114	CU-C785	7 ปี	7 เม.ย. 53	C	5	KC632716
115	CU-C1017	2 ปี	29 ก.ค. 53	C	1	KC632686
116	CU-C1256	43 ปี	5 ต.ค. 53	C	5	KC632687
117	CU-C1417	1 ปี	24 พ.ย. 53	C	1	KC632688
118	CU-C1525	4 ปี	6 ม.ค.54	C	5	KC632689
119	CU-C1551	1 ปี	13 ม.ค.54	C	1	KC632690
120	CU-C1645	2 ปี	15 ก.พ. 54	c	2	KC632691
121	CU-C1662	4 ปี	23 ก.พ. 54	C	2	KC632693
122	CU-C1695	2 ปี	2 มี.ค.54	B	3	KC632694
123	CU-C1838	1 ปี	27 เม.ย. 54	D	56	KC632696
124	CU-C1840	1 ปี	27 เม.ย. 54	C	2	KC632697
125	CU-C1852	1 ปี	10 พ.ค. 54	C	5	KC632698
126	CU-C1768	16 ปี	22 มี.ค. 54	B	3	KC632695
127	CU-C1653	1 ปี	15 ก.พ. 54	C	1	KC632692
128	CU-C1999	1 ปี	5 มิ.ย. 54	C	2	KC632699
129	CU-C2050	1 ปี	25 ก.ค. 54	B	3	KC632700

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	accession no.
130	CU-C2125	3 ปี	25 ส.ค. 54	C	5	KC632701
131	CU-C2157	1 ปี	31 ส.ค. 54	B	3	KC632702
132	CU-C2387	3 ปี	29 พ.ย. 54	B	3	KC632703
133	CU-C2679	2 ปี	8 มี.ค. 55	C	1	KC632704
134	CU-C2689	1 ปี	14 มี.ค. 55	C	1	KC632705
135	CU-C2701	2 ปี	14 มี.ค. 55	B	3	KC632706
136	CU-C2717	5 ปี	22 มี.ค. 55	B	3	KC632707
137	CU-C2738	1 ปี	29 มี.ค. 55	C	2	KC632708
138	CU-C2771	4 เดือน	11 เม.ย. 55	B	3	KC632709
139	CU-CU128	1 ปี	19 ก.ย. 54	B	3	KC632717
140	CU-CU263	5 เดือน	26 ธ.ค. 54	C	1	KC632718
141	CU-CU279	1 ปี	23 ม.ค. 55	C	2	KC632719
142	CU-CU291	4 เดือน	16 ก.พ. 55	C	2	KC632720
143	CU-CU295	7 ปี	16 ก.พ. 55	B	7	KC632721
144	CU-CU394	11 เดือน	31 ก.ค. 55	B	3	KC632722
145	CU-CU419	1 ปี	27 ส.ค. 55	C	1	KC632723
146	CU-CU490	1 ปี	25 ต.ค. 55	C	5	KC632724
147	CU-H471	child	24 ส.ค. 52	C	1	KC632734
148	CU-H885	child	5 พ.ย. 52	C	2	KC632735
149	CU-H918	child	12 พ.ย. 52	C	1	KC632736
150	CU-H1147	child	24 ธ.ค. 52	C	1	KC632725
151	CU-H1237	16 ปี	14 ม.ค. 53	C	6	KC632726
152	CU-H1984	child	10 มี.ย. 53	C	1	KC632727
153	CU-H2010	child	17 มี.ย. 53	C	1	KC632728
154	CU-H2203	child	19 ส.ค. 53	F	41	KC632729
155	CU-H2703	1 ปี	4 พ.ย. 53	B	3	KC632730
156	CU-H2743	1 ปี	18 พ.ย. 53	C	5	KC632731

ลำดับ	Code	อายุ	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	HAdV supgroup	HAdV genotype	acssesion no.
157	CU-H2804	2 ปี	9 ธ.ค. 53	B	3	KC632732
158	CU-H2820	8 ปี	13 ธ.ค. 53	B	3	KC632733

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร Virology Journal หัวข้อเรื่อง Molecular Epidemiology and Characterization of Human Adenovirus Infection in Thailand, 2009-2012.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล พรรณิณี ศรีวรรณ เพศ หญิง

อายุ 25 ปี เกิด 15 กรกฎาคม 2530

สถานที่เกิด โรงพยาบาลพุทธโสสง จังหวัดบุรีรัมย์

ที่อยู่ 77/33 หมู่ 9 โนนทอง 9 ต.ลาดบัวขาว อ.สีคิ้ว ถ.มิตรภาพ จ.นครราชสีมา 30340

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2552

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2554

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : Molecular Epidemiology and Characterization of Human Adenovirus

Infection in Thailand, 2009-2012. เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Virology

Journal