

# รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรวจสอบสายพันธุ์และความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัส  
ในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการท้องเสียรุนแรงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล

โดย

ผศ. ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส

นางสาวพัชรินทร์ โชติช่วง

นายวรวัฒน์ สุขคำ

นายวิทยา ภูมิภักดิ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ที่เป็นเงินอุดหนุนจากรัฐบาล

ลักษณะงานวิจัยและพัฒนาถ่ายทอดเทคโนโลยี

งบประมาณ ปี 2557

## ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากจากบุคคลหลายท่านที่ทุ่มเทร่างกายและใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ อาทิ นางสาวพัชรินทร์ โชติช่วง และนายวรวัฒน์ สุขคำ นิสิตสาขาชีวเวชศาสตร์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ senior project และนายวิทยา ภูมิภักดิ์ ศิษย์เก่าที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านต่างๆ นอกจากนี้ขอขอบคุณสถาบันบาราศนราตुरที่ร่วมวิจัยในการให้ตัวอย่างมาทำการทดสอบ และท้ายสุดขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2557

อุไรวรรณ อินทมาโส

30 มีนาคม 2558

## The detection of genotypes and genetic linkage of rotaviruses in admitted pediatric patients with severe diarrhea

Uraiwan Intamaso<sup>\*</sup>, Phatcharin Chotchuang, Woravat Sunkkham, Witthaya Poomipak

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Bangsaen, Chonburi

\*Corresponding author: [urawani@buu.ac.th](mailto:urawani@buu.ac.th)

Rotavirus is one of the most important food-borne pathogen that cause diarrhea mainly in babies and children under the age of five all over the world. Currently, available vaccines have efficiency in protection only some strains. This project was aimed at the detection of G-genotype and P-genotype of rotavirus from 128 hospitalized children at Bamrasnaradura Infectious Institute. RNA was extracted from patients' feces and subsequently detected for G- and P-genotypes by RT-PCR and Multiplex Semi-Nested PCR. Designated DNA bands analyzed by agarose gel electrophoresis were extracted from the gel and analyzed by DNA sequencing and phylogenetic tree. G1-G3 genotypes were found at 72.66%, 7.03%, 3.91%, respectively as well as G8 and G9 genotypes at 14.06 % and 1.56%, respectively. For P-genotype, only P[8] and P[4] genotypes were found at 64.85% and 6.25%, respectively but not P[6] and P[9] genotypes. G/P combinations were reported only 91 samples out of 128 samples such as 58 of G1P[8], 8 of G2P[4], 1 of G2P[8], 4 of G3P[8], 18 of G8P[8] and 2 of G9P[8] genotype. Monitoring the prevalence of rotavirus is very useful for the development of vaccines that have efficiency in protection of the present rotavirus strains

**Key words:** Rotaviruses, prevalence, G-genotype, P-genotype, G/P combinations

การตรวจสอบสายพันธุ์และความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัสในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการ  
ท้องเสียรุนแรงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล

อุไรวรรณ อินทมาโส\*, นางสาวพัชรินทร์ โชติช่วง, นายวรรณ สุขคำ, นายวิทยา ภูมิภักดิ์

<sup>1</sup>คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

\* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก: uraiwani@buu.ac.th

ไวรัสโรตา ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ติดต่อผ่านทางกรกินเป็นสาเหตุหลักของโรคท้องร่วงในเด็กแรกเกิด และเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ขวบ ซึ่งมีการแพร่กระจายอยู่ทุกประเทศทั่วโลก ในปัจจุบันวัคซีนที่ใช้ในการ ป้องกันเชื้อไวรัสโรตายังมีประสิทธิภาพในการป้องกันไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ โครงการวิจัยนี้ได้ตรวจหา G-genotype และ P genotype ของเชื้อไวรัสโรตา จากอุจจาระจากผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาตัวที่ สถาบันบำราศนราดูรด้วยอาการท้องเสียอย่างรุนแรง จำนวน 128 ตัวอย่าง อุจจาระจากผู้ป่วยถูกนำมาสกัด RNA จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR และเทคนิค Multiplex Semi-Nested PCR เพื่อ ตรวจสอบ G- หรือ P- genotype จากการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis นำ DNA เป้าหมายสกัดออกจาก gel แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing และวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางสายสกุล จากผลการศึกษพบ G1-G3 genotype ร้อยละ 72.66, 7.03, 3.91 ตามลำดับ ร่วมกับ G8 และ G9 genotype ร้อยละ 14.06 และ 1.56 ตามลำดับ ส่วน P genotypes พบ P[8] และ P[4] เท่านั้นที่ร้อยละ 64.85 และ 6.25 ตามลำดับ และไม่พบ P[6] และ P[9] genotypes และสามารถ รายงาน ผล G/P combination ได้ทั้งหมด 91 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งหมด 128 ตัวอย่าง ได้แก่ G1P[8] จำนวน 58 , G2P[4] จำนวน 8, G2P[8] จำนวน 1, G3P[8] จำนวน 4, G8P[8] จำนวน 18 และ G9P[8] 2 ตัวอย่าง การติดตามความชุกของของเชื้อโรตาไวรัสจึงมีประโยชน์มากในการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ ในการป้องกันเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์ที่กำลังแพร่ระบาดอยู่

คำสำคัญ: โรตาไวรัส, ความชุก, จีจีโนไทป์, พีจีโนไทป์, จีพีคอมบิเนชัน

ประกาศคุณูปการ	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
สารบัญ	iv
<b>สารบัญตาราง</b>	v
สารบัญรูปภาพ	vi
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
การเก็บตัวอย่างอุจจาระ	7
การสกัด RNA ของโรตาไวรัส	7
การตรวจหา G genotype ของโรตาไวรัส	7
การตรวจหา P genotype ของโรตาไวรัส	8
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 และ VP4 gene	11
การวิเคราะห์ความเป็นสายสกุลด้วย phylogenetic analysis	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การตรวจสอบ genotype ของ VP7	13
การขยายเพิ่มจำนวน full length cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR	13
การตรวจสอบ VP7 genotype ด้วย multiplex semi-nested PCR	13
การทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 gene	14
การตรวจสอบ genotype ของ VP4	17
การขยายเพิ่มจำนวน full length cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR	17
การตรวจสอบ VP4 genotype ด้วย multiplex semi-nested PCR	17
การทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP4 gene	18
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	
อภิปรายผลการทดลอง	21
สรุปผลการทดลอง	23
ปัญหาและอุปสรรค	23
บรรณานุกรม	24

## สารบัญตาราง (Table of Contents)

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR และ Multiplex semi-Nested PCR	9
3.2 ตารางแสดง condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Monoplex Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)	9
3.3 ตารางแสดง condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Multiplex Semi Nested-PCR	10
4.1 แสดงผลการแยก G-genotype	15

## สารบัญรูปภาพ (List of Illustrations)

รูปที่	หน้า
3.1 รูปแสดง genotyping VP7	10
3.2 รูปแสดง genotyping VP4	11
4.1 ตัวอย่างขนาดของfull length cDNA ที่ได้จากเพิ่มขยายจำนวน VP7 gene ด้วย ปฏิกิริยา monoplex RT-PCR	13
4.2 แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการแยก G-genotype โดยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR	14
4.3 รูปแสดง phylogenetic tree ของ VP7 gene	16
4.4 ตัวอย่างขนาดของ full lengthc DNA ที่ได้จากเพิ่มขยายจำนวน VP4 gene ด้วย ปฏิกิริยา monoplex RT-PCR	17
4.5 รูปแสดงตัวอย่างขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการแยก P-genotype โดยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR	18
4.6 แผนผังแสดงสรุปร้อยละของ subtype P4 ที่ตรวจพบ	19
4.7 รูปแสดง phylogenetic tree ของ VP4 gene	20

## บทที่ 1 บทนำ

โรตาไวรัส (Rotaviruses) เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรงในเด็กทารกหรือเด็กเล็กทั่วโลก และทำให้ผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี ตายจากอาการดังกล่าว ประมาณ 527,000 ราย ในแต่ละปี โดยมีอัตราการตายสูงสุดในประเทศที่กำลังพัฒนาในทวีปแอฟริกาและเอเชีย (CDC, 2008; WHO, 2004) สำหรับประเทศไทยจากการสำรวจ ปีพ.ศ. 2540-2548 ในผู้ป่วยเด็กทารกและเด็กเล็กที่มีอาการท้องเสียที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล พบว่าโรตาไวรัสเป็นสาเหตุของอาการป่วยดังกล่าวโดยเฉลี่ยถึง 42.6% (Intusoma et al., 2008; Jiraphongsa et al., 2005; Khamrin et al., 2007; Nelson et al., 2008; Sungkapalee, et. al., 2006; Theamboonlers et al., 2008)

โรตาไวรัสถูกจัดกลุ่มอยู่ใน genus *Rotavirus* และ family *Reoviridae* มีรูปร่างเป็นทรงกลม (icosahedral) ชั้นนอกสุดของอนุภาคไม่มีชั้นไขมันห่อหุ้ม (non-enveloped) อนุภาคของไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 72 นาโนเมตร ประกอบด้วย โปรตีน (capsid) 3 ชั้น ที่ห่อหุ้มอาร์เอ็นเอสายคู่ (double stranded RNA) จำนวน 11 ชิ้น ไว้อยู่ในอนุภาค เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะเห็นอนุภาคมีลักษณะคล้ายวงล้อ (wheel-shaped) โรตาไวรัสที่พบถูกแบ่งเป็นหลาย ๆ serotype จากกลุ่ม A ถึง G โดยใช้เกณฑ์จากการเป็นแอนติเจน (antigenicity) ของ VP6 อย่างไรก็ตามมีเพียง serotype A, B และ C เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการระบาดในคน (Lees, 2000) โดย serotype A ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดการระบาดในเด็กทารก และ เด็กเล็ก และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ในประเทศที่กำลังพัฒนาป่วยจากอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจนต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายได้สูงถึง 20% (Esters and Kapikian, 2001) ส่วน non-serotype A Rotaviruses พบว่ามีการระบาด เป็นระยะ ๆ ในครอบครัวหรือชุมชนผ่านทางารกิน แม้ไม่ค่อยพบได้บ่อยนัก แต่การระบาดบางครั้งทำให้เกิดอาการระบบทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis) ที่รุนแรงจนอาจทำให้เสียชีวิตได้ (Bridger, 1994)

ในกลุ่ม serotype A นั้นสามารถถูกแบ่งย่อยโดยใช้เกณฑ์การแบ่งจาก neutralizing antigens 2 ชนิด คือ VP 7 และ VP4 ที่อยู่ในส่วน capsid ชั้นนอก ถูกแบ่งออกได้เป็น G (glycoprotein) และ P (protease-sensitive) type ตามลำดับ และสามารถถูกแบ่งย่อยออกไปได้อีกโดยอาศัยข้อมูลระดับอนุชีววิทยาแบ่งออกได้ทั้งหมดเป็น 27 G serotype และ 35 P serotype (Matthijnssens et al., 2011) และอาจพบ G และ P serotype ที่พบระบาดร่วมกัน (G/P combinations) ได้ถึง 120 combinations (Matthijnssens et al., 2009) แต่ G/P combinations ที่พบทั่วโลกคือ G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] และ G9P[8] อย่างไรก็ตาม G type อื่นๆ อาทิ G5, G6, G8, G10 และ G12 ก็สามารถพบร่วมกับ P[4], P[8], P[9] และ P[14] ได้ในส่วนต่างๆของโลกได้เช่นกัน (Matthijnssens et al., 2008) นอกจากนี้โรตาไวรัสยังอาจถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกโดยใช้ VP6, NSP5 เมื่อใช้ NSP5 gene เป็นเกณฑ์ สามารถแบ่งโรตาไวรัสออกได้เป็น I, E และ H genotype ตามลำดับและได้มีรายงานไว้อย่างน้อย 16I, 14E และ 11H genotypes (Matthijnssens et al., 2008, 2011)

เนื่องจากโรตาไวรัสเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายค่อนข้างสูงมาก การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็นมาก ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวัคซีนต่อต้านโรตาไวรัสขึ้นมา 2 ชนิด ได้แก่ Rotarix ที่เป็น monovalent G1P[8] human attenuated vaccine และ RotaTeg ที่เป็น pentavalent human bovine reassorted vaccine ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ G1P[4], G2P[4], G3P[4],



G4P[4] และ G6P[8] ซึ่งได้รับอนุญาตให้ใช้ได้หลายประเทศ (Santosham et al., 2007) และได้รับอนุญาตให้นำเข้ามาใช้ในประเทศไทยแล้วตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 และ 2551 ตามลำดับ แต่เนื่องจากวัคซีนมีราคาสูง การใช้จึงจำกัดอยู่ในกลุ่มผู้มีรายได้สูงโดยเฉพาะในกรุงเทพมหานครเท่านั้น (Thai Drug Control Division, 2008) นอกจากนี้แม้วัคซีนทั้งสองชนิดได้รับการพิสูจน์แล้วว่าประสิทธิภาพในการลดจำนวนผู้ที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการท้องเสียจากโรตาไวรัสได้ในระดับหนึ่ง (Madhi et al., 2010; Armah et al., 2010; Feikin et al., 2012) อย่างไรก็ตามวัคซีนเหล่านี้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อโรตาไวรัสที่มีประสิทธิภาพพร้อมๆกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากธรรมชาติของ โรตาไวรัส ที่มีการกลายพันธุ์ได้ง่ายทำให้วัคซีนมีประสิทธิภาพในการต่อต้านการติดเชื้อของโรตาไวรัสต่างสายพันธุ์แตกต่างกัน (Patel et al., 2008; Ward and Bernstein, 2009) นอกจากนี้การที่ไวรัสจีโนม เป็นอาร์เอ็นเอ เส้นคู่ ชั้นสั้น ๆ ถึง 11 ชั้น ภายในอนุภาคทำให้สามารถเกิดการกลายพันธุ์แบบ genetic reassortment ได้ง่าย หากเกิดการติดเชื้อโรตาไวรัส สองสายพันธุ์พร้อมกันภายในเซลล์เดียวกันเหมือนกับที่เกิดกับ influenza virus

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งหมายในการตรวจหา genotype ของ rotavirus G และ P types ที่เป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องเสียแบบฉับพลันในเด็กเล็กที่เข้ารับการรักษาทันทีในสถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ข้อมูลที่ได้นอกจากทำให้ทราบถึงข้อมูลทางการกระจายของ genotype ต่างๆ (genotype distribution) และความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัสซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อโรตาไวรัสโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรง เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาวัคซีนรุ่นต่อไปให้ครอบคลุมสายพันธุ์ของโรตาไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยด้วยนอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลที่ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันด้วย

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ตรวจสอบความชุกของ rotavirus G และ P types ที่กำลังแพร่ระบาด
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัส

### ทฤษฎี สมมติฐาน

เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ multiplex semi-nested PCR สามารถนำมาใช้ในการทดสอบหา G และ P genotype จาก VP 7 และ VP4 gene ตามลำดับของโรตาไวรัสที่สามารถกระทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ โดยคู่ของ primer ที่นำไปใช้ในปฏิกิริยาต้องให้ผลผลิตที่มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันและสามารถแยกออกจากกันได้จากการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis และการวิเคราะห์ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตที่ได้นอกจากจะใช้ในการยืนยันผลการทดสอบ genotype แล้วยังใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัสได้ด้วย

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการตรวจหา genotype ของ rotavirus ชนิด G และ P ทำการทดสอบด้วยการนำอุจจาระจากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการท้องเสียฉับพลันที่หลีกเลี่ยงการตรวจในงานประจำวันของสถาบันบำราศนราดูรซึ่งผ่านการตรวจคัดกรองแล้วว่าอาการท้องเสียมีสาเหตุมาจากโรตาไวรัส นำตัวอย่างอุจจาระมาสกัด RNA ออกจากอนุภาคของโรตาไวรัสและนำมาตรวจสอบด้วยวิธี semi-nested RT-PCR ด้วยการทำปฏิกิริยา One step RT-PCR ในรอบแรก โดยใช้ primer คู่ที่เหมาะสมได้ผลผลิตเป็น full length cDNA ของ VP 7 หรือ VP4 gene หลังจากนั้นนำ cDNA มาเพิ่มขยายจำนวนต่อไปด้วย primer ที่จำเพาะ

หลายๆ คู่ ด้วยเทคนิค multiplex semi-nested PCR เพื่อตรวจสอบ G type และ P type ตามลำดับ นอกจากนี้ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR จะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบและนำมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัสที่ระบาดในคน

### **ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

จากเทคนิคที่ใช้ทำให้ทราบความชุกของ rotavirus G และ P types ที่กำลังแพร่ระบาดและความสัมพันธ์ทางสายสกุลของโรตาไวรัสด้วย

### **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ทางด้านวิชาการเพื่อตรวจสอบถึง genotype ของโรตาไวรัสที่ระบาดว่าเป็นชนิดที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคหรือมีสายพันธุ์ที่ไม่ค่อยมีการระบาดเป็นประจำ (uncommon strain) หรือไม่ ทั้งนี้เพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อด้วยการผลิตวัคซีนมาต่อต้าน genotype ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง และสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับกระทรวงสาธารณสุขที่ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาวัคซีนรุ่นต่อไปให้ครอบคลุมสายพันธุ์ของโรตาไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยด้วย นอกจากนี้สามารถนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ อาทิ Journal of Medical Virology, Journal of Infection, Genetics and evolution, Journal of Clinical Microbiology, Emerging Infectious Disease

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรตาไวรัสเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เด็กทารกและเด็กเล็กป่วย (morbidity) ด้วยอาการท้องเสียจนต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลซึ่งอาการอาจรุนแรงจนทำให้เกิดการเสียชีวิต (mortality) โดยได้มีการประมาณการไว้ว่าในประเทศไทย ผู้ป่วยที่ป่วยด้วยอาการท้องเสีย, ที่เข้าพบแพทย์ และที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมีสาเหตุมาจากโรตาไวรัสด้วยอัตราส่วน 1:8, 1:36 และ 1:85 ตามลำดับ (Jiraphongsa et al., 2005) การระบาดของ rotavirus G type มีรูปแบบการระบาดที่มีความแตกต่างกันในหลายๆ ประเทศและพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการระบาดด้วย ตัวอย่างเช่น ในประเทศออสเตรเลีย G1 เป็น type พบที่มากที่สุดในปี 1999-2001, G9 มีการระบาดสูงสุดในปี 2001-2003 และ G1 กลับมาระบาดสูงสุดอีกครั้งหลังจากปี 2004 (O’Ryan, 2009) ในประเทศอิตาลี G1 พบมีการระบาดสูงสุดในปี 2001, 2002 และ 2004 และ G9 มีการระบาดสูงสุดในปี 2005 (De Grazia et al., 2007) ในประเทศไอร์แลนด์พบ G9 มีการระบาดสูงสุดในปี 2001-2002 และ G1 พบมากที่สุดในปี 2002-2004 (Reidy et al., 2005)

จากการศึกษาที่ผ่านมาระหว่างปี 1998-2002 ในประเทศไทยก่อนที่มีการนำวัคซีนเข้ามาใช้นั้นพบว่า มีการระบาดของโรตาไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียอยู่ระหว่าง 33.3%-50.6% (เฉลี่ย 42.6%) (Intusoma et al., 2008; Khamrin et al., 2007; Nelson et al., 2008; Sungkapalee, et. al., 2006; Theamboonlers et al., 2008) ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในเด็กที่มีอายุระหว่าง 12 และ 17 เดือน (Intusoma et al., 2008; Khananusak et al., 2010) ช่วงการระบาดมีรูปแบบเป็น unimodal pattern โดยมีการระบาดสูงสุดเกิดขึ้นในช่วงที่มีอากาศหนาวที่สุดของประเทศไทยระหว่างเดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ (Jiraphongsa et al., 2005; Intusoma et al., 2008, Maneekarn and Ushijima, 2000; Khananusak et al., 2010) จากการศึกษาในประเทศไทยตั้งแต่ปี 1977-1997 ได้รายงาน serotype ของโรตาไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ในช่วงเวลาดังกล่าวพบการติดเชื้อของโรตาไวรัสอยู่ในช่วงระหว่าง 27%-34% โดยพบว่า G1 เป็น type ที่พบมากที่สุด ตามด้วย G2, G4 และ G3 (Maneekarn and Ushijima, 2000) แต่การศึกษาต่อมาระหว่างปี 2001-2003 พบว่า G9 มีการระบาดมากที่สุดในปี พ.ศ. 2001 และพบ G9 ร่วมกับ G2 ในปี พ.ศ.2003 และพบ G9P[8] มีการระบาดสูงถึง 91.6% ตามด้วย G3P[8] (4.7%), G2P[4] (2.8%) และ G3P[3] (0.9%) ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ (Khamrin et al., 2006) ขณะที่ผลจากการศึกษาระหว่างปี 2002-2004 พบว่า G9P[8] มีการระบาดลดลงเป็น 40.8% ตามด้วย G1P[8] (33.7%), G2P[4] (23.5 %) และ G3P[9] (2%) (Khamrin et al., 2007) เมื่อศึกษาต่อมาระหว่างปี 2004-2006 พบว่า G9 มีการระบาดลดลง ขณะที่ G1 ได้กลับมาระบาดเพิ่มขึ้นใหม่ โดยพบว่า G1P[8] ได้กลับมาระบาดเพิ่มขึ้นสูงถึง 62.8.% ตามด้วย G2P[4] (27.9 %) และ G3P[8] (4.7%) และ G3P[8] และ G3P[10] อย่างละ 2.3% (Khamrin et al., 2010)

ในปี 2007-2008 พบว่า G1 มีการระบาดร่วมกับ G9 โดยในปี 2007 G1P[8] ได้กลับมาระบาดเพิ่มขึ้นสูงถึง 72.3% ตามด้วย G2P[4] (19.2 %) และ G3P[8] (8.5%) ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อใช้การวิเคราะห์ทางสายสกุลด้วย phylogenetic tree ของ VP7 และ VP4 พบว่า G1 อยู่ใน lineage G1-1c และ G1-II, G2 อยู่ใน lineage G2-II และ G3 อยู่ใน lineage G3-III-S4 ส่วน P[4] และ P[8] อยู่ใน lineage P[4]-V และ P[8]-III ตามลำดับ นอกจากนี้การระบาดยังแสดงความเชื่อมโยงของ genotype ด้วย โดยพบว่า G1- P[8] หรือ G3- P[8] มักมีรูปแบบการระบาดร่วมกับ I1-E1-H1 ส่วน G2- P[4] มักมีรูปแบบการ

ระบาดร่วมกับ I2-E2-H2 genotype จากใช้การวิเคราะห์ VP6, NSP4 และ NSP5 gene ร่วมด้วย (Chaimongkol et al., 2012) หลังจากนั้นการระบาดของ G9 ได้ลดลงและหายไปในปี 2009 ขณะที่ G2 เพิ่มขึ้นและพบระบาดร่วมกับ G1 โดยพบ G1P[8] ร่วมกับ G2P[4] ในเขตกรุงเทพมหานครแต่พบ G2P[4] ในอัตราต่ำในจังหวัดขอนแก่น (Khananusak et al., 2010) การที่พบ G2P[4] ในกรุงเทพมหานครในเขตเมืองที่มีการเข้าถึงวัคซีนได้ชี้ให้เห็นถึงวัคซีนที่ใช้มีประสิทธิภาพต่ำในการต่อต้านโรตาไวรัสสายพันธุ์ G2P[4](Ruiz-Palacios et al., 2006; Ward and Bernstein, 2009) นอกจากนี้สายพันธุ์ที่พบได้บ่อยดังที่กล่าวมาแล้วยังพบการระบาดของสายพันธุ์ของ human rotavirus ที่ปกติไม่ได้พบบ่อยในบางพื้นที่ของประเทศไทยด้วย อาทิ G3P[3], G3P[9], G3P[10], G3P[19], G12P[6], G12P[8] และ G12P[9] เป็นต้น (Khamrin et al., 2006, 2007, 2009; Pongsuwanna et al., 2002; Theamboonlers et al., 2008, Khananusak et al., 2010)

G9 เป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก โดยพบมีการระบาดเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1983 และมีการระบาดต่อมาในประเทศญี่ปุ่นในปี 1985 หลังจากนั้นก็หายไปและกลับมาระบาดอีกครั้งในช่วงระหว่าง 1900-1910 เนื่องจากเป็น type ที่มีการระบาดเป็นอันดับที่ 5 ทั่วโลก จึงมีผู้แนะนำว่าควรใช้ G9 เป็น candidate vaccine (Montenegro et al., 2007) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP gene (Hashino et al., 2004) เพื่อใช้วิเคราะห์ความใกล้ชิดทางสายสกุลจาก phylogenetic tree สามารถแบ่ง G9 ออกได้อย่างน้อย 3 lineage โดย lineage I รวมถึง type ที่ระบาดในช่วงปี 1980-1990 ส่วน lineage II สามารถตรวจพบในทารกแรกเกิดที่ไม่แสดงอาการท้องร่วงในอินเดียเท่านั้น และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่มีการระบาดทั่วโลกนั้นเป็น lineage III รวมทั้งสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยด้วย (Pongsuwanna et al., 2010)

G12 พบว่ามีการระบาดครั้งแรกในประเทศฟิลิปปินส์ในปี 1990 (Taniguchi et al., 1990; Urasawa et al., 1990) หลังจากนั้นได้พบการระบาดของ type นี้ในประเทศไทย ในปี 1998-1999 (Pongsuwanna et al., 2002; Wakuda et al., 2003) รวมทั้งประเทศต่างๆ ทั่วโลก (Mathiinsens et al., 2008) เมื่อใช้การวิเคราะห์ทางสายสกุลด้วย phylogenetic tree สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 lineage โดย lineage I รวมถึงสายพันธุ์ต้นแบบ (prototype strain) L26, lineage II ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์จากประเทศไทย (strain T152) จากประเทศญี่ปุ่นและอาเจนติน่า, lineage III รวมถึงสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ในประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และเนปาล ส่วน lineage IV ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ระบาดในหมู (porcine strain), RU172 (Rahman et al., 2007) จากการเฝ้าติดตามการระบาดของ G12 ในประเทศไทยหลังจากที่พบสายพันธุ์ T152 ครั้งแรกแล้วพบ G12 ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ในช่วงระหว่างปี 2004-2005 และ 2006-2007 ที่สามารถจัดกลุ่มได้อยู่ใน lineage III (Pongsuwanna et al., 2010; Khananusak et al., 2010 ) และพบการระบาดของ G12 ในบางพื้นที่เท่านั้นเช่น จังหวัดตากที่มีชายแดนติดกับประเทศพม่า อย่างไรก็ตามยังคงมีความจำเป็นที่ต้องติดตามการแพร่ระบาดของ G12 ในประเทศไทยต่อไปว่ามีการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่อื่นอีกหรือไม่

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP 7 gene ในช่วงเวลาหนึ่งในพื้นที่เดิมด้วยวิธีวิเคราะห์ทาง genetic molecular analysis ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ G1 แต่พบมีการแทนที่ของ amino acid 2 ตำแหน่งใน G3 strain ที่พบในประเทศจีนและประเทศรัสเซีย (Trinh et al., 2007 a,b) ส่วน G2 ที่นำมาศึกษาซึ่งแยกได้จากประเทศญี่ปุ่น, จีน, ไทยและเวียดนามในปี 2001-2003 ทั้งหมดถูกจัดอยู่ใน lineage II ของ phylogenetic tree เหมือนที่พบส่วนใหญ่ที่ระบาดทั่วโลกซึ่งตรวจพบในปี 1995 เมื่อเปรียบเทียบกับ prototype G2 strain DS-1 พบการเปลี่ยนแปลงของ amino acid จาก

aspartic acid ไปเป็น asparagine ที่ตำแหน่ง 96 ของ antigenic region A ใน G2 strain ทั้งหมดที่นำมาศึกษา ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่สายพันธุ์เหล่านี้อาจจะหนีการปกป้องจากสูตรวัคซีนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ส่วน G4 strain ที่แยกได้จากประเทศเวียดนาม จัดอยู่ใน lineage Ia ของ phylogenetic tree ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศญี่ปุ่นจัดอยู่ใน lineage Ic และมีการแทนที่ amino acid เป็น asparagine ที่ตำแหน่ง 76 ในสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นซึ่งเหมือนกับ G4 strain จากประเทศอิตาลี อิตาลี ปารากวัย อุรุกวัย ที่พบตั้งแต่ปี 1998 จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการกลับมาระบาดของสายพันธุ์ดังกล่าวในประเทศญี่ปุ่น (Trinh et al., 2010)

### บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

อุจจาระตัวอย่างจากเด็กที่มีอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงที่เข้ารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร ระยะเวลาระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. 2555 – เดือนเมษายน พ.ศ. 2557 และได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าติดเชื้อไวรัสโรตาด้วยวิธี immunochromatography จำนวนอย่างน้อย 128 ตัวอย่างได้ถูกเก็บรักษาแยกแต่ละตัวอย่างไว้เป็นหลอด ๆ ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  โดยการเก็บตัวอย่างอุจจาระนั้นได้ผ่านการอนุมัติการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากมนุษย์จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยบูรพา และจากสถาบันบำราศนราดูรว่าเป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานประจำจากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาและไม่มี การเชื่อมโยงไปถึงประวัติผู้ป่วย

#### 3.2 การสกัด RNA ของโรตาไวรัส

นำตัวอย่างดังกล่าวปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  หรือ 100 mg (เมื่ออุจจาระมีลักษณะค่อนข้างแข็ง) ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นเติมสารละลาย 1x PBS buffer ปริมาตร 400  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาเก็บไว้ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  หรือนำมาสกัด RNA เพื่อนำไปใช้ในการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp  $\text{\textcircled{R}}$  Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)

นำ supernatant ปริมาตร 140  $\mu\text{l}$  ผสมกับ buffer AVL ปริมาตร 560  $\mu\text{l}$  ที่มี carrier RNA 5.6  $\mu\text{l}$  ใน 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 560  $\mu\text{l}$  ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที spin down จากนั้นดูดส่วนผสมปริมาตร 630  $\mu\text{l}$  ลงใน spin column ที่ให้มาในชุดสกัด ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทำซ้ำอีกครั้งจนส่วนผสมใน 1.5 ml microcentrifuge tube หมด จากนั้นดูด buffer AW1 ที่ผสม ethanol แล้ว ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube ต่อมาเติม buffer AW2 ที่ผสม ethanol แล้ว ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทำการปั่นซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด ethanol ที่ยังคงค้างอยู่ ทำการเปลี่ยน collection tube เป็น 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม buffer AVE ปริมาตร 40  $\mu\text{l}$  และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่มี RNA แบ่ง ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดละ 5  $\mu\text{l}$  เก็บใน  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้ทำการทดลองต่อไป

#### 3.3 การตรวจหา G genotype ของโรตาไวรัส

การตรวจหา G genotype ของ โรตาไวรัสสามารถทำได้ด้วยวิธี semi-nested multiplex RT-PCR เพื่อตรวจสอบ 4G-type ด้วย ปฏิกริยา One step RT-PCR (SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq, USA) โดยในรอบแรกของปฏิกริยา RT-PCR เป็นการเพิ่มจำนวน full-length VP7 gene ด้วย primer VP7F และ VP7R (ตารางที่ 3.1) ด้วยสภาวะที่แนบมากับชุดทดสอบแต่ได้มีการ

ปรับสภาพให้เหมาะสมดังต่อไปนี้ 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 μM forward หรือ reverse primer และใช้ RNA template ปริมาตร 3 μl และสภาวะการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.2 ผลผลิตจากปฏิกิริยาควรเป็น cDNA ที่ความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 881 bp สำหรับการตรวจสอบ G type โดยใช้ cDNA ที่เป็นผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยชุดทดสอบ PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่แนะนำมากับชุดทดสอบ จากนั้นนำ full length cDNA มาขยายเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ G-type specific mixed primer (aBT1, aCT2, mG3 และ mG9) เป็น forward primer ที่จับจำเพาะกับ conserved region ภายใน gene ของ G1-G3 และ G9 ตามลำดับ และใช้ VP7R primers เป็น reverse primer ด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังต่อไปนี้ 0.2mM dNTPs mix, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μM forward หรือ reverse primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Thermoscientific, USA) โดยใช้ DNA template ปริมาตร 1 μl และสภาวะการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.3 ได้ผลผลิตที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์โดยประมาณคือ 618, 521, 682 และ 179 ตามลำดับ ที่น่าจะเป็น genotype ต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1 ในการทดสอบใช้ Human rotavirus A strain Wa (ATCC 2018) เป็น positive control และใช้น้ำเป็น negative control หลังจากนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ ความยาวของนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับ 100bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA)

#### 3.4 การตรวจหา P genotype ของโรตาไวรัส

การตรวจหา P genotype ของโรตาไวรัสสามารถทำได้ด้วยวิธี semi-nested multiplex RT-PCR เพื่อตรวจสอบ 4P-type ด้วย ปฏิกิริยา One step RT-PCR (SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq, USA) โดยในรอบแรกของปฏิกิริยา RT-PCR เป็นการเพิ่มจำนวน gene segment ของ VP4 gene ด้วย VP4F (con3) และ VP4R primers (ตารางที่ 3.1) ด้วยสภาวะที่แนบมากับชุดทดสอบแต่ได้มีการปรับสภาพให้เหมาะสมดังต่อไปนี้ 3.4mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 μM forward หรือ reverse primer และใช้ RNA template ปริมาตร 3 μl และสภาวะการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.2 ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่เป็น cDNA ที่ความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 876 bp สำหรับการตรวจสอบ P type นำ cDNA ที่เป็นผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยชุดทดสอบ PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่แนะนำมากับชุดทดสอบ จากนั้นนำ full length cDNA ที่เป็นผลผลิตที่ได้มาขยายเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ P-type specific mixed primer (P[4]-F, P[6]-F, P[8]-F และ P[9]-F) เป็น forward primer ที่จับจำเพาะกับ conserved region ภายใน gene ของ P[4], P[6], P[8], และ P[9] ตามลำดับ และใช้ VP4R primers เป็น reverse primer ด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังต่อไปนี้ 0.2mM dNTPs mix, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM forward หรือ reverse primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Thermoscientific, USA) โดยใช้ DNA template ปริมาตร 1 μl และสภาวะการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.3 และควรได้ผลผลิตที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์โดยประมาณคือ 413, 628, 531 และ 502 ตามลำดับที่น่าจะเป็น genotype ต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.2 จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ 100bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA) สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาใช้ Human rotavirus A strain Wa (ATCC 2018) เป็น positive control และใช้น้ำเป็น negative control

ตารางที่ 3.1: แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR และ Multiplex semi-Nested PCR

Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Product size
VP7-F	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC	nt 51-71	881*
VP7-R	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC	nt 914-932	
aBT1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	nt 314-335	618*
aCT2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	nt 411-435	521*
mG3	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G	nt 250-269	682*
mG9	CTT GAT GTG ACT <b>YA</b> AAT AC***	nt 757-776	179*
VP4-F (con3)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	nt 11-32	876**
VP4-R	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	nt 868-887	
P[4]-F	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	nt 474-494	413**
P[6]-F	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	nt 259-278	628**
P[8]-F	TCT ACT GGR TTR ACN TGC	nt 339-356	531**
P[9]-F	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	nt 385-402	502**

\*เปรียบเทียบเท่ากับ Human Rotavirus สายพันธุ์ Americas, Asia, West Africa, South Africa, Europe

\*\*เปรียบเทียบเท่ากับสายพันธุ์ Rotavirus A strain RVA/Human-wt/IND

\*\*\* Y= C or T

ตารางที่ 3.2: ตารางแสดง condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Monoplex Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Condition	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription	50 °C	30 min	
Initial denature	94 °C	2 min	
Denature	94°C	15 Sec	30 cycles
Annealing	55 °C *	30 Sec	
Extension	68 °C	1 min **	
Final Extension	68 °C	5 min	
Cool	4 °C		

\*Annealing temperature = Tm primer – 5 °C

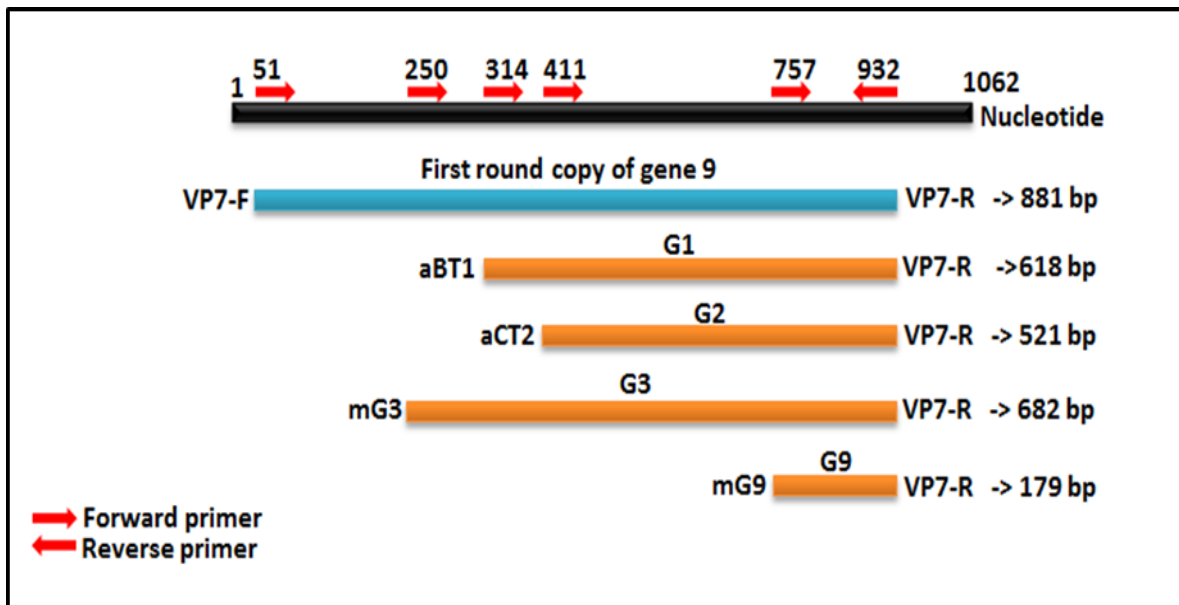
\*\* Extension time: 1 min / kb



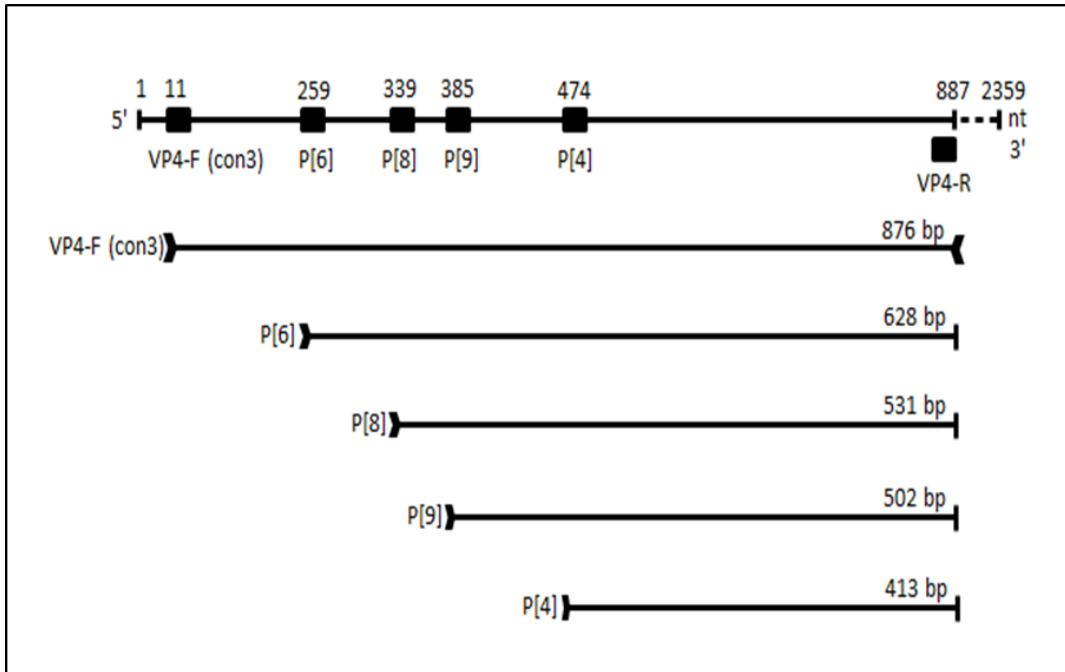
ตารางที่ 3.3: ตารางแสดง condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Multiplex Semi Nested-PCR

Condition	Temperature	Time	Cycles
Initial denature	95 °C	3 min	
Denature	95 °C	30 Sec	} 30 cycles
Annealing	55 °C	30 Sec	
Extension	72 °C	1 min *	
Final Extension	72 °C	15 min	
Cool	4 °C		

\* Extension time: 1 min / kb



รูปที่ 3.1 : รูปแสดง genotyping VP7



รูปที่ 3.2 : รูปแสดง genotyping VP4

### 3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 และ VP4 gene

Full length cDNA ที่เป็นผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR หรือ ชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์จาก Multiplex Semi Nested-PCR ที่มีขนาดที่ต้องการได้ถูกตัดออกจากเจลและนำมาทำให้สะอาดโดยใช้ PureLink™ Quick Extraction kit ก่อนนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการของบริษัท First base laboratories SDN BHD (Malaysia) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อโรตาไวรัส สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 มีการหาลำดับเบสจำนวน 2 เส้นในสองทิศทางโดยใช้ VP7-F primer และ VP7-R primer ส่วน VP4 ใช้ VP4-F (con3) และ VP4-R primers โดยนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์โดยเริ่มจากการ BLAST ในเว็บไซต์ NCBI เพื่อตรวจสอบขั้นต้นว่าข้อมูลเป็นเชื้อโรตาไวรัส นำข้อมูลที่เป็นเส้น Forward และ Reverse นำไปการแก้ไข sequence ในส่วนของลำดับเบสที่ไม่สามารถอ่านค่าได้ และทำการ assembly ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องมากขึ้น จากนั้นนำข้อมูลมาทำการ BLAST ในเว็บไซต์ NCBI เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัส โดยดูจากค่าต่อไปนี้ คือ max score คือ คะแนนการจัดตำแหน่งสูงสุดระหว่างลำดับเบสกับลำดับเบสของฐานข้อมูล, total score คือ ผลรวมของคะแนนการจัดตำแหน่งของ segments ทั้งหมดจากลำดับฐานข้อมูล, query value คือ ร้อยละของความยาวของข้อมูลที่สอดคล้องกับลำดับเบสของฐานข้อมูล, ident คือ ร้อยละของลำดับเบสที่เหมือนกับฐานข้อมูล โดยค่า cut off อยู่ที่ค่า ident ร้อยละ 80 – 100

### 3.6 การวิเคราะห์ความเป็นสายสกุลด้วย phylogenetic analysis

ลำดับนิวคลีโอไทด์จะนำมาวิเคราะห์โดยใช้ BioEdit และนำมาเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ reference strain ที่ได้มาจากการค้นหาใน NCBI GenBank database และวิเคราะห์โดยใช้ Bioedit Mega program สำหรับ multiple sequence alignment และ MEGA-4.0 software package สำหรับการสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ neighbor-joining method ค่าความเชื่อมั่น (confidence โดยใช้

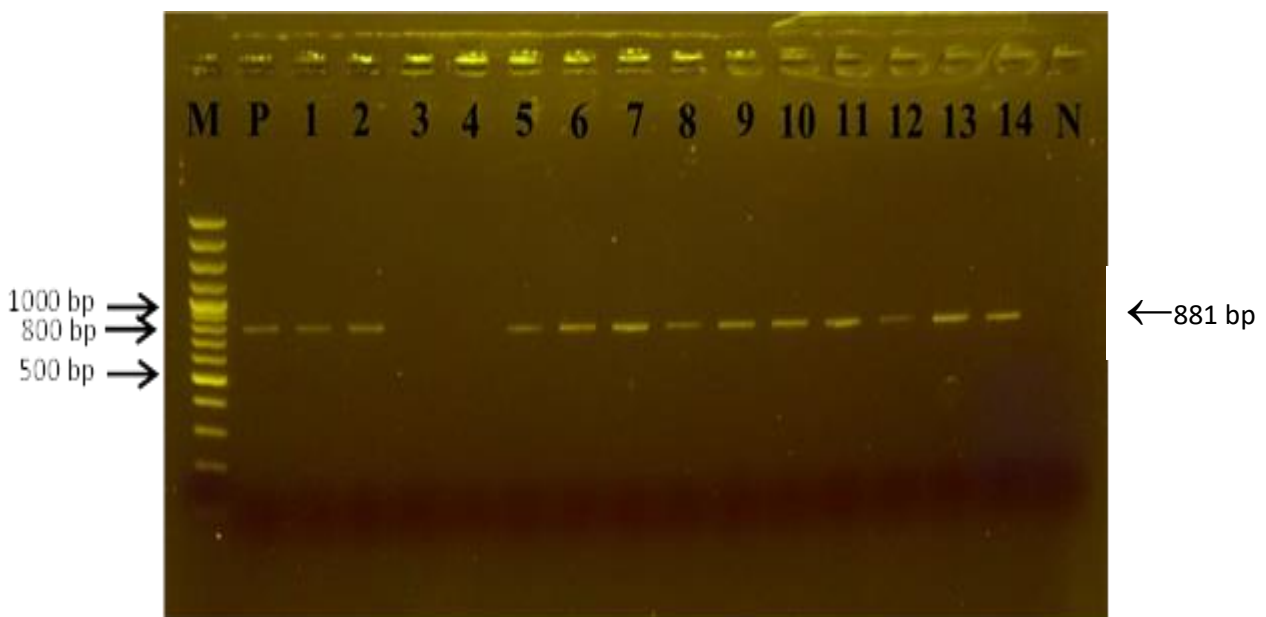
neighbor-joining method ค่าความเชื่อมั่น (confidence value) ของ internal nodes คำนวณโดยใช้  
การวิเคราะห์ bootstrap ด้วย 1000 replicates

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การตรวจสอบ genotype ของ VP7

#### 4.1.1 การขยายเพิ่มจำนวน full length cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

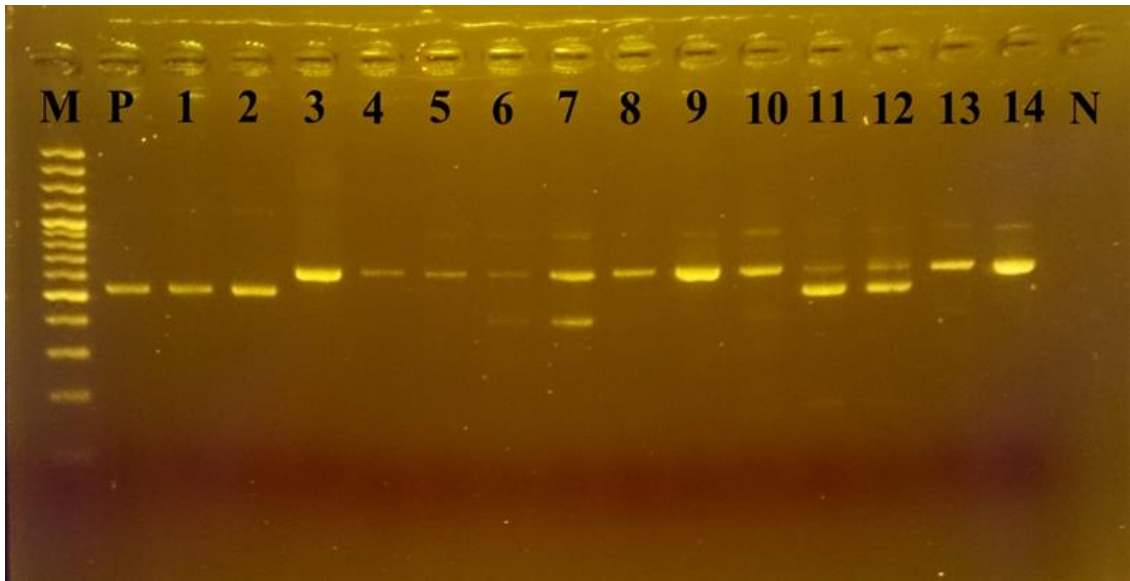
จากการการขยายเพิ่มจำนวน full length cDNA ของ VP7 gene ด้วยวิธี monoplex RT-PCR โดยใช้ VP7-F และ VP7-R primer และนำไปวิเคราะห์ด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker (Thermo Scientific, USA) ผลการทดสอบตัวอย่างจำนวน 129 ตัวอย่าง พบว่า 96 ตัวอย่างมีดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 881 bp ที่ต้องการ แต่ 33 ตัวอย่างไม่แสดงแถบ cDNA บน agarose gel ดังตัวอย่างบางส่วนได้แสดงในรูปที่ 4.1



**รูปที่ 4.1** ตัวอย่างขนาดของfull length cDNAที่ได้จากเพิ่มขยายจำนวน VP7 gene ด้วย ปฏิกิริยา monoplex RT-PCR ในตัวอย่างที่ 1 – 14 โดย M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker, P คือ Positive control, N คือ Negative control และ 1-14 คือหมายเลขของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

#### 4.1.2 การตรวจสอบ VP7 genotype ด้วย multiplex semi-nested PCR

จากการตรวจสอบ G-genotype ของเชื้อไวรัสโรตาโดยวิธี Multiplex Semi Nested-PCR ซึ่งใช้ Forward primer 4 สาย (aBT1, aCT2, mG3, mG9) และ Reverse primer 1 สาย (VP7-R) และนำไปวิเคราะห์ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker (Thermo Scientific, USA) จากผลการทดสอบตัวอย่างที่แสดงในรูป 4.2 มีนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดประมาณ 618, 521, 682 และ 179 ตามลำดับ ที่น่าจะเป็น genotype G1, G2, G3 และ G9 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ 3 และ 4 ที่ไม่พบแถบ cDNA (ในรูป 4.1) เมื่อนำมาขยายเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา nested PCR กลับพบแถบ DNA ที่ขนาดประมาณ 618 bp ที่คาดว่า เป็น G1 genotype



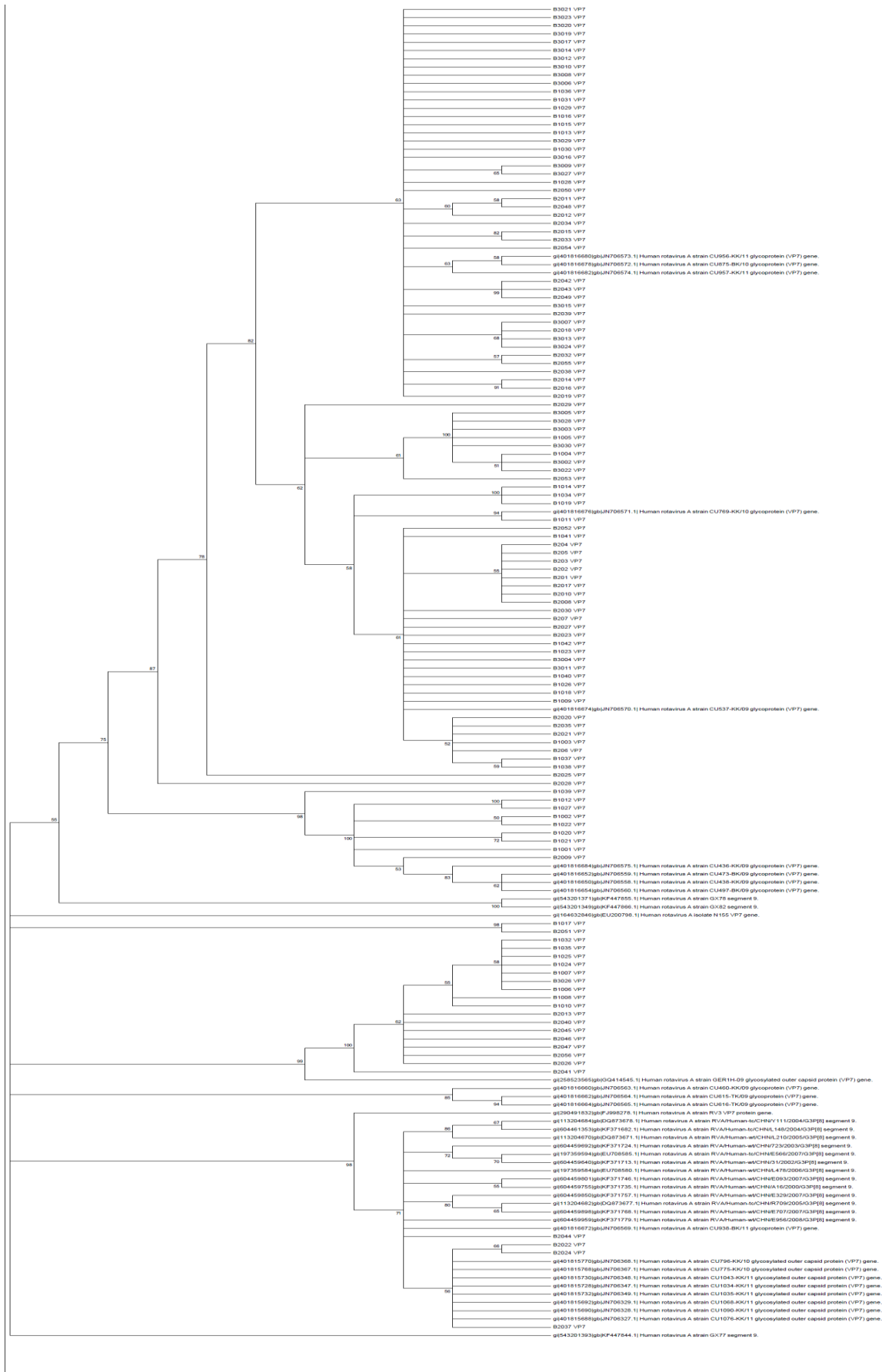
**รูปที่ 4.2** แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการแยก G-genotype โดยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR โดย M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker, P คือ Positive control, N คือ Negative control และ 1-14 คือหมายเลขของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

#### 4.1.3 การทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP7 gene

จากการนำ Purified cDNA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR หรือ Multiplex Semi-Nested PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากนั้นพิจารณาผลจากเปอร์เซ็นต์ Identical ซึ่งแสดงถึงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยยอมรับผลเมื่อมีเปอร์เซ็นต์ Identical สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทุกตัวอย่างที่ศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับไวรัสโรคตากลุ่มเอ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 128 ตัวอย่างสามารถแยก G-genotype ได้เป็น G1, G2, G3, G8 และ G9 ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4.1 และให้ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายสกุลของ G genotype ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.1 : แสดงผลการแยก G-genotype โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST ของตัวอย่างทั้งหมด 128 ตัวอย่าง

จำนวน/ร้อยละ	G-genotype					
	G1	G2	G3	G8	G9	negative
การวิเคราะห์ผลด้วยวิธี nested PCR	104	13	6	0	4	1
การวิเคราะห์ผลด้วยวิธี DNA sequencing	93	9	5	18	2	1
คิดเป็นร้อยละ	72.66	7.03	3.91	14.06	1.56	0.78

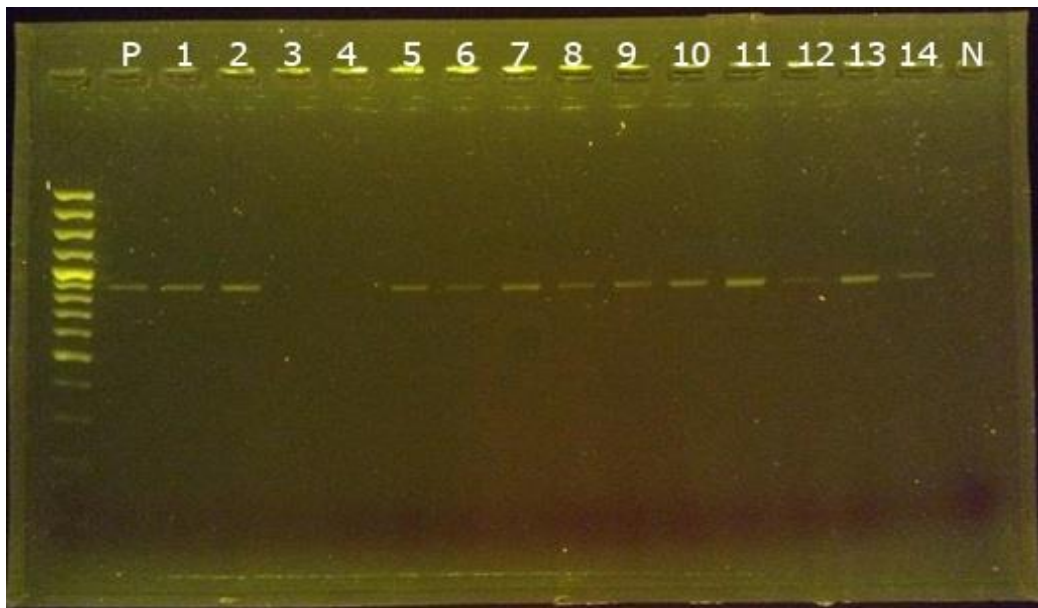


รูปที่ 4.3 รูปแสดง phylogenetic tree ของ VP7 gene

## 4.2 การตรวจสอบ genotype ของ VP4

### 4.2.1 การขยายเพิ่มจำนวน full length cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย VP4-F (con3) และ VP4-R โดยมี purified RNA ที่สกัดมาจาก virion ของ Human rotavirus A strain Wa (ATCC 2018) เป็น positive control และมีน้ำแทนที่ RNA template เป็น Negative control และวิเคราะห์ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากการทดสอบทั้งหมด 128 ตัวอย่างพบว่ามตัวอย่างจำนวน 91 ตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR เป็น full length VP4 ที่มี amplicon size ประมาณ 876 bp ตามที่คาด เมื่อเทียบกับ GeneRuler 100 bp Plus (Thermo scientific, USA และมี 37 ตัวอย่างไม่พบแถบ cDNA โดยตัวอย่างบางส่วนได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.4

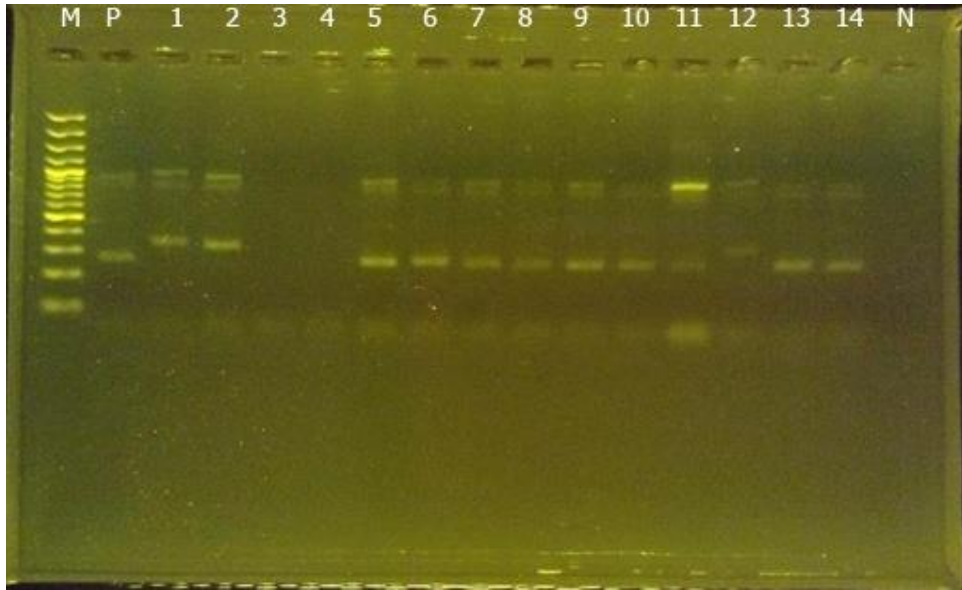


**รูปที่ 4.4** ตัวอย่างขนาดของ full length cDNA ที่ได้จากการเพิ่มขยายจำนวน VP4 gene ด้วย ปฏิกิริยา monoplex RT-PCR แสดงตัวอย่างที่ 1 – 14 โดย M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker, P คือ Positive control, N คือ Negative control และ 1-14 คือหมายเลขของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

### 4.2.2 การตรวจสอบ VP4 genotype ด้วย multiplex semi-nested PCR

แถบ cDNA ที่ได้ทั้งหมดได้ถูกนำไปตรวจสอบหา genotype ของ VP4 ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี Multiplex semi-Nested PCR ผลที่ได้คือ พบแถบ DNA ที่ขนาดประมาณ 330 bp และพบแถบ DNA ที่ขนาดประมาณ 280 bp ซึ่งแตกต่างจากขนาดของนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีการประมาณการไว้เมื่อเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ Rotavirus A strain RVA/Human-wt/IND ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง นอกจากนี้ยังพบแถบ DNA ที่ไม่จำเพาะอีกหลายแถบด้วย (รูปที่ 4-5)



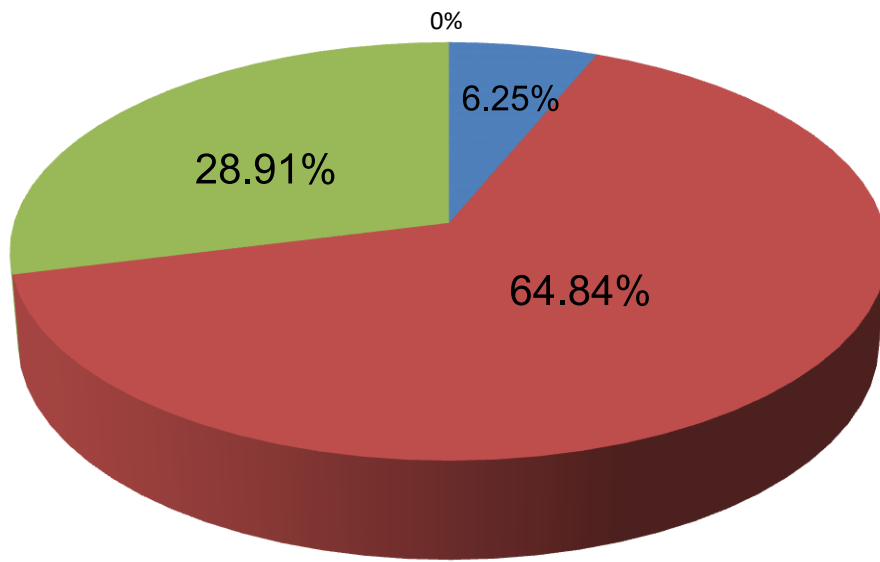


**รูปที่ 4.5** รูปแสดงตัวอย่างขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการแยก P-genotype โดยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR ในตัวอย่างที่ 1–14 โดยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR โดย M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker, P คือ Positive control, N คือ Negative control และ 1-14 คือหมายเลขของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

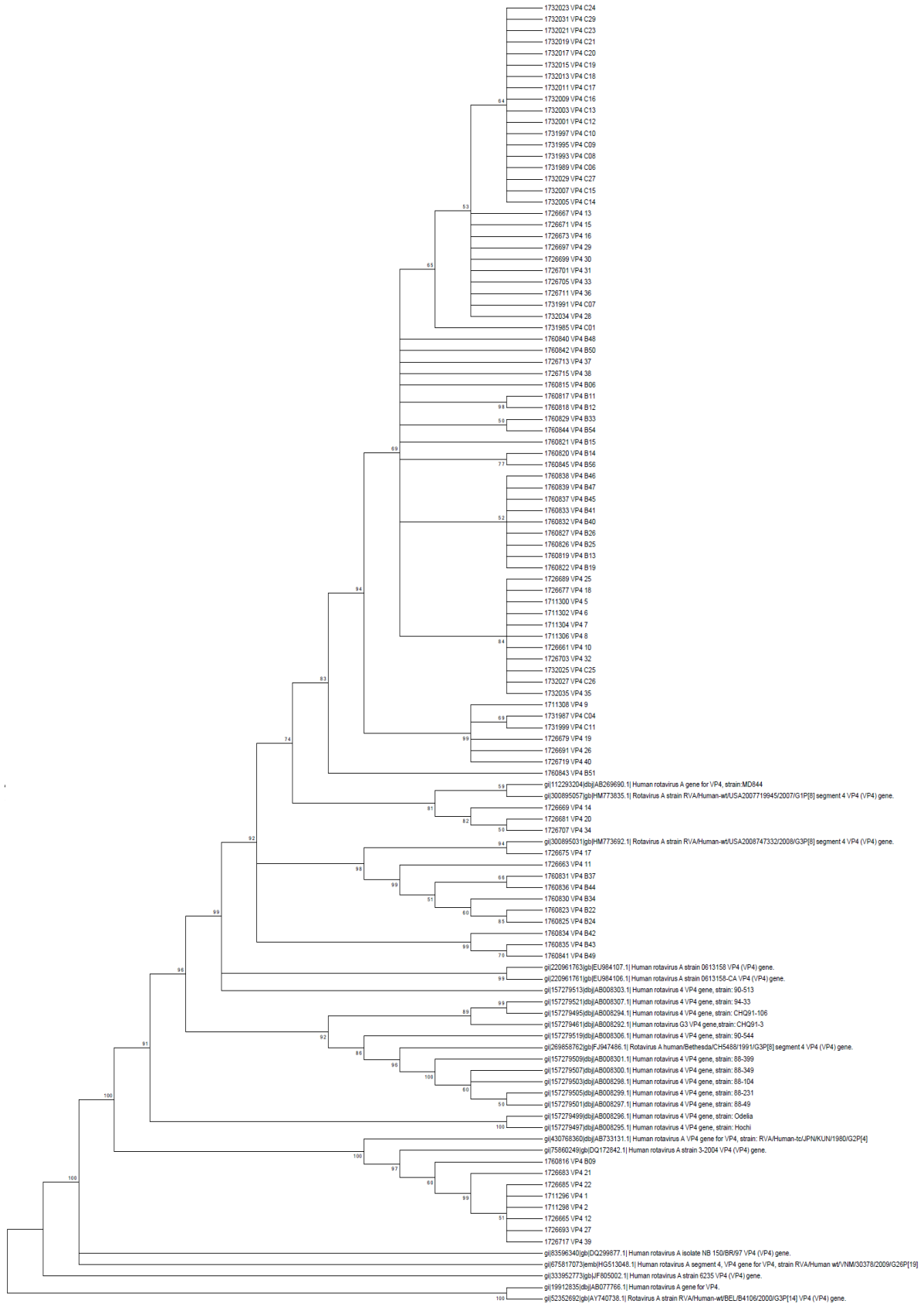
#### 4.2.3 การทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VP4 gene

เนื่องจากปฏิกิริยา multiplex nested PCR ได้ผลผลิตที่ไม่สามารถแปลผล genotype VP4 ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังนั้น full length VP4 จากปฏิกิริยา RT-PCR ได้ถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง จากข้อมูลที่ได้นำมาอ่านค่าในโปรแกรม Sequence Scanner พบว่าการเข้าคู่กับของลำดับนิวคลีโอไทด์มีประสิทธิภาพที่ดี และเมื่อนำข้อมูลของตัวอย่างที่ทำการ assembly ด้วยโปรแกรม BioEdit มาทำการ BLAST ในเว็บไซต์ NCBI เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อโรตาไวรัสพบว่าจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 128 ตัวอย่างมี P[8] ที่พบเป็นสายพันธุ์ Hu/RUS/O1223 จำนวน 64.84 % และ P[4] ที่พบเป็นสายพันธุ์ RVA/Human-wt/AUS/CK20034 จำนวน 6.25% และไม่พบ genotype P[6] และ P[9] เลย ดังสรุปไว้ในรูปที่ 4.6 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายสกุลของ subtype P ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.7

■ P[4] ■ P[8] ■ ไม่พบ



รูปที่ 4.6 แผนผังแสดงสรุปร้อยละของ subtype P4 ที่ตรวจพบ



รูปที่ 4.7 รูปแสดง phylogenetic tree ของ VP4 gene

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาจากตัวอย่างจำนวน 128 ตัวอย่างในส่วนของ VP7 ด้วยวิธี RT-PCR และวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis จากผลการทดลองสามารถตรวจพบ full length VP7 ขนาด 881 bp ซึ่งเป็นแถบ DNA เป้าหมาย จำนวน 96 ตัวอย่าง และในทำนองเดียวกันกับการตรวจสอบ full length VP4 ที่พบแถบ DNA เป้าหมายเพียง 91 ตัวอย่าง เท่านั้น การพบ false negative จากปฏิกิริยา RT-PCR อาจเป็นผลมาจากการสกัด RNA ออกมาจากอุจจาระ โดยบางตัวอย่างอาจสกัดได้ความเข้มข้นของ RNA น้อยทำให้การขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR มีระดับต่ำเกินกว่าความไวของ สีที่ใช้ย้อม DNA เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ทั้งที่ปรากฏและไม่ปรากฏแถบ DNA เป้าหมายมาทำการสกัดให้บริสุทธิ์แล้วนำไปทำการศึกษาคู่ด้วยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR และวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % agarose gel electrophoresis ได้ผลผลิตที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์โดยประมาณคือ 618, 521, 682 และ 179 ตามลำดับที่คาดว่าเป็น genotype G1 จำนวน 104, G2 จำนวน 13, G3 จำนวน 6, และ G9 จำนวน 4 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเมื่อนำแถบ DNA ที่ได้จาก full length หรือ nested PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานกลับพบว่าชนิดของ G genotype ที่พบมีความแตกต่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยพบว่า G1-G3 และ G9 มีจำนวน 93, 9, 5 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับซึ่งมีค่าต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และพบ G8 จำนวน 18 ตัวอย่างมาแทนซึ่งการตรวจพบ G1-G3 และ G8-G9 คิดเป็นร้อยละ 72.66, 7.03, 3.91, 14.06 และ 1.56 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis มีข้อจำกัดในการแยกขนาดของ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกันออกจากกัน และหากกระแสไฟฟ้าที่ใช้ไม่สม่ำเสมออาจให้แถบ DNA ที่มีขนาดที่ไม่เที่ยงตรงได้ นอกจากนี้การใช้วิธี Multiplex Semi-Nested PCR มีการใช้ primer ในปฏิกิริยาถึง 4 คู่ทำให้เกิดการรบกวนกันระหว่าง primer เกิดการจับกันเองของ primer ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลงและอาจเกิด non-specific band ได้ ดังที่พบในการตรวจสอบ P genotype ที่ไม่สามารถแปลผลได้และยังให้ขนาดแถบของ DNA ต่างไปจากที่คาดไว้ แต่เมื่อนำไป full length cDNA ไปตรวจสอบหา P genotype ด้วยวิธี DNA sequencing และนำข้อมูลจากการ sequencing ทำการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างในเว็บไซต์ NCBI พบว่า แถบความยาวที่ประมาณ 330 bp และแถบความยาวที่ประมาณ 280 bp เป็น genotype P[4] สายพันธุ์ RVA/Human-wt/AUS/CK20034 และ P[8] เป็นสายพันธุ์ Hu/RUS/O1223 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก primer เหล่านี้จับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมต่างตำแหน่งกันระหว่างสายพันธุ์ที่พบในตัวอย่างกับสายพันธุ์ Rotavirus A strain RVA/Human-wt/IND ตามที่อ้างอิง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Multiplex Semi-Nested PCR มีขนาดสั้นกว่าที่ประมาณไว้ สำหรับการทดสอบและจากการตรวจสอบสายพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เป็น genotype P[8] ร้อยละ 64.85 และ P[4] ร้อยละ 6.25 และเป็น genotype อื่น นอกเหนือจาก genotype P[6] และ P[9] ที่ทดสอบในครั้งนี้อย่างน้อยร้อยละ 28.96 จากการทดสอบจะพบว่าแม้การตรวจแยก genotype ด้วยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR ยังให้ผลที่ไม่ถูกต้องเท่าที่ควร จำเป็นต้องส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบผลอีกครั้ง แต่สามารถใช้ทดสอบ genotype ในเบื้องต้นได้

จากผลการจำแนก genotype ของเชื้อไวรัสโรตาในการศึกษานี้ พบ genotype G1 มากที่สุดโดยพบคิดเป็นร้อยละ 72.66 ตามมาด้วย G8 ร้อยละ 14.06, G2 ร้อยละ 7.03, G3 ร้อยละ 3.91 และ G9 คิดเป็น

ร้อยละ 1.56 การที่พบ genotype G1 มากที่สุดจากการศึกษาครั้งนี้ให้สอดคล้องกับผลการศึกษาในประเทศอื่นๆทั่วโลก (WHO, 2008-2014) และเมื่อศึกษารายงานการพบไวรัสโรตา genotype G1 ในรอบ 10 กว่าปีที่ผ่านมาของประเทศไทย (Noppornpanth, 2001; Theamboonlers, 2008; Khamrin, 2009b; Khananusak, 2010; Khamrin, 2007; Maiklang; 2012) พบว่า genotype G1 มีสถิติการระบาดที่เปลี่ยนแปลงไปตามแต่ละช่วงเวลา โดยในปี ค.ศ. 1998 - 1999 มีการระบาดของ genotype G1 ในอัตราสูงที่สุดโดยพบการระบาดสูงถึงร้อยละ 83.3 ในเวลาต่อมาการระบาดของ genotype G1 ลดลงอย่างมาก และกลับมามีอัตราการระบาดสูงอีกครั้งในช่วง ปี ค.ศ. 2004 - 2006 และมีการระบาดอย่างต่อเนื่องมาจนถึง ค.ศ. 2011 ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการระบาดลดลงบ้างก็ตาม

G2 จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีการระบาดอยู่ในระดับปานกลาง และมักมีอัตราการระบาดเพิ่มขึ้นหรือลดลงสลับกับ genotype อื่นๆ โดยพบว่าในช่วงปี ค.ศ. 2003 มีอัตราการระบาดที่สูงคิดเป็นร้อยละ 42.4 และอัตราการระบาดก็ลดลงมาอยู่ในระดับปานกลางจนถึงระดับต่ำในปีต่อ ๆ มา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการระบาดของ genotype G2 อยู่ในระดับปานกลางเช่นเดียวกัน

G3 ถึงแม้ว่าจะเป็นสายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่พบบ่อยทั่วโลก แต่อัตราการระบาดก็ไม่สูงเท่ากับ G1 และ G2 โดยพบว่าในประเทศไทยมีการระบาดของสายพันธุ์ G3 อยู่บ้างในความชุกต่ำๆ โดยจากข้อมูลที่ศึกษา ระหว่างปี ค.ศ. 1998 - ค.ศ. 2011 พบการระบาดของ G3 ในปี ค.ศ. 2002, ค.ศ. 2004 - ค.ศ. 2006, ค.ศ. 2007 - ค.ศ. 2009 อยู่ที่ร้อยละ 0.2, 1.6 และ 0.6 ตามลำดับ โดยพบความชุกสูงถึงร้อยละ 60.4 ในปี ค.ศ. 2009 - ค.ศ. 2011 ซึ่งการระบาดในความชุกที่สูงๆเช่นนี้ไม่พบบ่อยนัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ที่ไม่พบ G3 จึงแสดงให้เห็นว่าการระบาดของ G3 ในประเทศไทยยังมีแนวโน้มที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก

G9 เป็นสายพันธุ์ที่เพิ่งพบการระบาดได้ไม่นาน แต่ปัจจุบันได้ถูกจัดอยู่หนึ่งในห้าของสายพันธุ์ที่พบการระบาดทั่วไป (common stain: G1, G2, G3, G4 และ G9) สำหรับประเทศไทยส่วนใหญ่ genotype G9 มีอัตราการระบาดต่ำถึงปานกลาง ยกเว้นบางช่วงเวลาที่พบมีอัตราการระบาดสูงมาก เช่นในปี ค.ศ. 2001 - 2002 ซึ่งพบว่าเป็น genotype ที่มีการระบาดสูงสุด จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการระบาดของ genotype G9 อยู่ในอัตราที่ต่ำซึ่งเป็นผลสอดคล้องกับภาพรวมของการระบาดที่พบในประเทศไทย

G8 ไม่ใช่สายพันธุ์ที่ระบาดตามปกติในทุกประเทศทั่วโลก (uncommon stain) รวมถึงประเทศไทยเอง โดยมีการศึกษาพบ Human rotavirus G8 ครั้งแรกที่ประเทศอินโดนีเซีย ในปี ค.ศ. 1985 (Matsuno, 1985) และต่อมาก็มีการพบการระบาดในหลายๆประเทศ แต่มีอัตราการระบาดในระดับต่ำ และพบบ่อย แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบไวรัสโรตา G8 ถึงร้อยละ 14.06 ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก เพราะถ้า G8 มีอัตราการระบาดที่เพิ่มสูงขึ้นหมายถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่มีอยู่ในปัจจุบันก็จะต่ำลง เนื่องจากวัคซีนที่มีใช้ในปัจจุบันทั้ง Rotarix™ และ RotaTeq™ ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกัน Human rotavirus G8

สำหรับประเทศไทยการระบาดของ VP4 หรือ P-genotype ซึ่ง genotype ของเชื้อโรตาไวรัสที่พบบ่อย ได้แก่ P[8] ร้อยละ 78.5, P[4] ร้อยละ 20.3, P[6] ร้อยละ 0.6 และ P[9] ร้อยละ 0.6 (Kapikian, 2001) จากการทดลองการตรวจสอบ P genotype พบว่าเป็น P[8] ถึงร้อยละ 64.85 และ P[4] ร้อยละ 6.25 และไม่พบ P[6] และ [9] ซึ่งให้ผลสอดคล้องเฉพาะ P[8] ที่ยังคงมีการระบาดในอัตราสูงอยู่ อย่างไรก็ตามการระบาดของเชื้อไวรัสแบบ G/P combinations จากการศึกษาในครั้งนี้พบ G1P[8] จำนวน 58, G2P[4] จำนวน 8, G2P[8] จำนวน 1, G3P[8] จำนวน 4, G8P[8] จำนวน 18 และ G9P[8] จำนวน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 91 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งหมด 128 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับ G/P combinations ที่พบทั่วโลกคือ G1P[8], G2P[4], G3P[8] และ G9P[8] อย่างไรก็ตาม Rotarix ที่เป็น monovalent G1P[8] human attenuated

vaccine ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันครอบครัว genotype G1P[8] ได้เท่านั้นและ RotaTeg ที่เป็น pentavalent human bovine reassorted vaccine ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ G1P[4], G2P[4], G3P[4], G4P[4] และ G6P[8] ซึ่งได้รับอนุญาตให้ใช้ได้หลายประเทศ (Santosham et al., 2007) สามารถใช้ครอบครัวได้เฉพาะ G1P[8] และ G2P[4], เท่านั้นแต่ไม่ครอบคลุม G2[8], G3P[8], G8P[8] และ G9P[8] ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความชุกของกสารแพร่ระบาดของเชื้อจึงมีประโยชน์มาก ทั้งนี้เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อโรตาไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้ง่ายจึงควรมีการติดตามและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดในแต่ละช่วงเวลาและแต่ละพื้นที่อย่างใกล้ชิดต่อไป ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อไวรัสโรตา

### สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาความชุกของ Human rotavirus จากตัวอย่างอุจจาระของเด็กที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการท้องร่วงรุนแรงที่สถาบันบำราศนราดูร จำนวนทั้งหมด 128 ตัวอย่าง พบ G1 ร้อยละ 72.66, G2 ร้อยละ 7.03, G3 ร้อยละ 3.91, G8 ร้อยละ 14.06 และ G9 ร้อยละ 1.56 ส่วน P[8] พบร้อยละ 64.85 และ P[4] ร้อยละ 6.25 และไม่พบ P[6] และ [9] และ G/P combination พบ G1P[8] จำนวน 58 , G2P[4] จำนวน 8, G2P[8] จำนวน 1, G3P[8] จำนวน 4, G8P[8] จำนวน 18 และ G9P[8] 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 91 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 128 ตัวอย่าง

### ปัญหาและอุปสรรค

จำนวนตัวอย่างที่ทำมีจำนวนมาก บางช่วงเวลามีจำนวนตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรตาไวรัสน้อย ต้องรอให้มีมากพอจึงไปปรับตัวอย่างมาทำการทดลองต่อไปได้

## บรรณานุกรม

1. Armah, G.E., Sow, S.O., Breiman, R.F., Dallas, M.J., Tapia, M.D., Feikin, D.R., et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010; 376:606-614
2. Bridger, J.C. 1994. Non-group A rotaviruses. In: Kapikian, A.Z. (Ed.) *Viral infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, New York, pp. 369-407.
3. Central for Disease control Prevention (CDC). Rotavirus surveillance worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rewp.* 2008; 57: 1255-1257.
4. Chaimongkol, N., Khamrin, P., Malasao, R., Thongprachum, A., Ushijima, H., Maneekarn, N. Genotype linkages of gene segments of rotaviruses circulating in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infection, Genetics and evolution* 2012; 12: 1381-1391.
5. De Grazia, S., Ramirez, S., Giammanco, G.M., Colomba, C., Martella, V., LoBiundo, C., Mazzola, R., Arista, S. Diversity of human rotaviruses detected in Sicily, Italy, over a 5-year period (2001-2005). *Arch. Virol.* 2007; 152:833-837.
6. Esters, M.K. and Kapikian, A.Z. Rotavirus. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. (Eds). *Virology*, 4<sup>th</sup> ed. 2001. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1787-1833.
7. Feikin, D.R., Laserson, K.F., Ojwando, J., Nyambane, G., Ssempijjia, V., Audi, A., Nyakundi, D., Oyieko, J., Dallas, M., Ciarlet, M., Neuzil, K.M., and Breiman, R.F. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine in a high HIV prevalent population in Kenya. *Vaccine* 2012; 30S: A52-A60.
8. Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Das, B.K., Bhan, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 1365-1373.
9. Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 276-282.
10. Hashino, Y., Jones, R.W., Ross, J., Honma, S., Santos, N., Gentsch, J.R., Kapikian, A.Z. Rotavirus serotype g9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype g9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J. Virol* 2004; 78: 7795-7802.
11. Intusoma, U., Sornsrivichai, V., Jiraphongsa, C., Varavithaya, W. Epidemiology, clinical presentation and burden of rotavirus diarrhea in children under five seen at Ramahibodi Hospital, Thailand. *Med. Assoc. Thai.* 2008; 91: 1350-1355.
12. Jiraphongsa, C., Bresee, J.S., Pongsuwanna, Y., Kluabwang, P., Poonawagul, U., Arpornitip, P., Kanoksil, M., Premisri, N., Intusoma, U. Rotavirus surveillance project

- Thailand study group. Epidemiology and burden of rotavirus diarrhea in Thailand: Results of sentinel surveillance. *J. Inf. Dis.* 2005; 192: (Suppl. 1) S87-93.
13. Kapikian A. Z., Hoshino Y., & Chanock R. M. (2001). in Knipe D M. et al. Rotaviruses. Fields Virology. Lippincott Williams and Wilking. 1747-1833.
  14. Khamrin, P., Peerakome, S., Wonsawasdi, L., Tonusin, S., Somchai, P., Maneerat, v., Khamwan, C., Yagy, F., Okitsu, S., Ushijima, H., Maneekarn, N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiangmai, Thailand. *J. med. Virol.* 2006; 78: 273-280.
  15. Khamrin, P., Peerakome, S., Tonusin, S., Malasao, R., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H., Maneekarn, N. Changing pattern of rotavirus G genotype reemergence of G1 and G2. *J. Inf. Dis.* 2007; 79: 843-851.
  16. Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakorn, S., Malasao, R., Thongprachum, A., Chan-It, W., Mizuguchi, M., Okisu, S., Ushijima, H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5/6 genes identities an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J. med. Virol.* 2009; 81: 176-182.
  17. Khamrin, P., Thongprachum, A., Chaimongkol, N., et al. "Evolutionary consequences of G9 rotaviruses circulating in Thailand." *Infect Genet Evol* 2009; 9(6): 1394-1399.
  18. Khamrin, P., Maneekarn, N., Malasoa, R., Nguyen, T.A., Ishida, S., Okisu, S., Ushijima, H. Genotype linkages of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect. Genet. Evol.*; 2010: 10: 467-472
  19. Khananusak, K., Vutithanachot, V., Simakachorn, N., Theamboonlers, A., Chongsrisawat, V., Poovorawan, Y. Prevalence and phylogenetic analysis of rotavirus genotypes in Thailand between 2007 and 2009. *Infection, Genetics and evolution* 2010; 10: 537-545.
  20. Lees, D. Viruses and bivalve shellfish. *Inter. J. Food Microbiol.* 2000; 81-116.
  21. Madhi, S.A., Cunliffe, N.A., Steele, D., Witte, D., Kirsten, M., Louw, C, et al., Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362: 289-298.
  22. Maiklang, O., Vutithanachot, V., Vutithanachot, C., et al. "Prevalence of group A genotype human rotavirus among children with diarrhea in Thailand, 2009-2011." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012; 43(4): 904-916.
  23. Maneekarn, N. and Ushijima, H. Epidemiology of rotavirus infection in Thailand. *Pediatr. Int.* 2000; 42: 415-421.
  24. Matsuno, S., Hasegawa, A., Mukoyama, A., et al. "A candidate for a new serotype of human rotavirus." *J Virol* 1985; 54(2): 623-624.



25. Matthijnssens, J., Rahman, M., Ciarlet., M., Van Ranst. Emerging human rotavirus genotype. In: Palombo, E.A., Kirkwood, C.D. (Eds). *Viruses in the environment. Research Signpost. Trivadrum*, 2008. pp. 171-219.
26. Matthijnssens, J., Bilcke, J., Ciarlet., M., Martella, V., Banyai, K., Rahman, M., Zellar, M., Beutels, P., Van, Damme, P., Van Ranst, M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4: 1303-1316.
27. Matthijnssens, J., Ciarlet., M., McDonald, S.M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona., M.D., Ester, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi., O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri., F.M., Saif, I.J. Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T. Desselberger, U., Van Ranst, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus classification working group (RCWG). *Arch. Virol.* 2011; 156: 1397-1413.
28. Montenegro, F.M., Correia, J.B., Rodrigues, F.A., Dove, W., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Cuevas, L.E. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: Detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotype G8 and G9 among children with diarrhea in Recife, Brazil. *J. Med. Virol.* 2007; 79: 335-340.
29. Nelson, E.A., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Widdowson, M.A., Glass, R.I. Rotavirus epidemiology: the asian rotavirus surveillance network. *Vaccine* 2008; 26: 3192-3196.
30. Noppornpanth, S., Theamboonlers, A. & Poovorawan, Y. "Predominant human rotavirus genotype G1P[8] infection in infants and children in Bangkok, Thailand." *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19(1): 49-53.
31. O’Ryan, M. The ever-changing landscapes of rotavirus serotypes. *Pediatric. Infect. Dis. J.* 2009; 28: S60-S62.
32. Patel, M.M., de Oliveira, L.H., Bispo, A.M., Gentsch, ., Parasha, U.D. Rotavirus genotype P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 863-865.
33. Pongsuwanna, Y., Guntapong, R., Chaiwakul, M., Tacharoenmuang, R., Onvimala, N., Wakuda, M., Kobayashi, N., Tanigichi, K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 1390-1394.
34. Pongsuwanna, Y., Guntapong, R., Tacharoenmuang, R., Praonpoj, M., Kameoka, M., Taniguchi, K. A long-term survey on the distribution of the human rotavirus G type in Thailand. *J. Med. Virol.* 2010; 82: 157-163.
35. Rahman, M., Matthijnssens, J., Yang, X., Delbeke, T., Arjis, I., Taniguchi, K., Iturriza-Gomara, M., Iftekharauddin, N., Azim, T., Van Ranst, M. Evolution history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.* 2007; 81: 2382-2390.
36. Reidy, N., O’Halloran, F., Fanning, S., Cryan, B., O’Shea, H. Emergence of c3 and G9 rotavirus and increased incidence of mixed infections in the Southern region of Ireland 2001-2004. *J. Med. Virol.* 2005; 77:571-578.

37. Ruiz-Palacios, G.M., Perez-Schael, I., Velazquez, F.R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S.C., Cheuvart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B.L., Cervantes, Y., Linhares, A.C., Lopez, P., Macias-Parra, M., Ortega-Barria, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D.M., Rivera, L., Salinas, B., Pavia-Rutz, N., Salmeron, J., Ruttimann, R., Tinoco, J.C., Rubio, P., Nunez, E., Guerero, M.L., Yarzabal, J.R., Damaso, S., Tornieporth, N., Saez-Llorens, X., Vergara, R.F., Vesikari, T., Bouckennooghe, A., Clemans, R., De Vos, B., O Ryan, M. Safety and efficiency of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Eng. J. Med.* 2006; 354: 11-22.
38. Santosham, M., Nelson, E.A., Bresee, J.S. Implementing rotavirus vaccination in Asia. *Vaccine* 2007; 25: 7711-7716.
39. Sungkapalee, T., Puntukosit, P., Eunsuwan, O., Theamboonlers, A., Chongsrisawat, V., Poovorawan, Y. Incidence and clinical manifestations of rotavirus infection among children with acute diarrhea admitted at BuriRham Hospital, Thailand. *South East Asian J. Trop. Med. Public Health* 2006; 37: 1125-1131.
40. Tamura, K., Dudley, N., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24: 1596-1599.
41. Taniguchi, K., Urasawa, T., Kobayashi, N., Gorziglia, M., Urasawa, S. Nucleotide sequence of the VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: Implication of new G serotype specificity. *J. Virol.* 1990; 64: 5640-5644.
42. Thai Drug Control Division, 2008 . Rotavirus vaccine. [http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone\\_search/sea006x.asp](http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_search/sea006x.asp).
43. Theamboonlers, A., Bhattarakosol, P., Chongsrisawat, V., Sungkapalee, T., Wutthirattanakowit, N., Poovorawan, Y. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8], and a rare G3P[19] strain. *Virus gene* 2008; 36: 289-298.
44. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T. CLUSTAL W: Improving the sensitivity by progressive multiple sequence alignment through weighing, positive specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 1994; 22: 4673-4680.
45. Trinh, Q.D., Nguyen, T.A., Phan, T.G., Khamrin, P., Yan, H., Hoang, P.L., Maneekarn, N., Li, Y., Yagya, F., Okitsu, S., Ushijima, H. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-type. *J. Med. Virol.* 2007 a; 79: 1009-1016.
46. Trinh, Q.D., Phan, T.G., Nguyen, T.A., Khamrin, P., Yan, H., Hoang, P.L., Maneekarn, N., Li, Y., Kozlov, V., Kozlov, A., Okitsu, S., Ushijima, H. Amino acid substitution in the VP7 protein of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam during 2001-2004. *J. Med. Virol* 2007b; 79: 1611-1616.

47. Trinh, Q.D., Pham, N.T.K., Nguyen, T.A., Phan, T.G, Yan, H., Hoang, L.P., Khamrin, P., Hoang, P.L., Maneekarn, N., Li, Y., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G2 and G4 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam during 2001-2003. *J.Med. Virol* 2010; 82: 878-885.
48. Urasawa, T., Urasawa, S., Wakasugi, F., Kobayashi, N., Taniguchi, K., Lintag, I.C., Saniel, M.C., Gato, H. Presumptive seventh serotype of human rotavirus. *Arch. Virol.* 1990; 113: 279-282.
49. Wakuda, M., Nagashiman, S., Kobayashi., N., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K. Serologic and genome characterization of a G-12 human rotavirus in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5764-5769.
50. Ward, R.L., and Bernstein, D.I. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 222-228.
51. World Health Organization (WHO). Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2004, 527000 In [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/burden/rotavirus\\_estimates/index.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/rotavirus_estimates/index.html)
52. World Health Organization (WHO). Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2008-2014[Online]. แหล่งเข้าถึง [http://www.who.int/immunization\\_monitoring\\_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/](http://www.who.int/immunization_monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/) สืบค้นเมื่อ [01/11/2557]