

การศึกษาการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย

ช่วงปี ค.ศ. 2009-2014



นางสาวทิมพร พุ่มผลทรัพย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF RECOMBINANT HUMAN NOROVIRUS IN THAILAND ISOLATED BETWEEN  
2009-2014



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของฮีแมโนโรไวรัสในประเทศไทย ช่วงปี ค.ศ. 2009-2014
โดย	นางสาวชัชฌิมพร พุ่มผลทรัพย์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารษาเวก)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร)  
.....กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

ทิชัมพร พุ่มผลทรัพย์ : การศึกษาการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย ช่วงปี ค.ศ. 2009-2014 (DETECTION OF RECOMBINANT HUMAN NOROVIRUS IN THAILAND ISOLATED BETWEEN 2009-2014) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงกร, 84 หน้า.

เชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสเป็นไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารทั่วโลก โดยการเกิด recombination ของเชื้อไวรัสนั้นเป็นประโยชน์ต่อการหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน และยังเป็นกลไกสำคัญต่อวิวัฒนาการของไวรัสเพื่อให้ได้เชื้อไวรัสในสายพันธุ์ใหม่อีกด้วย แต่ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับการเกิด recombination ในประเทศไทยนั้นยังพบบ่อยน้อย ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการตรวจสอบและจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่มีการเกิด recombination ตั้งแต่ ค.ศ. 2009-2014 ในประเทศไทย จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสทั้งหมด 150 ตัวอย่าง พบว่า จำนวน 104 ตัวอย่างที่สามารถทำการระบุจีโนไทป์จากการเพิ่มจำนวนยีน VP1 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยพบว่า มีทั้งสิ้น 12 จีโนไทป์ คือ GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.12, GII.13, GII.14, GII.17 และ GII.21 โดยที่สายพันธุ์ GII.4 เป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดมากที่สุด (67/104, 64.4 %) การวิเคราะห์ข้อมูลจาก Phylogenetic และ Simplot พบการเกิด recombination จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คือ สายพันธุ์ GII.21/GII.3 จำนวน 3 ตัวอย่าง, GII.12/GII.3 จำนวน 2 ตัวอย่าง และ GII.12/GII.1 จำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อทำการยืนยันว่าตัวอย่างที่พบเป็น recombination ที่แท้จริง ด้วยการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ Maximum  $x^2$  พบว่า ทั้ง 7 ตัวอย่างมีจุดตัดของการเกิด recombination ใกล้เคียงกับบริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1/ORF2 ( $p < 0.001$ ) โดยอยู่บริเวณปลาย C ของยีน RdRp และภายในปลาย N ของยีน VP1 ซึ่งเป็นจุดที่มักจะพบการเกิด recombination ได้บ่อยที่สุด

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

# # 5674029430 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HUMAN NOROVIRUS (HNOV) / RECOMBINATION / THAILAND

TIKUMPORN PHUMPHOLSUP: DETECTION OF RECOMBINANT HUMAN NOROVIRUS IN THAILAND ISOLATED BETWEEN 2009-2014. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., 84 pp.

Norovirus (NoV) is the most important cause of nonbacterial acute gastroenteritis worldwide. Recombinations allow for increased fitness or escape from humoral immunity, and the emergence of new norovirus strains. In Thailand, there is a lack of data on NoV recombinants among clinical isolates. In this study, we screened stool samples from pediatric diarrheal patients for norovirus and characterized recombinant NoV strains present in Thailand, 2009-2014. From 150 NoV-positive specimens, 104 samples were successfully genotyped by RT-PCR for the VP1 region and twelve different genotypes were identified: GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.12, GII.13, GII.14, GII.17 and GII.21, of which GII.4 was the most prevalent (67/104, 64.4 %). Phylogenetic and Simplot analyses showed that seven intra-genogroup recombinant strains were detected: three GII.21 RdRp/GII.3 VP1 recombinants, two GII.12 RdRp/GII.3 VP1 recombinant and two GII.12 RdRp/GII.1 VP1 recombinant. Maximum  $\chi^2$  analysis indicated that all had similar breakpoints near ORF1/ORF2 junction ( $p < 0.001$ ) either slightly upstream within the C-terminus of RdRp or downstream within the N-terminal domain of VP1.

Department: Biochemistry

Student's Signature .....

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากปราศจากบุคคลผู้ซึ่งมีพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ การศึกษาในระดับปริญญาโทมหาบัณฑิตของข้าพเจ้า บุคคลผู้นั้นคือ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่เป็น ประโยชน์ต่อการทำวิจัย ทั้งยังสนับสนุนและผลักดันการทำวิจัยของผู้วิจัยด้วยความห่วงใยและเอา ใจใส่อย่างดีมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังได้ให้ความรู้ด้านวิชาการ คุณธรรม จริยธรรมและการ ดำเนินชีวิต ทำให้ผู้วิจัยสามารถพัฒนางานวิจัยออกมาได้อย่างมีคุณภาพและสำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

การบรรลุลูกสุดท้ายของงานวิจัย จะก้าวผ่านอุปสรรคระหว่างการทำงานวิจัยมาได้ หากปราศจากบุคคลท่านนี้ คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ทุกครั้งที่ปัญหาในด้านเทคนิคการทำวิจัย อาจารย์จะแนะนำวิธีแก้ปัญหาและ ทางออกที่ดีให้กับข้าพเจ้าเสมอ รวมถึงให้คำปรึกษาการใช้ชีวิตการเรียนในภาควิชาชีวเคมีได้เป็น อย่างดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงค่ะ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้หากปราศจากคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร. ธีรพร ชินชัย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร และ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย ที่ได้ กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำ รวมทั้งคอยขัดเกลาสำนวนภาษาและพิจารณาเนื้อหาให้ ถูกต้องครบถ้วน ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านค่ะ

ขอขอบคุณ นายแพทย์วิบูลย์ศักดิ์ วุฒินโนชติ จากโรงพยาบาลชุมแพ ที่ให้ความร่วมมือ ในการเก็บตัวอย่างมาใช้ในงานวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณสมาชิกศูนย์เชี่ยวชาญ เฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกคน ที่ให้ คำปรึกษาและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา อุปสรรคต่างๆ ให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณค่ะ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาต่อระดับปริญญา มหาบัณฑิต พร้อมทั้งให้ความรักความอบอุ่น และเป็นกำลังใจที่ดีทั้งในยามทุกข์และยามสุขของ ข้าพเจ้าตลอดมา ข้าพเจ้าขอขอบความสำเร็จและความภาคภูมิใจนี้ให้กับทุกท่านที่มีส่วนร่วมใน ความสำเร็จของข้าพเจ้า ขอขอบคุณค่ะ

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ท
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
กรอบความคิดการวิจัย .....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย .....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	6
การแพร่กระจายของเชื้อ (Transmission).....	9
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของไวรัส .....	10
ความไวทางด้านพันธุกรรม (Genetic Susceptibility).....	10
การเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication).....	11
อาการแสดงทางคลินิก.....	13

วิธีการตรวจสอบการติดเชื้ออิวแมนโนโรไวรัส .....	13
การป้องกันและการรักษา .....	14
ระบาดวิทยาของเชื้อและการเกิด recombination .....	14
หลักการและเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม.....	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
รูปแบบการวิจัย .....	20
ประชากรที่ศึกษา.....	20
1. กลุ่มตัวอย่าง.....	20
2. จำนวนประชากร (population study).....	20
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี .....	22
อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง.....	22
สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลอง .....	22
1) สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง .....	22
2) สารเคมีที่ใช้สกัด RNA.....	22
3) สารเคมีสำหรับการเปลี่ยน RNA ให้กลายเป็น complementary DNA.....	23
4) สารเคมีที่ใช้เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วย PCR.....	23
5) สารเคมีสำหรับการทำ electrophoresis .....	23
6) สารเคมีสำหรับการ Purify DNA.....	24
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
1. BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5) .....	24
2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	
( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ) .....	24
3. Chromas Sequence Chromatogram Viewer (version 2.01).....	24



4.	DNASTAR SeqmanTM II (version 6.00) .....	24
5.	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 6.06) .....	24
6.	Simplot (version 3.5.1).....	25
7.	Maximum chi-squared test ของ Maynard Smith (1992) ( <a href="http://www.lifesci.sussex.ac.uk/CSE/test/">http://www.lifesci.sussex.ac.uk/CSE/test/</a> ) .....	25
วิธีดำเนินงานวิจัย .....		26
1.	การเก็บตัวอย่าง (Collecting sample).....	26
2.	การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA extraction) .....	26
3.	การทำ Reverse transcription .....	27
4.	การตรวจหาการติดเชื้อ HNoV ด้วยวิธี nested PCR บริเวณยีน RdRp.....	27
5.	การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HNoV ด้วยวิธี nested PCR บริเวณยีน VP1.....	30
6.	การตรวจสอบการเกิด recombination .....	33
7.	การสกัดแยก PCR product ให้บริสุทธิ์ .....	36
8.	การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์.....	37
9.	การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	37
10.	การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) .....	37
11.	การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....		39
1.	การหาจีโนไทป์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจากยีน VP1 และวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ด้วยการสร้าง phylogenetic tree .....	39
2.	การเปรียบเทียบความชุกของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่พบในการศึกษานี้ เทียบกับประเทศอื่นๆ .....	44
3.	การวิเคราะห์การกระจายตัวการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามฤดูกาลและตามกลุ่มอายุ .....	45

4. การวิเคราะห์การกระจายตัวการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุและเพศ .....	46
5. การเปรียบเทียบจีโนมไทป์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน RdRp และ VP1 .....	49
6. การวิเคราะห์ผลการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส .....	51
7. การวิเคราะห์ข้อมูลการแปลรหัสของลำดับกรดอะมิโน .....	54
8. การวิเคราะห์สายพันธุ์ที่มีการเกิด recombination ที่พบในการศึกษานี้ กับประเทศอื่นๆ .....	56
9. การวิเคราะห์อัตราการเกิด recombination ที่พบในการศึกษานี้ กับประเทศอื่นๆ .....	58
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	59
การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส .....	62
รายการอ้างอิง .....	66
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี .....	77
ภาคผนวก ข ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา .....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	84

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชื่อและหน้าที่ของโปรตีนชนิดต่างๆ ในเชื้อโนโรไวรัส [26].....	8
ตารางที่ 2 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1.....	28
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน RdRp สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 1.....	28
ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1.....	28
ตารางที่ 5 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2.....	29
ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน RdRp สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 2.....	29
ตารางที่ 7 อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Nested-PCR ครั้งที่ 2.....	30
ตารางที่ 8 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1.....	30
ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน VP1 สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 1.....	31
ตารางที่ 10 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1.....	31
ตารางที่ 11 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2.....	32
ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน VP1 สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 2.....	32
ตารางที่ 13 อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Nested-PCR ครั้งที่ 2.....	32
ตารางที่ 14 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1.....	33
ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 1.....	34
ตารางที่ 16 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1.....	34
ตารางที่ 17 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2.....	35
ตารางที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 2.....	35
ตารางที่ 19 อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2.....	36
ตารางที่ 20 ตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยระบบทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน ตั้งแต่ปี 2009-2014.....	39
ตารางที่ 21 ระบาดวิทยาของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2009-2014.....	40

ตารางที่ 22 จำนวนตัวอย่างของแต่ละสายพันธุ์ที่พบการระบาดตั้งแต่ปี 2009-2014 ..... 43

ตารางที่ 23 อัตราการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศต่างๆ..... 44

ตารางที่ 24 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุ..... 46

ตารางที่ 25 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุ เทียบกับในประเทศอื่นๆ ..... 47

ตารางที่ 26 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามเพศ..... 47

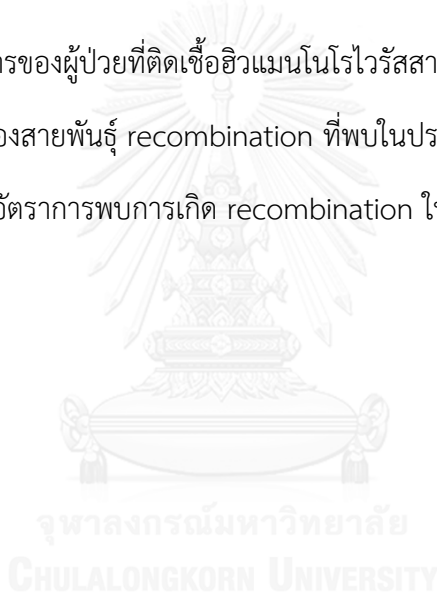
ตารางที่ 27 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามเพศ เทียบกับในประเทศอื่นๆ..... 48

ตารางที่ 28 การจำแนกจีโนไทป์ที่ได้จากทั้งยีน RdRp และ VP1 ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่เกิด recombination ..... 50

ตารางที่ 29 ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสสายพันธุ์ recombination..... 50

ตารางที่ 30 การระบาดของสายพันธุ์ recombination ที่พบในประเทศอื่นๆ ..... 57

ตารางที่ 31 เปรียบเทียบอัตราการพบการเกิด recombination ในประเทศอื่นๆ ..... 58



## สารบัญรูป

รูปที่ 1 : กรอบความคิดการวิจัย.....	5
รูปที่ 2 : องค์ประกอบโครงสร้างของเชื้อโนโรไวรัส.....	7
รูปที่ 3 : องค์ประกอบภายในโครงสร้างของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส.....	7
รูปที่ 4 : การจัดกลุ่ม genogroup ของเชื้อโนโรไวรัสตามลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน VP1.....	8
รูปที่ 5: กระบวนการ replication ของ norovirus .....	12
รูปที่ 6 : กลไกพื้นฐานการเกิด recombination ของ norovirus .....	16
รูปที่ 7 : ตำแหน่งที่มีการเกิด recombination ของ norovirus GII.4 .....	17
รูปที่ 8 : ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR .....	19
รูปที่ 9 : ตัวอย่างผล RT-PCR ยีน VP1 ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส .....	40
รูปที่ 10 : phylogenetic tree ที่ได้จกลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน VP1 .....	42
รูปที่ 11 : การกระจายตัวของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในแต่ละเดือนของประเทศไทย ช่วงปี 2009-2014.....	45
รูปที่ 12 : Similarity Plot.....	52
รูปที่ 13 : Bootscan method.....	53
รูปที่ 14 : การเปรียบเทียบการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของยีน RdRp และ VP1 ในสายพันธุ์ recombination .....	55

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
ORF	open reading frame
Kb	kilobase
Bp	base pair
NV	novel
HNoV	human norovirus
NVL	Norwalk-like virus
MNV	murine norovirus
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
VP1	viral protein
HBGA	histo-blood group antigens
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ M	Micromolar
UTR	untranslated region
PBS	Phosphate-buffered saline
TBE	tris-borate buffer
S domain	Shell domain
P domain	Protruding domain

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

อีวแมนโนโรไวรัสเป็นไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำให้เป็นการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารทั่วโลก (1) ระบาดครั้งแรกขึ้นเมื่อปี ค.ศ.1968 ที่โรงเรียนในเมือง Norwalk รัฐ Ohio ประเทศสหรัฐอเมริกา และต่อมาได้ถูกตรวจพบจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในปี 1972 (2) ซึ่งถือว่าเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารชนิดแรกของโลก (3) ในช่วง 2 ทศวรรษต่อมา นักวิจัยได้พัฒนาวิธีการเพื่อจะตรวจหาไวรัสหรือสาเหตุของการเกิดโรคและการรักษา ซึ่งในปี 1990 เทคนิค reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) ได้ปรากฏขึ้น ทำให้มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อโนโรไวรัสได้ (4)

โนโรไวรัสถูกจัดอยู่ใน family *Caliciviridae* โครงสร้างเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก (positive single strand RNA) ขนาดจีโนมประมาณ 7.5 kb (5) แบ่งออกเป็น 5 genogroup (GI-GV) และในแต่ละ genogroup สามารถแบ่งออกได้อีกหลายๆ genotype แต่มีเพียง 3 genogroup ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์ คือ GI, GII และ GIV โดย GII.4 เป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุด ประมาณร้อยละ 60 ของการระบาดของเชื้อโนโรไวรัส (6)

อีวแมนโนโรไวรัสเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารซึ่งพบได้ในทุกช่วงอายุ (7) ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าอีวแมนโนโรไวรัสเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางระบบทางเดินอาหารมากถึง 2 ใน 3 ของผู้ป่วยทั้งหมด คิดเป็นจำนวนประมาณ 5.5 ล้านรายต่อปี (8) ในขณะที่ประเทศอังกฤษพบประมาณ 2 ล้านรายต่อปี (9) การระบาดของเชื้อสามารถพบได้ในประชากรทั่วไป ทั้งเด็ก, ผู้สูงอายุ, ผู้มีภูมิคุ้มกันต่ำ, กลุ่มคนในกองทัพทหาร, นักท่องเที่ยว, บุคลากรในสถานพยาบาล เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า อีวแมนโนโรไวรัสเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่พบในเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี เป็นอันดับ 2 รองจากเชื้ออีวแมนโรตาไวรัส โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 12 (10) ในแต่ละปีพบผู้ติดเชื้อจากไวรัสนี้ประมาณ 900,000 ราย จากประเทศอุตสาหกรรม และ 218,000 ราย ในประเทศกำลังพัฒนา (11) การติดเชื้อไวรัสนี้มักพบบ่อยในนักท่องเที่ยวที่เดินทางไปในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งจะมีการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่มที่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการแพร่ของเชื้อไวรัส มีรายงานพบว่าอีวแมนโนโรไวรัสเป็นเชื้อไวรัสที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ของนักท่องเที่ยวที่มี

อาการท้องเสียจากการเดินทางไปประเทศเม็กซิโก, อินเดีย และกัวเตมาลา รองจากเชื้อ *E.coli* (12) สำหรับในประเทศสหรัฐอเมริกาพบเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสระบาดในนักท่องเที่ยวที่เดินทางไปลองเรือ และมีอาการท้องเสียเฉียบพลัน จึงเป็นที่รู้จักกันในชื่อ “cruise ship virus” (13) สำหรับในประเทศไทยในอดีตมีอัตราการระบาดที่พบในเด็กแรกเกิดและเด็กเล็กอยู่ในช่วง ร้อยละ 8.1-14.1 และในทุกช่วงอายุมีอัตราการระบาดประมาณร้อยละ 6.5 (14-17)

จีโนมของฮิวแมนโนโรไวรัสประกอบด้วย 3 open reading frames (ORFs) โดย ORF1 ถอดรหัสให้ได้เป็น polyprotein ขนาดใหญ่ ORF2 ถอดรหัสให้ major capsid protein (VP1) และ ORF3 ถอดรหัสให้ minor capsid protein (VP2) ที่ปลาย C ของ ORF1 และปลาย N ของ ORF2 เป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (18) ปัจจุบันจึงมีรายงานว่าบริเวณนี้ก่อให้เกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสซึ่งเป็นบริเวณที่มีการทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 (19)

เป็นที่รู้กันตัวอย่างกว้างขวางว่าฮิวแมนโนโรไวรัสมีอัตราการเกิด recombination ที่สูง และเป็นที่ยอมรับในการศึกษา โดยมีงานวิจัยหลายๆ งานที่ค้นพบสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจาก recombination ของไวรัส เช่น ค้นพบสายพันธุ์ NVGII.1/NVGII.5 ในประเทศอินเดีย (20) และ GII.3/GII.b ในประเทศออสเตรเลีย (21) ซึ่งจัดจำแนกสายพันธุ์จากบริเวณ RdRp ในประเทศเกาหลีใต้ได้ค้นพบ recombination 2 สายพันธุ์ คือ GII.4/GII.3 และ GII.b/GII.16 ในปี 2007-2008 (22) ดังนั้นการค้นพบเหล่านี้พิสูจน์ให้เห็นว่า RNA recombination ของฮิวแมนโนโรไวรัสนำมาซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมและเกิดเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ได้ ตั้งแต่ที่มีการค้นพบสายพันธุ์ recombination ขึ้น กระบวนการก่อโรคของสายพันธุ์ recombinant นั้นก็จะมีแตกต่างไปจากไวรัสสายพันธุ์ปกติได้ การเฝ้าสังเกตความชุกของการเกิดสายพันธุ์ใหม่จึงเป็นสิ่งจำเป็น ในปัจจุบันเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นที่ยอมรับใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจวัดและค้นหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฮิวแมนโนโรไวรัส RT-PCR สามารถเพิ่มจำนวนบริเวณที่จำเพาะของจีโนม ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ตอบสนองได้ง่ายและจำเพาะสูง (23)

ในช่วงหลาย 10 ปีที่ผ่านมา การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสได้มีจำนวนการเกิดเพิ่มมากขึ้น แต่ข้อมูลในประเทศไทยยังมีผู้ทำการศึกษาและค้นพบน้อย ดังนั้นวัตถุประสงค์การวิจัยนี้ คือ เพื่อตรวจวัดและจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่มีการเกิด recombination ตั้งแต่ ค.ศ. 2009-2014 ในประเทศไทย โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร, โรงพยาบาลในเครือข่ายปกอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร และ โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ที่มีอาการจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารเฉียบพลัน จากนั้นใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจวัด โดยเพิ่มจำนวนด้วยวิธี nested PCR



ในบริเวณยีน VP1 และทำ DNA sequencing จากนั้นดูลำดับความสัมพันธ์ของจีโนม เพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับข้อมูลสายพันธุ์ที่ได้จากยีน RdRp โดยคาดหวังว่าจะสามารถตรวจพบความแตกต่างกันทางสายพันธุ์ที่ได้จากยีน RdRp และ VP1 ที่เป็นผลมาจากการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยและจัดจำแนกสายพันธุ์ใหม่ได้ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อสายพันธุ์ที่ต่างไปจากสายพันธุ์เดิมได้ต่อไปในอนาคต

### คำถามของการวิจัย

1. ในประเทศไทยช่วงปี ค.ศ. 2009-2014 มีการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสสายพันธุ์ใดบ้างและมีสายพันธุ์ที่เกิดจากกระบวนการ recombination หรือไม่
2. สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส ที่เกิด recombination มีสายพันธุ์อะไรบ้าง และมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในประเทศอื่นๆ หรือไม่ อย่างไร

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบระบาดวิทยาและการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2009-2014
2. เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่เกิด recombination ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2009-2014

### สมมติฐานของการวิจัย

1. เมื่อนำสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่จำแนกได้จากยีน VP1 มาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่จำแนกได้จากยีน RdRp แล้วพบว่าได้สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน
2. เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน RdRp ถึงยีน VP1 พบว่ามีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของพันธุกรรม (recombination) เกิดขึ้น และสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นได้

ข้อตกลงเบื้องต้น                      ไม่มี

### คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. Recombination หมายถึง การรวมกลุ่มของยีนใหม่ โดยปกติแล้วในการติดเชื้ออาจเกิดขึ้นจากไวรัสมากกว่า 1 สายพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนหรือการแทนที่ของชิ้นส่วนพันธุกรรมกัน เป็นผลให้มีจีโนมที่ที่หลากหลายของไวรัสในกลุ่มนั้น
2. Genogroup เป็นการจัดจำแนกเชื้อโนโรไวรัส ออกเป็นกลุ่มย่อยโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมบริเวณยีน VP1 เปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล NCBI

### คำสำคัญ

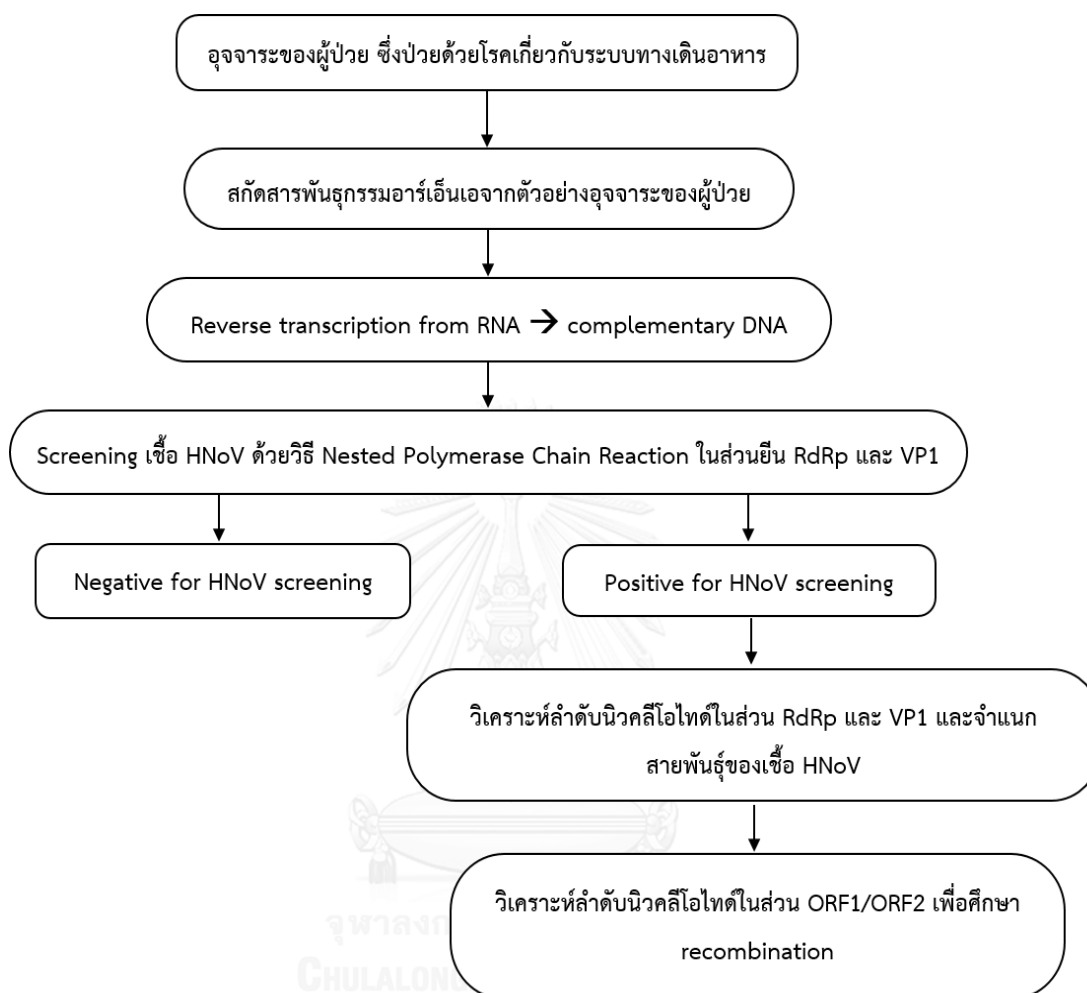
Human norovirus (HNoV)

Recombination

Thailand



## กรอบความคิดการวิจัย



รูปที่ 1 : กรอบความคิดการวิจัย

ข้อจำกัดของงานวิจัย ไม่มี

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อ HNoV และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ HNoV ที่พบในประเทศไทย เพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลนี้มาใช้ในการป้องกันควบคุมโรค และเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสในอนาคตต่อไป
2. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HNoV ที่ได้จากงานวิจัยจะถูกเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้ประโยชน์ในการศึกษาและการอ้างอิงของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

## บทที่ 2

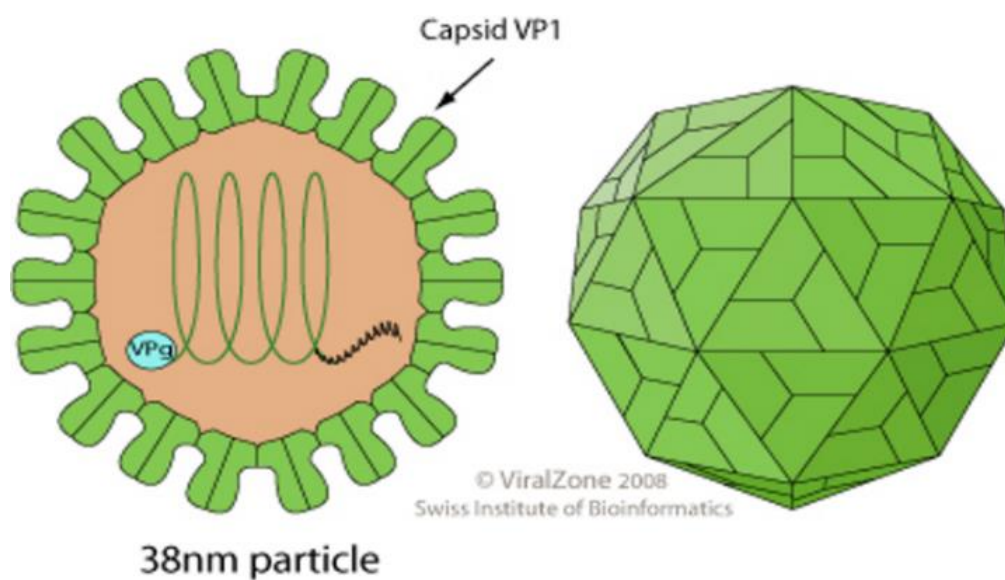
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อโนโรไวรัส แรกเริ่มจะรู้จักกันในชื่อ “Norwalk agent” เนื่องจากในปี 1968 มีการระบาดของโรคท้องเสียฉับพลันขึ้นในโรงเรียนของเมือง Norwalk ประเทศสหรัฐอเมริกา และ ในปี 1972 ได้ทำการศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าเป็นไวรัส จึงได้ชื่อว่า “Norwalk virus” ในเวลาต่อมาได้พบอนุภาคที่มีรูปร่างและก่อโรคคล้ายคลึงกันในแหล่งต่างๆ แต่มีคุณสมบัติของแอนติเจนแตกต่างกันไปบ้าง จึงเรียกวirusกลุ่มนี้ว่า “Norwalk like viruses” เมื่อได้มีการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ของจีโนมของเชื้อโนโรไวรัส แสดงให้เห็นว่าไวรัสชนิดนี้มีการจัดลำดับของจีโนมที่เหมือนกับไวรัสในวงศ์ (family) *Caliciviridae* จึงถูกจัดให้อยู่ใน genus *Norovirus* (24) ซึ่งชื่อโนโรไวรัสถูกตั้งขึ้นในปี 2002 โดย International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย capsid ที่ไม่มีชั้นไขมันหุ้ม (non-enveloped) การเรียงตัวของ capsid เป็นแบบ icosahedral symmetry เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 35-39 nm (25) ดังรูปที่ 2 ลักษณะจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอ สายบวก (+ss RNA) ขนาดประมาณ 7.5 kb ประกอบด้วย 3 open reading frame (ORFs) ดังรูปที่ 3 โดย ORF1 สามารถแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้างหลักขนาดใหญ่ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ protease แล้ว ได้โปรตีน 6 ชนิด คือ p48, NTPase, p22, VPg, Pro และ Pol (RdRp) ส่วน ORF2 แปลรหัส เป็น capsid protein VP1 และ ORF3 แปลรหัสโปรตีน VP2 โดยหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 1 (26)

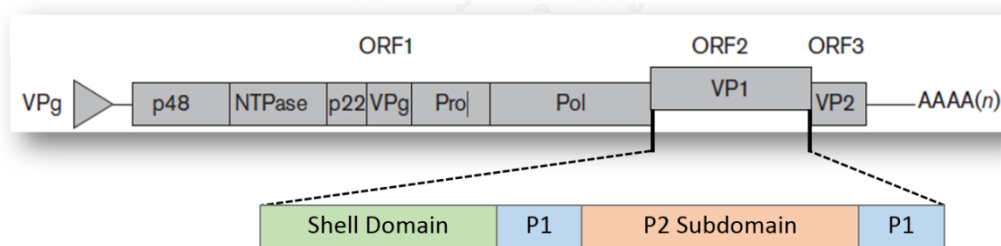
เชื้อโนโรไวรัสสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 genogroup (GI-GV) โดยขึ้นกับการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บน capsid VP1 ซึ่งในแต่ละ genogroup ยังสามารถแบ่งได้อีกอย่างน้อย 44 genotypes (16 GI, 23 GII, 2 GIII, 2 GIV and 1 GV) (27) โดย GI, GII และ GIV สามารถทำให้เกิดติดเชื้อในมนุษย์ได้ จะเรียกวirusชนิดนี้ว่า ฮิวแมนโนโรไวรัส (human norovirus) ซึ่ง GII.4 ถูกพบได้บ่อยที่สุด นอกจากนี้ GII.11, GII.18 และ GII.19 สามารถติดเชื้อในหนูได้ รวมทั้ง GIV บางสายพันธุ์ยังสามารถติดเชื้อในวัวได้อีกด้วย ในขณะที่ GIII และ GV สามารถพบการติดเชื้อได้ในวัวและหนูตามลำดับ (28) ช่วงความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีนโครงสร้าง (capsid protein) ของไวรัสต่าง genogroup คือ ร้อยละ 45.0–61.4 ส่วนไวรัสที่อยู่ภายใน genogroup เดียวกันมีความ

ต่างกันประมาณร้อยละ 14.3–43.8 ในขณะที่ไวรัสที่อยู่ใน genotype เดียวกัน จะมีความต่างประมาณ ร้อยละ 0–14.1 (29)



รูปที่ 2 : องค์ประกอบโครงสร้างของเชื้อโนโรไวรัส

ที่มา : [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/194.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/194.html)

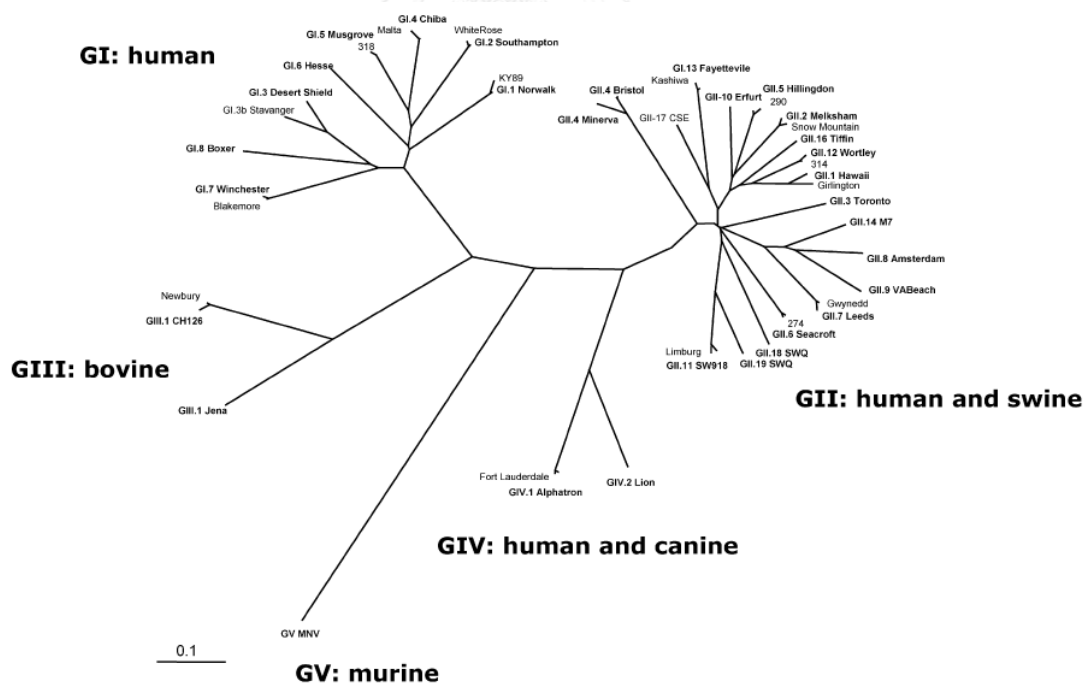


รูปที่ 3 : องค์ประกอบภายในโครงสร้างของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส

ที่มา : Lucy G. Thorne and Ian G. Goodfellow, 2014 (26)

ตารางที่ 1 ชื่อและหน้าที่ของโปรตีนชนิดต่างๆ ในเชื้อโนโรไวรัส (26)

Protein	Function
p48	ช่วยในกระบวนการ replication
NTPase	RNA helicase/NTPase
p22	ช่วยในกระบวนการ replication
VPg	เป็นโปรตีนที่ยึดเชื่อมกับจีโนมของไวรัส รวมถึงการ translation และ replication
Pro	Protease
PoI/3Dpol	RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)
VP1	Major capsid protein
VP2	Minor capsid protein



รูปที่ 4 : การจัดกลุ่ม genogroup ของเชื้อโนโรไวรัสตามลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน VP1

ที่มา : Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD, 2009 (28)

นอกจากนี้ ยีน VP1 ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญนั้น ยังประกอบไปด้วย 2 บริเวณ (domain) บริเวณแรกเป็นเปลือก (shell) หรือที่เรียกว่า S domain (ตำแหน่ง 1-217) อยู่ที่ปลาย N จะเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูง (highly conserved) มีความสำคัญสำหรับการคงรูปร่าง icosahedral ส่วนบริเวณที่สองอยู่ที่ปลาย C จะยื่นออกมาจากพื้นผิว (protruding) หรือที่เรียก P domain (ตำแหน่ง 226-530) ซึ่งเป็นส่วนที่ให้ความมั่นคงในการยึดเกาะของ 2 โมเลกุลที่พื้นผิว โดย P domain ยังประกอบด้วย 2 subdomains คือ P1 และ P2 โดย P2 subdomain (ตำแหน่ง 275-405) จะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนที่สูง (hypervariable) อีกทั้งยังประกอบด้วยบริเวณ histo-blood group antigen (HBGA) binding site ซึ่งเป็น oligosaccharide side-chains ของแอนติเจนที่ยื่นออกมา เป็นบริเวณที่เกิดการจับกันของ receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน (host) และไวรัส ทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ (30) และยังเป็นบริเวณที่เป็นเป้าหมายในการจับกับแอนติบอดี (antigenic sites) (31, 32) เมื่อยีน VP1 เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombinant) โดยที่ไม่อาศัยองค์ประกอบต่างๆของไวรัสตัวอื่น คือเกิดการแลกเปลี่ยนภายในตัวไวรัสตัวเอง (self-assembles) ทำให้ได้เป็น virus-like particles (VLPs) ที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีที่แตกต่างไปจากไวรัสดั้งเดิม เมื่อเกิดการแสดงออกแบบ recombinant จะทำให้ปราศจากส่วนประกอบของ S domain ทำให้ P domain ของเชื้อโนโรไวรัสเกิดการรวมตัวกันเป็น P particles ที่มีความสามารถในการจับกับ histo-blood group antigen (HBGA) หลังจากที่ได้มีการค้นพบ VLPs ทำให้มีประโยชน์ในการศึกษาเชื้อโนโรไวรัสทั้งด้านภูมิคุ้มกันวิทยา, ระบาดวิทยา และการเกิดโรค นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกสำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันเชื้อโนโรไวรัสอีกด้วย (33, 34)

### การแพร่กระจายของเชื้อ (Transmission)

การติดเชื้อของฮิวแมนโนโรไวรัสสามารถพบได้ในทุกช่วงอายุ เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อเชื้อชนิดนี้จะสั้น ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันระยะยาว แต่ส่วนมากมักจะพบการติดเชื้อในเด็กแรกเกิด ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ปริมาณของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่เข้าสู่ร่างกายมนุษย์เพื่อก่อโรคมียุทธศาสตร์ที่ต่ำ (low doses) ประมาณ 18-1,000 virus particles (35) และสามารถต้านทานต่อสารทำความสะอาดทั่วไปได้ มีคุณสมบัติเป็นเชื้อที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร การติดเชื้อจากฮิวแมนโนโรไวรัสถูกจัดกลุ่มความเป็นอันตรายต่อสุขภาพ (bioterrorism agents) อยู่ในกลุ่ม Category B คือ เป็นสิ่งที่สามารถคุกคามได้น้อย เป็นอันตรายต่อสุขภาพระดับปานกลางและเป็นอันตรายต่อชีวิตน้อย โดยวิธีการแพร่กระจายของเชื้อสู่คน จะติดต่อกับวิธีที่เรียกว่า “จากอุจจาระถึงปาก (Fecal-oral transmission)” คือ จากการกินอาหาร ดื่มน้ำ ใช้น้ำ ที่มีเชื้อโรคเจือปน

และจากการที่เชื้อโรคติดจากมือเข้าสู่ปาก และ/หรือเข้าสู่ปากโดยตรง เชื้อจะแพร่กระจายได้ดีในสถานที่ที่มีอากาศถ่ายเทน้อยและไม่สะอาด เช่น สถานพยาบาล, บ้านพักพยาบาล, โรงเรียน, ร้านอาหาร, เรือท่องเที่ยว เป็นต้น เชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสสามารถอยู่รอดได้ในช่วงระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นกับพื้นผิวที่ยืดเกาะและอุณหภูมิ โดยมีรายงานว่า สามารถอยู่รอดเป็นสัปดาห์บนพื้นผิวที่แข็ง และถ้าปนเปื้อนในน้ำจะอยู่ได้นานเป็นเดือนถึงปี (36, 37)

### การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของไวรัส

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อของฮิวแมนโนโรไวรัส โดยเกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกันขึ้นมาเพื่อป้องกันการติดเชื้อรวมถึงการกำจัดเชื้อ แต่ยังไม่สามารถทราบรูปแบบที่แน่ชัดได้ เนื่องจากการทดสอบการกำจัดเชื้อของแอนติบอดีที่มีอยู่ในปัจจุบันไม่สามารถใช้ได้ เนื่องจากเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ (non-cell culture) รวมถึงยังขาดต้นแบบของสัตว์ขนาดเล็ก (small animal model) แต่อย่างไรก็ตาม จากรายงานการศึกษาทดลองกับอาสาสมัคร 5 ราย พบว่าระบบภูมิคุ้มกันสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสที่เกิดขึ้นอีกครั้งใน 6-14 สัปดาห์ต่อมาได้ แสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันแอนติบอดีที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อครั้งใหม่นั้นมีระยะเวลาที่ค่อนข้างสั้น (< 6 เดือน) แต่การป้องกันในระยะยาวยังเป็นเรื่องที่ยากในการศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่า ในอาสาสมัครบางรายสามารถกลับมาติดเชื้อโดยสายพันธุ์เดิมซ้ำอีกครั้งใน 27-42 เดือนต่อมา (38)

### ความไวทางด้านพันธุกรรม (Genetic Susceptibility)

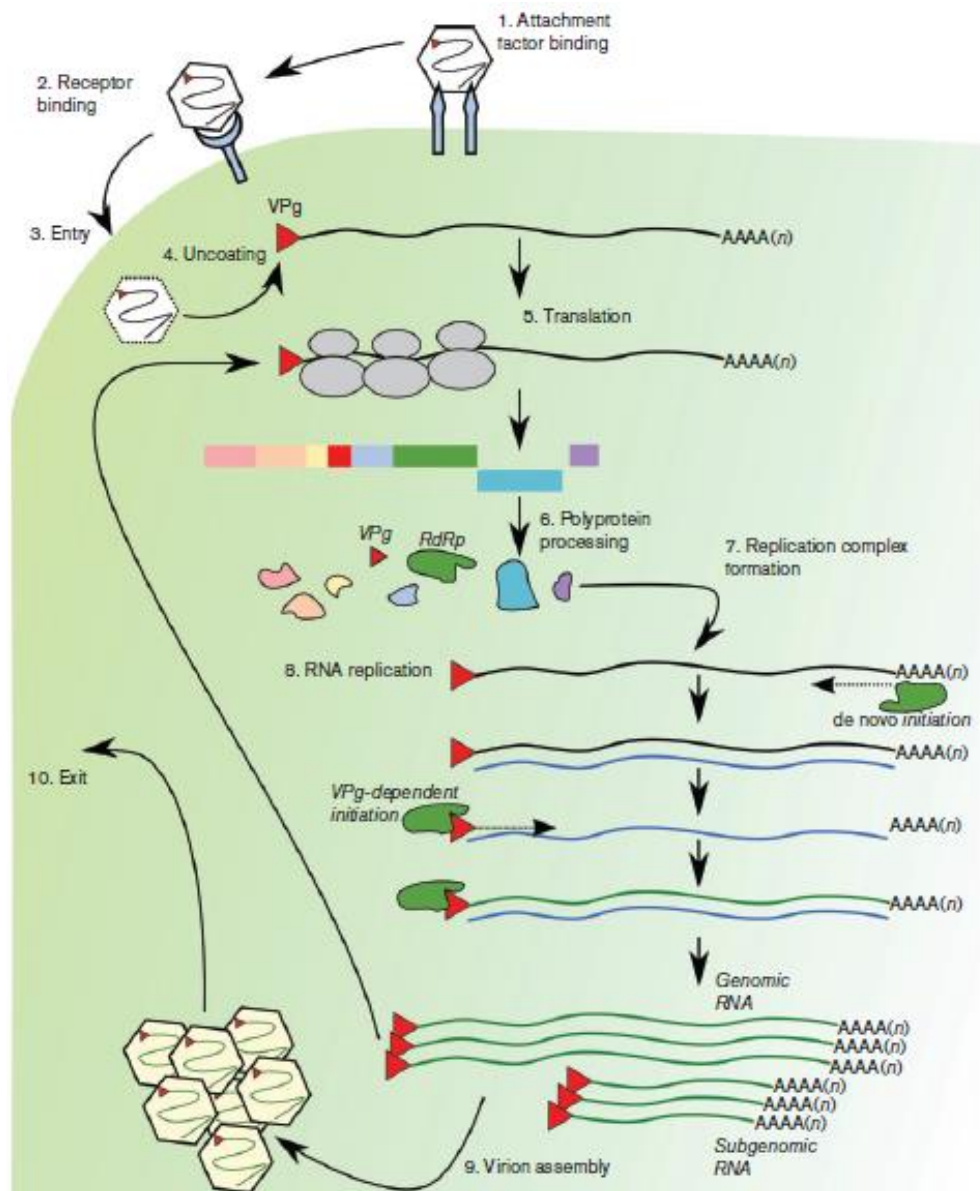
ความไวทางด้านพันธุกรรมต่อการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส นั้น มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ histo-blood group antigens (HBGAs) ที่อยู่บนเยื่อบุผิวของลำไส้เล็ก โดยที่ HBGA เป็นคาร์โบไฮเดรตของหมู่เลือด ประกอบด้วย ABO, Lewis และสารตั้งต้นแอนติเจนที่แสดงออกในเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งจะทำหน้าที่คล้ายตัวรับ (receptor) สำหรับเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส โดยการจับกันจะเกิดขึ้นอย่างจำเพาะระหว่างเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในแต่ละสายพันธุ์กับคาร์โบไฮเดรต HBGA แต่ละรูปแบบ

HBGA ที่มีความสำคัญที่สุดที่เกี่ยวข้องกับความไวต่อการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส คือ H type-1 ที่ถูกแปลรหัสมาจาก secretor gene (*FUT2* gene) โดยรูปแบบการหลั่ง H1 antigen นั้นขึ้นอยู่กับ การเพิ่มขึ้นของ glycosyltransferases ที่ประกอบด้วย Lewis, A enzyme และ B enzyme ที่พบในเยื่อบุผิวและเม็ดเลือดแดง เชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจะจับกับ H type-1 ส่งผลต่อการเชื่อมโยงเหล่านี้ (39)



## การเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication)

เชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสเข้าสู่เซลล์เยื่อบุลำไส้โดยการเกาะติด (attachment) กับตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ (receptor) ในที่นี้คือ histo blood group antigens (HBGA) ทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้ ต่อมาจึงเกิดกระบวนการแยกสารพันธุกรรมของไวรัสออก (uncoating) จากส่วนของโปรตีน เมื่อสารพันธุกรรมของไวรัสอยู่ภายในไซโตพลาสซึมจะมีการแปลรหัส (translation) ผ่านโปรตีน VPg ที่อยู่บริเวณปลาย 5' จากนั้น polyprotein ที่บริเวณ ORF1 จะถูกตัดด้วย viral protease ได้เป็นโปรตีน 6 ชนิด เนื่องจากจีโนมของไวรัสเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก ดังนั้นจึงต้องทำการสังเคราะห์ viral RNAs ผ่านกระบวนการ transcription ในไซโตพลาสซึมโดยใช้ virus-specific RNA dependent RNA polymerase (RdRp) เพื่อให้ได้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA replication) และใช้สำหรับสร้างสาย messenger RNA ซึ่งจะมีการแปลรหัส เพื่อใช้สร้างโปรตีนที่จะเป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของอนุภาคไวรัสต่อไป หลังการสร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของไวรัสครบแล้วก็จะมีการประกอบ (assembly) เป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่และออกจากเซลล์โดยวิธีการทำลายเยื่อบุผิวของเซลล์ (lysis) (26)



รูปที่ 5: กระบวนการ replication ของ norovirus  
ที่มา : Lucy G. Thorne and Ian G. Goodfellow, 2014 (26)

## อาการแสดงทางคลินิก

เมื่อไวรัสแพร่เข้าสู่ร่างกาย จะเริ่มต้นการเพิ่มจำนวนภายในลำไส้เล็ก หลังจากนั้นประมาณ 1-2 วัน จะเริ่มแสดงอาการ โดยเริ่มแรกจะมีอาการทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน มีอาการคลื่นไส้, อาเจียน, ท้องเสีย, ถ่ายเหลว และอาจมีอาการข้างเคียงคือ ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ เบื่ออาหาร มีไข้ต่ำๆ ฮิวแมนโนโรไวรัสไม่ใช่เชื้อโรคชนิดแพร่กระจาย จะไม่แพร่ผ่านเข้ากระแสเลือด ดังนั้นหากมีอาการที่คล้ายโรคบิดหรือไข้สูงจะผิดปกติ (30) อาการเหล่านี้จะสามารถหายได้เอง โดยปกติใช้เวลาประมาณ 24-60 ชั่วโมง แต่ในบางรายอาจใช้ระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์ ถ้ามีการติดเชื้อด้วยปริมาณเชื้อที่สูง (Viral Load  $10^{12}$  NoV copies/g feces) (40) อัตราการตายที่เกิดจากเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศสหรัฐอเมริกาประมาณ 300 รายต่อปี กลุ่มคนที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสอย่างรุนแรงมักพบกับเด็กเล็ก, ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยสาเหตุของการตายมาจากอาการขาดน้ำและระบบอิเล็กทรอนิกส์ในร่างกายไม่สมดุล (41)

## วิธีการตรวจสอบการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส

เทคนิค Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นวิธีที่เลือกใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อโนโรไวรัส (42) แต่ก็ยังมีห้องทดสอบการตรวจวินิจฉัยจำนวนมาก ที่ยังไม่สามารถที่จะดำเนินการทดสอบนี้ได้ เนื่องจากว่าความไวของการทดสอบ RT-PCR ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้ โดยที่มีแค่ไพรเมอร์บางส่วนเท่านั้นที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนยีนที่ใช้ในการหาจีโนไทป์ให้กว้างขึ้นได้ อย่างไรก็ตามชุดไพรเมอร์ไม่อาจสามารถตรวจพบเชื้อโนโรไวรัสได้ทั้งหมด เพราะเชื้อโนโรไวรัสที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในวงกว้าง เทคนิค RT-PCR อาจถูกจำกัดโดยมีตัวยับยั้งการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม, การสกัดอาร์เอ็นเอที่ไม่มีประสิทธิภาพ และการสลายตัวของอาร์เอ็นเอที่เกิดจากการเก็บสารตัวอย่างไว้ในสภาวะที่ไม่ดี

มีรายงานการศึกษาบางงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า เทคนิค real-time RT-PCR อาจจะมีควมไวต่อการตรวจพบการติดเชื้อโนโรไวรัสมากกว่าเทคนิค RT-PCR (43, 44) นอกจากนี้ real-time PCR ยังใช้เวลาน้อยลงเพราะสามารถยืนยัน genogroups ของเชื้อโนโรไวรัสได้โดยการแยกจับกับ probe หรือถ้าต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะต้อง sequencing เหมือนกับเทคนิค RT-PCR

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนก็ถูกนำมาใช้เพื่อระบุเชื้อโนโรไวรัสในช่วงเริ่มแรก แต่ให้การระบุที่แน่ชัดเพียง <25% เมื่อเทียบกับ RT-PCR นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสมกับการตรวจสอบเชื้อโนโรไวรัส ที่สามารถทำการทดสอบได้อย่างรวดเร็ว เช่น enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) แต่น่าเสียดายที่แม้จะมีการปรับปรุงทั้งความไวและความจำเพาะของการตรวจสอบที่มีต่อเชื้อโนโรไวรัส ความไวของการตรวจวินิจฉัยเหล่านี้ก็ยังคงด้อยกว่าเทคนิค RT-PCR (45)

### การป้องกันและการรักษา

การป้องกันการแพร่ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่ดีที่สุดคือ การล้างมือด้วยสบู่และน้ำสะอาด อาจเพิ่มเติมด้วยการใช้แอลกอฮอล์ ( $\geq 62\%$  ethanol) ในการเช็ดทำความสะอาดพื้นผิว เนื่องจากโนโรไวรัสไม่มีเยื่อหุ้มที่เป็นไขมัน พื้นผิวที่มีเชื้อไวรัสเกาะติดอยู่ควรเช็ดทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อความเข้มข้น 1.5-7.5% (46) สำหรับการรักษาคนไข้ที่เกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส นั้น ยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะ เนื่องจากเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ (cell culture) ทำให้เป็นตัวขัดขวางการพัฒนาสารต้านไวรัส (antiviral agents) แต่วิธีหลักที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน คือการให้สารน้ำทางปาก (Oral rehydration) และยาชนิดต่างๆ ที่ช่วยรักษาอาการที่เกิดจากการติดเชื้อชนิดนี้ เช่น Bismuth subsalicylate เป็นยาป้องกันอาการท้องเสียเฉียบพลันที่เกิดจากการติดเชื้อ หรือ loperamide เพื่อช่วยบรรเทาอาการท้องเสีย เป็นต้น (10)

### ระบาดวิทยาของเชื้อและการเกิด recombination

เชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหาร (foodborne disease) ที่แพร่ระบาดไปทั่วโลก การระบาดของเชื่อนี้พบได้ในช่วงฤดูหนาวของทุกๆปี ซึ่งพบได้ในทุกช่วงอายุ โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี สายพันธุ์ GI, GII และ GIV เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา GII.4 ถือได้ว่าเป็นสายพันธุ์หลักที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลันทั่วโลก ในประเทศไทยอัตราการระบาดของที่พบในเด็กแรกเกิดและเด็กเล็กอยู่ในช่วงร้อยละ 8.1-14.1 และในทุกช่วงอายุมีอัตราการระบาดประมาณร้อยละ 6.5 นอกจากนี้ อาจจะมีการระบาดของสายพันธุ์ GI และ GII ร่วมกัน (co-circulate) ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาและลักษณะภูมิประเทศที่พบ (14-17)

จีโนมของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงบ่อย โดยเกิดจากการมิวเทชัน (mutation) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรม (recombination) ซึ่งส่งผลต่อวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสนี้ โดยข้อมูลการเกิดมิวเทชันยังไม่ชัดเจนนัก แต่การเกิด recombination ในอาร์เอ็นเอของฮิวแมนโนโรไวรัสมีอัตราการเกิดที่สูง ส่งผลกระทบต่อการจัดกลุ่มวิวัฒนาการ (phylogenetic) เป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดใหญ่ในจีโนมของไวรัส และยังเพิ่มความรุนแรงของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังสร้างความสับสนให้กับการศึกษาทางระบาดวิทยาโมเลกุลและมีผลกระทบที่สำคัญใน

การออกแบบวัคซีนเพื่อป้องกันไวรัสอีกด้วย การระบุว่าการเกิด recombinant ขึ้นสายพันธุ์หนึ่งนั้น สามารถกำหนดจากสองกลุ่มของสายพันธุ์ที่แตกต่างภายในจีโนม (โดยปกติแล้วจะระบุจากทั้งยีน VP1 และ RdRp) เมื่อสองกลุ่มนี้ระบุให้จีโนมที่แตกต่างกันจากจีโนมเดียวกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์กลุ่มวิวัฒนาการของไวรัสต่อไปได้ (19)

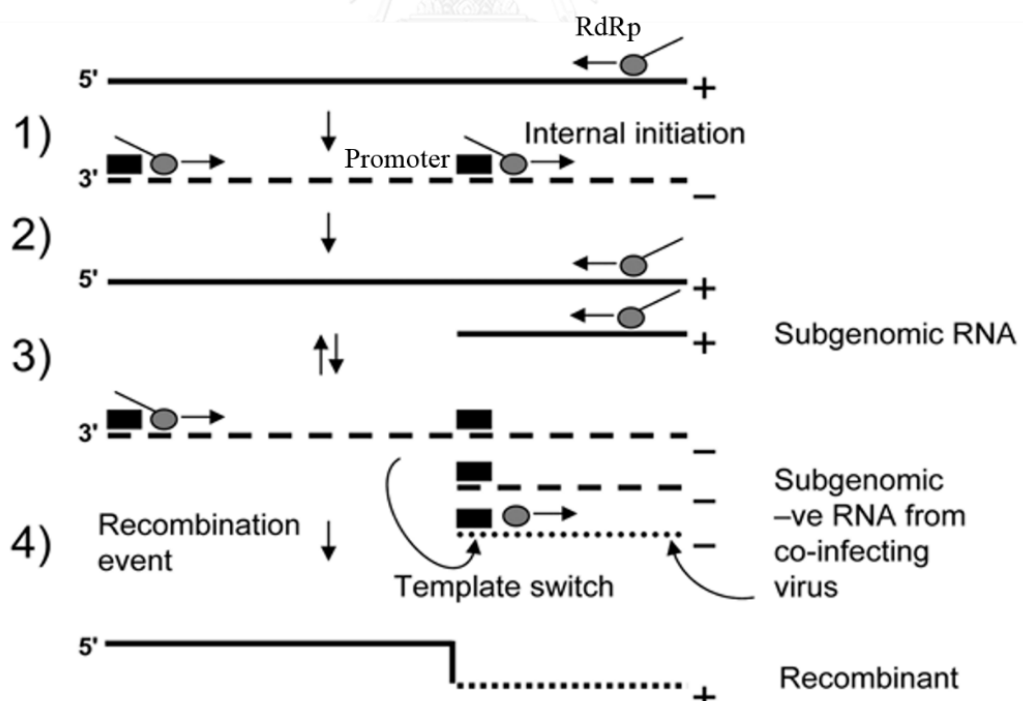
ในบางการศึกษา จะทำการหาจีโนมที่ของเชื้อโนโรไวรัส จากบริเวณยีน RdRp บน ORF1 เท่านั้น เพราะเชื่อว่าที่บริเวณนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แตกต่าง (conserved) ไปจากจีโนมของ NVL มากที่สุด (47) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาต่อมาพบว่า สามารถแยกแยะสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ดีขึ้น โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในยีน VP1 เนื่องจากพบว่า ที่บริเวณปลาย 5' ของ VP1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างคล้ายคลึง (conserved) กับทั้งใน GI และ GII ของ NVL มากกว่า 80% (48) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนที่บริเวณ VP1 จะทำให้ primer สามารถตรวจแยกสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ดีมากกว่าบริเวณยีน RdRp

กลไกการเกิด recombination ของเชื้อโนโรไวรัสที่เกิดขึ้นในรอบที่ 2 ของการถอดรหัสไวรัส (replication) โดยเกิดเมื่อ RdRp เริ่มต้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายบวกจากปลาย 3' ของอาร์เอ็นเอสายลบเส้นที่สมบูรณ์ (full-length negative strand) และต้องหยุดการสังเคราะห์ที่บริเวณ promoter ของ subgenomic ในบริเวณ stem loop ของส่วนที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ทำให้เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพการทำงานไป จึงเกิดการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอต้นแบบที่จะสังเคราะห์ (template switch) เป็น subgenomic สายลบของไวรัสอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีการติดเชื้อร่วมกัน (co-infecting virus) ทำให้เกิดเป็นไวรัสที่มีอาร์เอ็นเอผสมกันระหว่าง 2 สายพันธุ์ โดยการเกิด recombination นั้นเป็นการได้รับส่วนของ ORF2 หรือ ORF3 มาจากอีกสายพันธุ์หนึ่ง ดังรูปที่ 6 (19)

จากการศึกษาพบว่าบริเวณที่มีการเกิด recombination ของฮิวแมนโนโรไวรัส สามารถพบได้ 3 บริเวณ บริเวณแรกคือส่วนที่มีการทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 บริเวณที่ 2 อยู่บน ORF2 และ บริเวณที่ 3 เป็นส่วนที่มีการทับซ้อนกันของ ORF2 และ ORF3 โดยบริเวณที่ 2 และ 3 จะพบไม่มากนัก จะพบที่บริเวณแรกเป็นส่วนใหญ่ (49) ซึ่งบริเวณที่มีการทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ถือเป็นบริเวณที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นบริเวณที่แยกออกจากกันของโปรตีน RdRp ที่เป็นโปรตีนที่เริ่มต้นการถอดรหัสของอาร์เอ็นเอไวรัสและบริเวณโปรตีนโครงสร้าง ดังนั้นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกันที่รอยต่อนี้จึงเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงที่เปลือก (capsid) ของไวรัส (19) แต่อย่างไรก็ตาม การระบุจีโนมที่โดยอาศัยเพียงยีน RdRp หรือ VP1 อย่างเดียวนั้น ไม่สามารถระบุการ recombination ได้ เนื่องจากโดยปกติแล้วการเกิด recombination นั้น มักจะเกิดขึ้นระหว่างยีน RdRp และ VP1 ซึ่ง

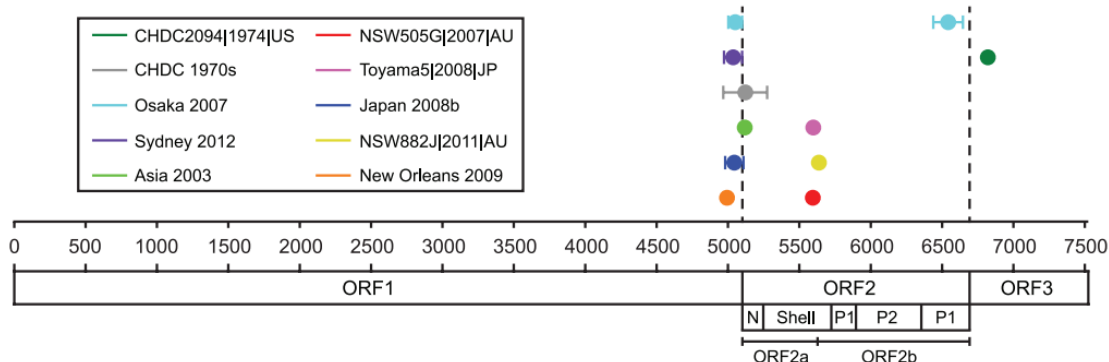
เป็นบริเวณที่ใกล้เคียงหรืออยู่ภายในช่วงที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ดังนั้น การตรวจพบ recombination อาจจะถูกมองข้ามหรือไม่ค้นพบได้

มีรายงานยืนยันเกี่ยวกับผลกระทบของการเกิด recombination ว่า การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อยบริเวณที่เปลือกภายนอก (capsid region) สามารถส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อเป็นอย่างมาก จากการศึกษาใน murine norovirus (MNV) พบว่า การแทนที่ของกรดอะมิโนจาก lysine เป็น glutamate ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก AAG เป็น GAG ที่ตำแหน่งอะมิโนที่ 296 (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 5941) บนยีน VP1 นั้น มีผลทำให้หนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อชนิดนี้หลังจาก 7 วัน ตายทั้งหมด โดยการแทนที่ของกรดอะมิโนนี้เกิดขึ้นที่บริเวณ P2 subdomain ที่อยู่บน VP1 จึงทำให้มีผลต่อการจับกันของ receptor หรือความจำเพาะในการจับกัน ส่วนการศึกษาโครงสร้างผลึกของ capsid MNV ยังไม่สามารถทำได้ เป็นเรื่องที่ยากต่อการตรวจสอบการแทนที่ของโมเลกุล lysine/glutamate (50) การเปลี่ยนแปลงทางผิวโครงสร้างส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีและขนาดของ side chain และไปช่วยลดความสามารถต่อการจับของแอนติบอดี ทำให้เป็นประโยชน์ต่อไวรัสในการแพร่กระจายในมนุษย์ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อสายพันธุ์เดิม (51)



รูปที่ 6 : กลไกพื้นฐานการเกิด recombination ของ norovirus

ที่มา : Bull RA *et al*, 2005 (19)



รูปที่ 7 : ตำแหน่งที่มีการเกิด recombination ของ norovirus GII.4

ที่มา : Eden JS *et al*, 2013 (49)

ตัวอย่างการเกิด recombination ที่พบในหลายๆประเทศ เช่น พบการเกิด recombination ชนิดใหม่ระหว่าง GII.12/GII.13 ในปี 2013 ประเทศเกาหลีใต้ เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 5048 ซึ่งอยู่บน ORF1 ที่ใกล้เคียงกับบริเวณที่มีการทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ซึ่งโดยปกติแล้ว genotype GII.12 และ GII.13 เป็นสายพันธุ์ที่พบน้อยและยังไม่มีผู้ศึกษามากนัก ดังนั้นการค้นพบนี้จึงมีประโยชน์ต่อการให้ข้อมูลที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องการรวมตัวและการกลายพันธุ์ในจีโนมของเชื้อโนโรไวรัส ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม (23) ในประเทศจีนได้ทำการศึกษาการระบาดของเชื้ออหิวาต์โนโรไวรัสตั้งแต่ปี 2008-2012 พบการเกิด recombination ทั้งหมด 3 ครั้ง คือ ระหว่างสายพันธุ์ GI.2/GI.6 1 ครั้ง ในปี 2008 ซึ่งเป็นการเกิด recombination ใน GI ที่พบได้บ่อยในประเทศจีนและในอีกหลายๆประเทศ และอีก 2 ครั้ง ในปี 2012 ระหว่างสายพันธุ์ GII.e/GII.4 Sydney 2012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ถูกรายงานขึ้นเป็นครั้งแรกและแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็วในประเทศจีน ซึ่งตำแหน่งที่เกิด recombination นั้น อยู่ใกล้เคียงกับบริเวณที่มีการทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 (52) อีกหนึ่งรายงานที่พบการเกิด recombination ในปี 2013 ที่ประเทศอิตาลี พบการเกิด recombination ของสายพันธุ์ GII.16/GII.13 มากถึง 4 ครั้ง ซึ่งสายพันธุ์นี้เคยระบาดขึ้นในอิตาลีและเยอรมันนีมาก่อน นอกจากนี้ พบการเกิด recombination ระหว่างสายพันธุ์ GII.16/GII.3 อีก 2 ครั้ง ซึ่งเป็นการพบการระบาดครั้งแรกในยุโรป ซึ่งสายพันธุ์นี้พบว่ามีระบาดมากในประเทศอิตาลีและบังคลาเทศตั้งแต่ปี 2011-2012 โดยทั้ง 2 รูปแบบนี้เป็นการเกิด recombination ที่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 5,087 และ 5,089 ที่อยู่ภายในตำแหน่งที่มีการทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 (53) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีของร่างกายที่มีต่อเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสนั้นมีระยะเวลาที่สั้น กระบวนการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงบนโปรตีนโครงสร้าง จะทำให้ไวรัสสามารถกลับมาติดเชื้อในเซลล์ร่างกายได้อีกครั้งและสามารถหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกัน ภายในร่างกายได้ ดังนั้นจึงมีข้อจำกัดทางสายพันธุ์ของเชื้อ คือ ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถป้องกัน การติดเชื้อที่ genogroup และ genotype ต่างกันได้ ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของ genotype ของเชื้อเพื่อเตรียมวิธีการป้องกันให้ทันต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น (30)

ถึงแม้ว่าจะมีการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางสายพันธุ์ที่เกิดจากการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษานี้ในประเทศไทยนั้นยังมีน้อย ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาความหลากหลาย และการเปลี่ยนแปลงทางสายพันธุ์ที่เกิดจากการ recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย เพื่อที่จะได้นำข้อมูลส่วนนี้มาใช้เป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

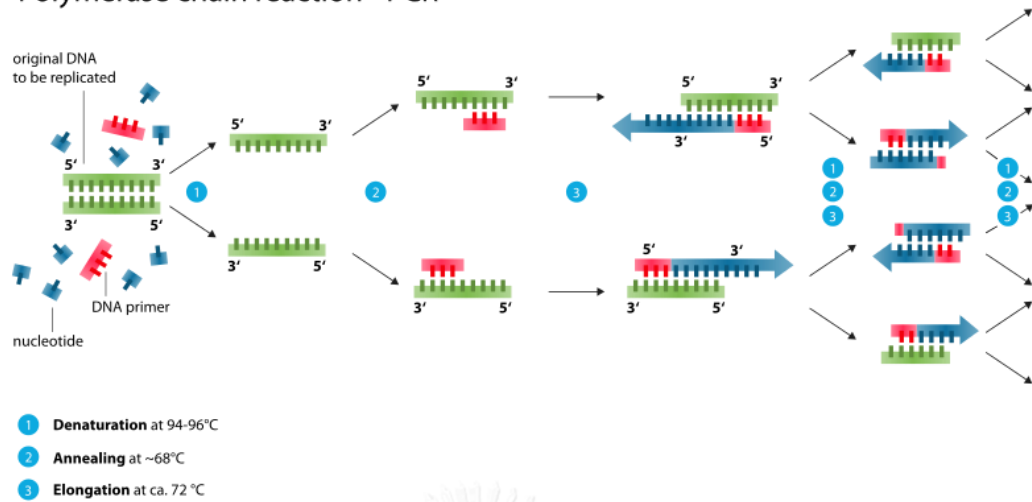
### หลักการและเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

กระบวนการที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม เรียกว่า polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งในปัจจุบันเป็นการเตรียมส่วนผสมทั้งหมดในหลอดทดลอง ส่วนประกอบหลักๆ คือ ดีเอ็นเอ ตั้งต้น 2 สายจับกัน, ไพริเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวสายสั้นๆ 2 สาย ที่สามารถไปจับปลายของ ดีเอ็นเอตั้งต้นแต่ละสาย, DNA polymerase เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจาก primer โดยการคัดลอกจากดีเอ็นเอตั้งต้น, dNTPs เป็นหน่วยย่อยของดีเอ็นเอนำไปต่อโดย DNA polymerase เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ หลังจากนั้นนำส่วนผสมไปควบคุมอุณหภูมิและเวลาเป็นรอบๆ โดยใช้เครื่องควบคุมอัตโนมัติ โดยขั้นตอนหลักๆ จะมี 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturing คือ เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ หรือ Double Strand DNA ออกจากกัน ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส จนกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว หรือ Single Strand DNA
2. Annealing คือ เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เพื่อให้ไพริเมอร์ที่ใส่ลงไปในระบบ เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (Complementary base pair) ระหว่างไพริเมอร์ กับ Template DNA โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 45-60 องศาเซลเซียส
3. Extension คือ เป็นขั้นตอนการทำงานของ DNA polymerase ที่ใส่ลงไปในระบบ เพื่อให้ เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ หรือ เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอให้มากขึ้น โดยอุณหภูมิที่ ใช้อยู่ในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส



## Polymerase chain reaction - PCR



รูปที่ 8 : ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR

ที่มา : [http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ case-control study ซึ่งได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) โครงการวิจัยหมายเลข (IRB No.) 455/57

### ประชากรที่ศึกษา

#### 1. กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ คือ อุจจาระของผู้ป่วยซึ่งป่วยด้วยโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และส่งมาตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค รวมถึงตัวอย่างแช่แข็งที่เหลือเก็บจากงานตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส โดยกลุ่มตัวอย่างมาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, โรงพยาบาลชุมแพ และโรงพยาบาลในเครือข่ายประกอบ ตั้งแต่ปี 2009 ถึงปี 2014 โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้จะถูกเก็บในรูปแบบนิรนามเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายแก่ตัวผู้ป่วย

#### 2. จำนวนประชากร (population study)

ตัวอย่างอุจจาระที่ใช้ทำการศึกษา คัดเลือกมาจากผู้ป่วยซึ่งป่วยด้วยโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และส่งมาตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค ตั้งแต่ปี 2009-2014 ซึ่งได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส เป็นจำนวนประชากรรวม 150 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่เกิด recombination คำนวณจากสมการ Cochran's samples size formula

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

โดยที่  $n$  คือ จำนวนตัวอย่าง

$Z$  คือ ค่า  $Z$  score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่าเท่ากับ 1.96

$p$  คือ อัตราการเกิด recombination ของเชื้อ HNoV จากการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.625% โดยเฉลี่ย (54)

$q$  คือ  $1-p$

$d$  คือ ค่าความคลาดเคลื่อน เท่ากับ 0.05

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.00625) (1 - 0.00625)}{(5/100)^2} = 9.54$$

เมื่อแทนค่าต่างๆ ในสมการแล้วจะได้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนตัวอย่างที่เกิด recombination ที่น้อยที่สุดที่จะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้โดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 5



## วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

### อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

1. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
2. Electrophoresis chamber set (BioRAD, USA)
3. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l, 2.0  $\mu$ l (Axygen, USA)
4. Microwave oven (Sharp, Japan)
5. Parafilm (American nation, USA)
6. Freezer -70° C (Sanyo, Japan)
7. Freezer -20° C (Panasonic, Japan)
8. Autoclave (Harvey, USA)
9. Pipette tip ขนาด 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1,000  $\mu$ l (Axygen, USA)
10. Vortex mixer (Scientific industry, USA)
11. Master cycler (Eppendorf, Germany)
12. Block heater (Lab Line instrument, USA)
13. Stirring-magnetic bar (Thermolyne, USA)
14. Gel Doc (BioRAD, USA)
15. Reagent Bottle 100 mL (Duran, USA)

### สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลอง

#### 1) สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1. 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS)

#### 2) สารเคมีที่ใช้สกัด RNA

โดยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Ribospin™ vRD II Viral Nucleic Acid Extraction kit (GeneAll, Songpa, Korea)

1. Buffer NVL
2. Buffer RB1
3. Buffer RBW
4. Buffer RNW
5. Nuclease-free water
6. Carrier RNA

**3) สารเคมีสำหรับการเปลี่ยน RNA ให้กลายเป็น complementary DNA**

1. Random hexamer (Promega, USA)
2. dNTP (deoxynucleotide triphosphate) (Promega, USA)
3. MMLV Reverse transcriptase (Promega, USA)
4. RNase Inhibitor (Promega, USA)

**4) สารเคมีที่ใช้เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วย PCR**

1. Master mix (5PRIME, Germany)
2. Distilled water
3. PCR primer
4. DNA template

**5) สารเคมีสำหรับการทำ electrophoresis**

1. DNA Marker (Promega, USA)
2. Agarose Gel (Promega, USA)
3. 1X TBE buffer
4. Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

## 6) สารเคมีสำหรับการ Purify DNA

1. Expin™ Gene All purified DNA kit (GeneAll Biotechnology, Korea)
2. Isopropanol (Sigma, Singapore)
3. Ethanol

### โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

#### 1. BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5)

เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการจัดเรียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวนมาก เพื่อให้เกิดความ เป็นระเบียบและใช้วิเคราะห์ข้อมูลได้ง่ายมากขึ้น รวมทั้งการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์เป็นโปรตีนด้วย

#### 2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

เป็นอัลกอริทึมที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบตำแหน่ง ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนกับสายพันธุ์ที่มีความ คล้ายคลึงกันที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เพื่อใช้ในการระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจนให้กับนักวิจัย

#### 3. Chromas Sequence Chromatogram Viewer (version 2.01)

เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากการ sequencing โดยวิเคราะห์ผล จาก chromatogram

#### 4. DNASTAR Seqman™ II (version 6.00)

เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการ assembly ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 2 ข้อมูล เข้าด้วยกัน รวมถึง ยังใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยดูข้อมูลจาก chromatogram

#### 5. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 6.06)

เป็นซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการจัดเรียงข้อมูลและสร้างออกมาในรูปแบบ phylogenetic tree เพื่อ ใช้วิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบวิวัฒนาการของยีนและจีโนม โดยกำหนดค่า bootstrap ในการทดลองซ้ำ เท่ากับ 1000 ครั้ง

## 6. Simplot (version 3.5.1)

เป็นซอฟต์แวร์ที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบวิวัฒนาการ โดยการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์ในฐานข้อมูล โดยสามารถใช้ในการหาตำแหน่งที่มีการเกิด recombination ระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์ได้ เพื่อใช้ยืนยันการวิวัฒนาการแบบ recombination

## 7. Maximum chi-squared test ของ Maynard Smith (1992)

(<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/CSE/test/>)

เป็นอัลกอริทึมที่ใช้ทดสอบค่าทางสถิติหลักการ Maximum chi-squared เพื่อยืนยันจุดตัดที่เกิด recombination ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ



## วิธีดำเนินงานวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่าง (Collecting sample)

เก็บตัวอย่างที่เป็นอุจจาระ (stool) ลง 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS) 3 ml ผสมให้เข้ากันโดย vortex 15 วินาที จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดเก็บ supernatant ลง micro tube 1.5 ml ให้ได้ประมาณ 2 หลอด แล้วเก็บรักษา สภาพตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ  $-70^{\circ}\text{C}$

### 2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA extraction)

ในการวิจัยนี้ได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Ribospin vRD II ของบริษัท GeneAll ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

- เติมน้ำ 300  $\mu\text{l}$  ของ buffer NVL และ 7  $\mu\text{l}$  ของ carrier RNA ลงในหลอด
- เติมน้ำละลายตัวอย่าง 100  $\mu\text{l}$  และนำไป vortex
- Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- เติมน้ำ 350  $\mu\text{l}$  ของ buffer RB1 แล้วนำไป Vortex
- ย้ายสารละลายผสม 750  $\mu\text{l}$  ลงใน spin column
- Centrifuge  $\geq 10,000\times g$  เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนของ filtrate
- เติมน้ำ 500  $\mu\text{l}$  ของ buffer RBW
- Centrifuge  $\geq 10,000\times g$  เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนของ filtrate
- เติมน้ำ 500  $\mu\text{l}$  ของ buffer RNW
- Centrifuge  $\geq 10,000\times g$  เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนของ filtrate
- Centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- ย้าย spin column มาใส่ 1.5 ml microcentrifuge tube
- เติมน้ำ 40  $\mu\text{l}$  RNase-free water
- ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที
- Centrifuge  $\geq 10,000\times g$  เป็นเวลา 1 นาที



- เก็บ RNA ที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ  $-70^{\circ}\text{C}$

### 3. การทำ Reverse transcription

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

- นำ RNA 5  $\mu\text{l}$  มาผสมกับ DEPC 5  $\mu\text{l}$  และ Random hexamer 1  $\mu\text{l}$  ให้เข้ากัน
- บ่มที่อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงปั่นตก
- เติมนสารละลาย Improm II ปริมาตร 15  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน
- Incubate ที่อุณหภูมิห้อง  $25^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที
- Incubate ที่อุณหภูมิ  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- Incubate ที่อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  อีก 15 นาที
- นำ cDNA ที่ได้ไปทดลองต่อไป

### 4. การตรวจหาการติดเชื้อ HNoV ด้วยวิธี nested PCR บริเวณยีน RdRp

นำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี nested Polymerase Chain Reaction เป็นการทำให้ PCR 2 รอบ ซึ่งสารเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยาครั้งที่ 1 ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ส่วนผสมและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ /tube)
2X Master mix (5 PRIME)	6.25
100%DMSO	0.70
DEPC treated water	3.05
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.25
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.25
cDNA	2
Total volume	12.5

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน RdRp สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 1

Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')
F4895	Forward	GAT TTA GGT GAC ACT ATA GYD STT YTC HTT YTA YGG KGA YGA TGA
R5591	Reverse	AWT CGG GCA RGA GAT YGC GAT C

หมายเหตุ: D= A/G/T, S = C/G, Y = C/T, H= A/C/T, K= G/T, W= A/T

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1

PCR cycle	อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ )	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
Pre-denaturation	94	3	
Denaturation	94	30 sec	} 40 รอบ
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	1.5	
Final-extension	72	10	

จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วนของยีน RdRp อีกครั้ง ซึ่งสารเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 และตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2

สารเคมี	ปริมาณ ( $\mu\text{l}/\text{tube}$ )
2X Master mix (5 PRIME)	6.25
100%DMSO	0.70
DEPC treated water	3.05
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.25
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.25
cDNA	2
Total volume	12.5

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน RdRp สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 2

Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')
F4895	Forward	GAT TTA GGT GAC ACT ATA GYD STT YTC HTT YTA YGG KGA YGA TGA
R5393	Reverse	GCC TGY ACA AAR TTA TTS ATT ATC CA

หมายเหตุ: D= A/G/T, S = C/G, Y = C/T, H= A/C/T, K= G/T

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Nested-PCR ครั้งที่ 2

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
Pre-denaturation	94	3	
Denaturation	94	30 sec	} 40 รอบ
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	1.5	
Final-extension	72	10	

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกนำมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วจึงนำไปตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการโดยเปรียบเทียบกับ 100 bp ladder DNA (DNA marker) ผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อไป สำหรับขนาดโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ PCR จะอยู่ที่ 500 นิวคลีโอไทด์

#### 5. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HNoV ด้วยวิธี nested PCR บริเวณยีน VP1

นำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี nested Polymerase Chain Reaction เป็นการทำให้ PCR 2 รอบ ซึ่งสารเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยาคั้งที่ 1 ได้แสดงไว้ดังในตารางที่ 8 และตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ส่วนผสมและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1

สารเคมี	ปริมาณ (µl /tube)
2X Master mix (5 PRIME)	5
DEPC treated water	2.5
Forward primer (10 µM)	0.25
Reverse primer (10 µM)	0.25
cDNA	2
Total volume	10

ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน VP1 สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 1

Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')
NV2oF2	Forward	GGA GGG CGA TCG CAA TC
NV2oR	Reverse	GTR AAC GCR TTY CCM GC

หมายเหตุ: R= A/G, Y = C/T, M= A/C

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
Pre-denaturation	94	3	
Denaturation	94	30 sec	} 40 รอบ
Annealing	60	30 sec	
Extension	72	1.5	
Final-extension	72	10	

จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วนของยีน VP1 อีกครั้ง ซึ่งสารเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 และตารางที่

ตารางที่ 11 ส่วนผสมและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu\text{L}/\text{tube}$ )
2X Master mix (5 PRIME)	5
DEPC treated water	2.75
Dye	1.25
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.25
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.25
cDNA	0.5
Total volume	10.0

ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บริเวณยีน VP1 สำหรับการทำให้ PCR ครั้งที่ 2

Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')
G2F3	Forward	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG A
G2SKR	Reverse	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT

หมายเหตุ: R = A/G, H = A/C/T, N = A/C/G/T

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) ในสถานะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Nested-PCR ครั้งที่ 2

PCR cycle	อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ )	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
Pre-denaturation	94	3	
Denaturation	94	30 sec	} 40 รอบ
Annealing	60	30 sec	
Extension	72	1.5	
Final-extension	72	10	

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกนำมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วจึงนำไปตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการโดยเปรียบเทียบกับ 100 bp ladder DNA (DNA marker) ผ่านเครื่องฉายรังสี อัลตราไวโอเล็ตต่อไป สำหรับขนาดโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ PCR จะอยู่ที่ 310 นิวคลีโอไทด์

## 6. การตรวจสอบการเกิด recombination

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าช่วงที่มีการเกิด recombination อยู่ในบริเวณที่มี overlap กันของ ORF1 และ ORF2 (ระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่ 5,085-5,100) ดังนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวในช่วง 4,279-5,412 bp มีลำดับยาว 1,130 bp ด้วย primer ทั้งหมด 3 คู่ ซึ่งสารเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แสดงไว้ดังในตารางที่ 14 และตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ส่วนผสมและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ /tube)
2X Master mix (5 PRIME)	10
DEPC treated water	7
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5
cDNA	2
Total volume	20

ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR ครั้งที่ 1

Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')
JV12y	Forward	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA
R5591	Reverse	AWT CGG GCA RGA GAT YGC GAT C
F4895	Forward	GAT TTA GGT GAC ACT ATA GYD STT YTC HTT YTA YGG KGA YGA TGA
G2SKR	Reverse	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT
NV2oF2	Forward	GGA GGG CGA TCG CAA TC
NV2oR	Reverse	GTR AAC GCR TTY CCM GC

หมายเหตุ: R= A/G, Y = C/T, W= A/T, D=A/G/T, S=C/G, H= A/C/T, K= G/T, M= A/C

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
Pre-denaturation	94	3	
Denaturation	94	30 sec	} 40 รอบ
Annealing	50	30 sec	
Extension	72	1	
Final-extension	72	10	

จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วนของยีน VP1 อีกครั้ง ซึ่งสารเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 17 และตารางที่



ตารางที่ 17 ส่วนผสมและปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2

สารเคมี	ปริมาตร ( $\mu\text{l}/\text{tube}$ )
2X Master mix (5 PRIME)	10
DEPC treated water	4.5
Dye	2.5
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5
cDNA	2
Total volume	20

ตารางที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR ครั้งที่ 2

Primer's Name	Type	Sequence (5'--->3')
JV12y	Forward	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA
R12	Reverse	CTN ACR ATY TCA TCR TCM CC GAT
F4895	Forward	GAT TTA GGT GAC ACT ATA GYD STT YTC HTT YTA YGG KGA YGA TGA
R5591	Reverse	AWT CGG GCA RGA GAT YGC GAT C
NV2oF2	Forward	GGA GGG CGA TCG CAA TC
G2SKR	Reverse	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT

หมายเหตุ: R= A/G, Y = C/T, W= A/T, D=A/G/T, S=C/G, H= A/C/T, K= G/T, M= A/C

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมด ใส่ลงในเครื่อง Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) ในสภาวะอุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2

PCR cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	หมายเหตุ
Pre-denaturation	94	3	
Denaturation	94	30 sec	} 40 รอบ
Annealing	50	30 sec	
Extension	72	1	
Final-extension	72	10	

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกนำมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วจึงนำไปตรวจหาแถบของ DNA ที่ต้องการโดยเปรียบเทียบกับ 100 bp ladder DNA (DNA marker) ผ่านเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อไป สำหรับขนาดโดยประมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 2 จะอยู่ที่ 355, 493 และ 317 นิวคลีโอไทด์

### 7. การสกัดแยก PCR product ให้บริสุทธิ์

หลังจากทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยดูผ่านแสง UV แล้วจึงทำการตัด gel ในที่มีแถบของ DNA ที่ปรากฏในส่วนที่ต้องการ และทำให้บริสุทธิ์โดยชุด GeneAll Gel/PCR DNA fragment extraction kit โดยมีขั้นตอนดังนี้

- เติมนสารละลาย GB buffer 500  $\mu$ l ลงใน microcentrifuge tube ที่มี gel อยู่ จากนั้น incubate ที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที
- ดูด gel ที่ละลายทั้งหมดลงใน SV column แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็น เวลา 1 นาที
- เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม NW buffer 700  $\mu$ l แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- นำ column filter ใส่ micro centrifuge tube จากนั้นเติม elution buffer ประมาณ 50  $\mu$ l แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ column แห้ง

- จากนั้น centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีผลิตภัณท์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วตกลงไปใน microcentrifuge tube

## 8. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตที่ได้จำนวน 5  $\mu$ l มาทำการวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าโดยวิธี gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อตรวจสอบว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการหรือไม่ เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วจึงส่งไปทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท First Base laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเป็น sequencing primer แล้วจึงทำการอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite เพื่อทำการตรวจสอบและแก้ไขผลที่ได้ต่อไป

## 9. การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

สำหรับการรวบรวมข้อมูลผลการวิจัยทั้งหมด ผู้วิจัยได้บันทึกข้อมูลของผู้ป่วย ขั้นตอนการทำการวิจัยทุกขั้นตอนและ ผลการทำวิจัยโดยการบันทึกข้อมูลลง Data sheet เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป และทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัสที่จำแนกได้ลงในคอมพิวเตอร์ โดยเก็บเป็น file ซึ่งมีผลจากการวิเคราะห์ sequencing

## 10. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HNoV โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree analysis) ด้วยโปรแกรม ได้แก่ BioEdit, BLAST, Seqman, MEGA 6.0 และ SimPlot โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ใช้โปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank ว่าเป็นเชื้อHNoV หรือไม่ และจัดอยู่ในกลุ่มใด
- ทำการเปรียบเทียบความเหมือนความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HNoV สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BioEdit ในการทำการจัดเรียง (Alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว
- ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 เพื่อจำแนกว่า HNoV ที่ทำการศึกษาจัดอยู่ในสายพันธุ์ใด และมีรูปแบบของวิวัฒนาการเป็นอย่างไร มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่มีรายงานในต่างประเทศหรือไม่ อย่างไร
- นำข้อมูลข้างต้นที่ได้ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์โดยเทียบกับข้อมูลสายพันธุ์ที่ได้จากยีน RdRp

- วิเคราะห์การเกิด recombination ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ยีน RdRp ถึง VP1 โดยใช้โปรแกรม SimPlot และ maximum chi-square เพื่อตรวจสอบและยืนยันบริเวณที่เกิด recombination

### 11. การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากบางส่วนของยีน RdRp และ VP1 ที่ได้จากการทดลองนี้ ถูกเผยแพร่บนฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม sequin



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การหาจีโนไทป์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจากยีน VP1 และวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ด้วยการสร้าง phylogenetic tree

จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยระบบทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งเป็นเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ตั้งแต่ปี 2009-2014 จำนวน 1,674 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย 1,252 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลในชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และ 422 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร สามารถตรวจพบการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุมาจากเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้ โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยยีน RdRp ด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งแบ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น 124 ตัวอย่าง และ กรุงเทพมหานคร 26 ตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจำนวน 150 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวก ด้วยเทคนิค RT-PCR บริเวณยีน VP1 พบว่า 104 ตัวอย่าง ที่สามารถทำการหาจีโนไทป์ได้สำเร็จ โดยแบ่งเป็นจำนวนตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น 84 ตัวอย่าง และกรุงเทพมหานคร 20 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 20 และตารางที่ 21

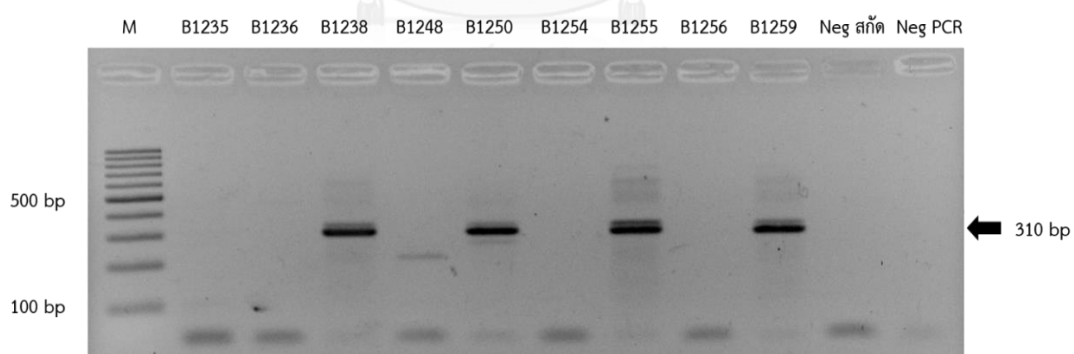
ตารางที่ 20 ตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยระบบทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน ตั้งแต่ปี 2009-2014

Province	No.	RdRp (% detect)	VP1 (% detect)
Bangkok	422	26	20
Khon Kaen	1,252	124	84
total	1,674	150 (8.96%)	104 (6.06%)

ตารางที่ 21 ระบาดวิทยาของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2009-2014

Year	No. of sample	No. of HNoV positive	
		RdRp (%)	VP1 (%)
2009	355	44 (12.4)	35 (9.86)
2010	271	16 (5.90)	10 (3.69)
2011	315	32 (10.16)	15 (4.76)
2012	403	26 (6.45)	17 (4.22)
2013	161	15 (9.32)	13 (8.07)
2014	169	17 (10.06)	14 (8.28)
total	1,674	150 (8.96)	104 (6.06)

ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจากการเพิ่มจำนวนบริเวณยีน VP1 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 310 bp บน 2% agarose gel ดังปรากฏในรูปที่ 9



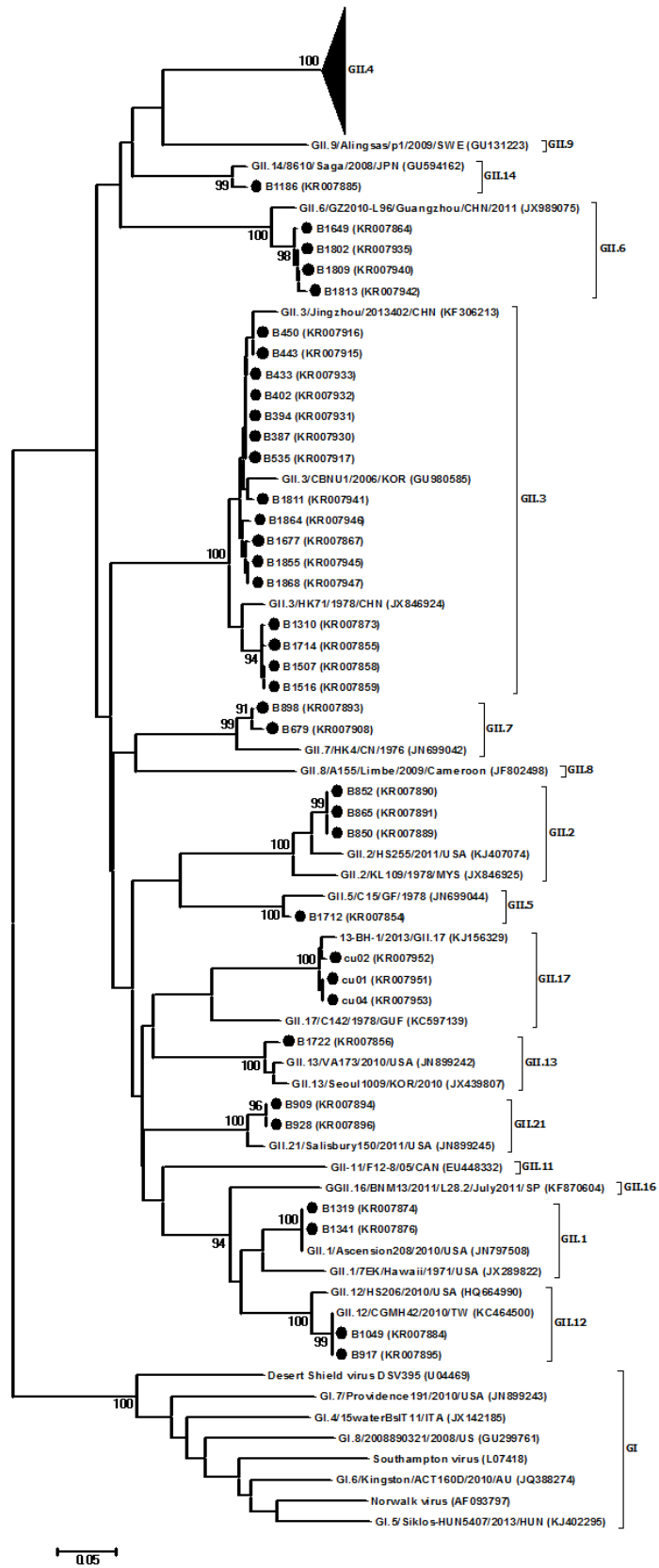
รูปที่ 9 : ตัวอย่างผล RT-PCR ยีน VP1 ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส

หมายเหตุ M คือ 100 bp DNA Ladder  
Neg คือ negative control

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยนี้จะถูกเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank accession numbers KR007851-KR007960 เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาและการอ้างอิงของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส มาทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบกับ reference strains จากฐานข้อมูลใน GenBank ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจากการศึกษาครั้งนี้ได้ ดังรูปที่ 10





รูปที่ 10 : phylogenetic tree ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน VP1



ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 104 ตัวอย่าง กับ reference strains ในฐานข้อมูล ดัง phylogenetic tree พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการทดลองถูกจัดอยู่ใน genogroup 2 (GII) และสามารถจำแนกได้ทั้งหมด 12 genotype โดยสายพันธุ์ที่พบได้มากที่สุด คือ GII.4 คิดเป็น 64.4% (67 ตัวอย่าง) รองลงมาคือ GII.3 คิดเป็น 15.4% (16 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังสามารถพบจีโนไทป์อื่นๆ อีก คือ GII.1 (2 ตัวอย่าง), GII.2 (3 ตัวอย่าง), GII.5 (1 ตัวอย่าง), GII.6 (4 ตัวอย่าง), GII.7 (2 ตัวอย่าง), GII.12 (2 ตัวอย่าง), GII.13 (1 ตัวอย่าง), GII.14 (1 ตัวอย่าง), GII.17 (3 ตัวอย่าง) และ GII.21 (2 ตัวอย่าง) เมื่อคิดอัตราการระบาดของ GII.4 ในแต่ละปี พบว่า อัตราการระบาดตั้งแต่ปี 2009-2014 คิดเป็นร้อยละ 77.1, 30, 86.7, 66.7, 46.2 และ 61.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 22 จำนวนตัวอย่างของแต่ละสายพันธุ์ที่พบการระบาดตั้งแต่ปี 2009-2014

Year Genotype <sup>a</sup>	Year						Total No. (%)
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
GII.4	27	3	13	10	6	8	67 (64.4%)
GII.3	7	-	-	4	2	3	16 (15.4%)
GII.1	-	-	-	2	-	-	2 (1.9%)
GII.2	-	3	-	-	-	-	3 (2.9%)
GII.5	-	-	-	-	1	-	1 (0.96%)
GII.6	-	-	-	1	3	-	4 (3.85%)
GII.7	1	1	-	-	-	-	2 (1.9%)
GII.12	-	1	1	-	-	-	2 (1.9%)
GII.13	-	-	-	-	1	-	1 (0.96%)
GII.14	-	-	1	-	-	-	1 (0.96%)
GII.17 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	3	3 (2.9%)
GII.21	-	2	-	-	-	-	2 (1.9%)
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>104</b>

<sup>a</sup>Using the partial gene of VP1 for classification VP1

<sup>b</sup>Sample from HNoV outbreak

## 2. การเปรียบเทียบความชุกของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่พบในการศึกษานี้ เทียบกับประเทศอื่นๆ

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ คือ ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยในระบบทางเดินอาหารทั้งหมดตั้งแต่ปี 2009-2014 จำนวน 1,674 ราย สามารถทำการตรวจวัดการติดเชื้อจากฮิวแมนโนโรไวรัสโดยการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR ที่บริเวณส่วนต้นของยีน VP1 และสามารถจำแนกจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 104 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราความชุกร้อยละ 6.21 และเมื่อศึกษาข้อมูลการระบาดในประเทศอื่นๆ แล้วพบว่าอัตราความชุกของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสแตกต่างกันออกไปในแต่ละประเทศ เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกามีความชุกสูงถึงร้อยละ 50.62, ประเทศญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และออสเตรเลีย มีอัตราความชุกอยู่ในช่วงร้อยละ 18-25 และนอกจากนี้ยังพบอัตราความชุกน้อยกว่าในประเทศอื่นๆ คือ ร้อยละ 3 ในอินเดีย

เป็นที่สังเกตได้ว่าความชุกของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ใน ประเทศจีน สเปน และเบลเยียม คือ ประมาณร้อยละ 6-8

ตารางที่ 23 อัตราการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศต่างๆ

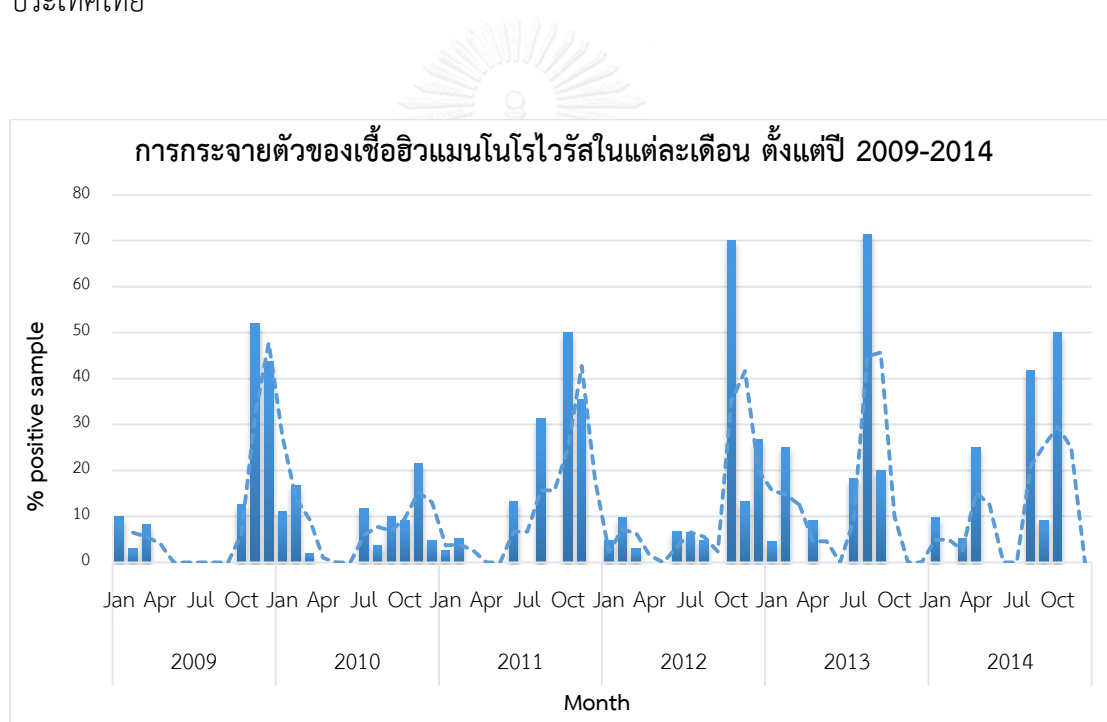
Country	% prevalence *	Year of study	ref.
Singapore	11.79 (125/1060)	2004-2011	(55)
Australia	25.74 (70/272)	2006-2008	(56)
Belgium <sup>a</sup>	7.64 (35/458)	2006-2010	(57)
India	3.13 (78/2495)	2007-2009	(58)
South Korea	18.03 (117/649)	2008-2010	(59)
Japan <sup>a</sup>	18.35 (80/436)	2009-2010	(60)
China	6.13 (42/685)	2009-2011	(61)
Spain	7.49 (317/4233)	2009-2012	(62)
China	6.87 (147/2140)	2010-2013	(63)
US <sup>a</sup>	50.62 (122/241)	2011-2013	(64)
Thailand	6.21 (104/1674)	2009-2014	This study

\*Using the partial gene of VP1 (ORF2) for detection and classification

<sup>a</sup>Outbreak

### 3. การวิเคราะห์การกระจายตัวการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามฤดูกาลและตามกลุ่มอายุ

เมื่อทำการวิเคราะห์การกระจายตัวการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในแต่ละเดือน ตั้งแต่ปี 2009-2014 ดังรูปที่ 11 พบว่าการกระจายตัวของการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส จะเริ่มในช่วงปลายปี คือ การระบาดของเชื้อโนโรไวรัสในปี 2009-2010 จะมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน, ปี 2011, 2012 และ 2014 ระบาดมากที่สุดในเดือนตุลาคม และในปี 2013 ระบาดมากที่สุดในเดือนสิงหาคม แสดงให้เห็นว่า รูปแบบการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส นั้น จะเริ่มแพร่กระจายการระบาดได้ดีในช่วงปลายฤดูฝน และเพิ่มอัตราการระบาดได้มากที่สุดในช่วงฤดูหนาวของทุกๆ ปีของประเทศไทย



รูปที่ 11 : การกระจายตัวของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในแต่ละเดือนของประเทศไทย ช่วงปี 2009-2014

#### 4. การวิเคราะห์การกระจายตัวการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุและเพศ

นอกจากนี้การแยกวิเคราะห์การติดเชื้อตามกลุ่มอายุ พบว่า กลุ่มอายุที่พบการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสมากที่สุด คือ ช่วงอายุ 7-12 เดือน (44.2%) รองลงมา คือ ช่วงอายุ 13-23 เดือน (24.1%), 2-5 ปี (17.3%), 4-6 เดือน (9.62%), 0-3 เดือน (1.92%) และยังพบการระบาดในกลุ่มอายุที่มากกว่า 5 ปี อีกจำนวน 3 ราย โดยมีผู้ใหญ่ที่มีอายุ 30 ปี รวมอยู่ในนั้นด้วย และเมื่อทำการวิเคราะห์การแพร่ระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุกับรายงานการศึกษาในประเทศต่างๆ พบว่า ทั้ง 4 ประเทศ คือ ประเทศรัสเซีย, เวียดนาม, จีน และไทยที่เคยทำการศึกษาก่อนหน้านี้ มีความสอดคล้องกับผลที่ได้ในการศึกษานี้ คือ ทั้ง 4 ประเทศนี้ พบการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในกลุ่มวัยทารกอายุ 7-12 เดือน มากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มอายุ 13-23 เดือน ในหลายๆ ประเทศ ดังตารางที่ 24 และตารางที่ 25

ตารางที่ 24 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุ

Age group	No. of HNoV infection
0-6 month	3 (2.88%)
7-12 month	46 (44.2%)
13-23 month	25 (24.1%)
2-5 year	18 (17.3%)
6-12 year	2 (1.92%)
30 year	1 (0.96%)
total	104

ตารางที่ 25 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุ เทียบกับในประเทศอื่นๆ

Country	Year	0-6 <sup>a</sup>	7-12 <sup>a</sup>	13-23 <sup>a</sup>	2-5 <sup>b</sup>	6-12 <sup>b</sup>	> 24 <sup>b</sup>	ref
Russia	2003-2012	25.9	59.1	12.9	-	-	2.07	(65)
Vietnam	2007-2008	16.6	45.6	34.4	3.33	-	-	(66)
Thailand	2004-2010	10.5	40.3	36.4	-	-	12.8	(67)
China	2009-2013	24.2	39.7	22.3	22.4	-	-	(68)
Thailand	2009-2014	2.88	44.2	24.1	17.3	1.92	0.96	This study

<sup>a</sup> month, <sup>b</sup> year

เมื่อทำการวิเคราะห์การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามเพศแล้ว พบว่า จากจำนวน ตัวอย่าง 104 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อในเพศชายจำนวน 63 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60.6 และเพศหญิงจำนวน 41 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.4 และจากการวิเคราะห์การแพร่ระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามเพศกับรายงานการศึกษาในประเทศต่างๆ คือ ประเทศแคนาดา, สเปน, จีน, เกาหลีใต้ และไทยในการศึกษาก่อนหน้า พบว่า อัตราการติดเชื้อในเพศชายและหญิงต่างกันออกไปในแต่ละประเทศ เช่น ประเทศเกาหลีใต้และจีน พบการระบาดในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง ส่วนในประเทศแคนาดา, สเปน และไทยในปี 2006-2007 พบการระบาดในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย ดัง ตารางที่ 26 และตารางที่ 27

ตารางที่ 26 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามเพศ

Gender	No. of sample (%)
Male	63 (60.6)
Female	41 (39.4)
total	104

ตารางที่ 27 การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามเพศ เทียบกับในประเทศอื่นๆ

Country	Year	Male	Female	Ref.
Canada	2006-2010	42	58	(69)
South Korea	2010-2011	72.2	27.8	(70)
Thailand	2006-2007	47.6	52.4	(71)
Spain	2009-2012	39.3	60.7	(62)
China	2009-2013	65.3	34.7	(68)
Thailand	2009-2014	60.6	39.4	This study



## 5. การเปรียบเทียบจีโนไทป์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน RdRp และ VP1

เมื่อนำจีโนไทป์ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RdRp จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มาเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ที่ได้จากยีน VP1 ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ตัวอย่าง B387, B402 และ B433 ที่ได้จากการระบาดในปี 2009 ซึ่งเป็นเด็กทั้งเพศชายและหญิง อายุ 3 เดือน, 6 เดือน และ 1 ปี สามารถระบุจีโนไทป์ GII.21 จากยีน RdRp และ จีโนไทป์ GII.3 จากยีน VP1 ซึ่งคล้ายกับสายพันธุ์ที่ระบาดก่อนหน้านี้ในประเทศเวียดนาม ในปี 2009 (KM198484)

นอกจากนี้ ยังพบว่า 4 ตัวอย่างที่ได้จากการระบาดในปี 2012 สามารถระบุจีโนไทป์ GII.12 จากยีน RdRp โดยที่การระบุจีโนไทป์จากยีน VP1 เป็น GII.3 ใน 2 ตัวอย่าง คือ B1310 และ B1516 และเป็น GII.1 ใน 2 ตัวอย่าง คือ B1319 และ B1341 โดยสายพันธุ์ที่เกิดการ recombination ของสายพันธุ์ GII.12/GII.3 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ระบาดที่ไต้หวัน ปี 2010 (KC464495) ในขณะที่สายพันธุ์ GII.12/GII.1 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ระบาดก่อนหน้านี้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ปี 2010 (JN797508) โดยทั้ง 2 รูปแบบนี้ เกิดขึ้นในเด็กที่มีอายุ 1 และ 3 ปี โดยที่ recombination ทั้ง 7 สายพันธุ์ที่พบนี้มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าร้อยละ 99 กับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงของแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 28

โดยที่ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้ออหิวาต์ไวรัสสายพันธุ์ recombination มีลักษณะที่ไม่แตกต่างจากผู้ป่วยในสายพันธุ์ปกติ คือ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน และเป็นไข้ร่วมด้วย โดยที่จะมีอาการถ่ายเหลวมากกว่า 5 ครั้งต่อวัน ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 28 การจำแนกจีโนไทป์ที่ได้จากทั้งยีน RdRp และ VP1 ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่เกิด recombination

Year	Genotype RdRp/VP1	strains	Age	Gender	GenBank accession	
					number of most closely related strain (%identity)	Closet match
		B387	3m	M		
2009	GII.21/GII.3	B402	6m	F	KM198484 (99%)	Viet Nam
		B433	1y	F		
2012	GII.12/GII.3	B1310	1y	M	KC464495 (99%)	Taiwan
		B1516	3y	M		
2012	GII.12/GII.1	B1319	3y	M	JN797508 (99%)	US
		B1341	1y1m	F		

หมายเหตุ : m = month, y = year, M = male, F = female

ตารางที่ 29 ลักษณะอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสสายพันธุ์ recombination

Year	Genotype RdRp/VP1	Strain	Clinical symptom			
			Vomiting	Fever	Diarrhea (time/day)	Specimen
2009	GII.21/GII.3	B433	✓	✗	✓ (7)	W, S
2012	GII.12/GII.3	B1310	✓	✓	✓ (8)	W, Y
2012	GII.12/GII.1	B1341	✓	✓	✓ (5)	W, Y

หมายเหตุ : m = month, y = year, M = male, F = female, W = watery, S = soft,  
Y = yellow



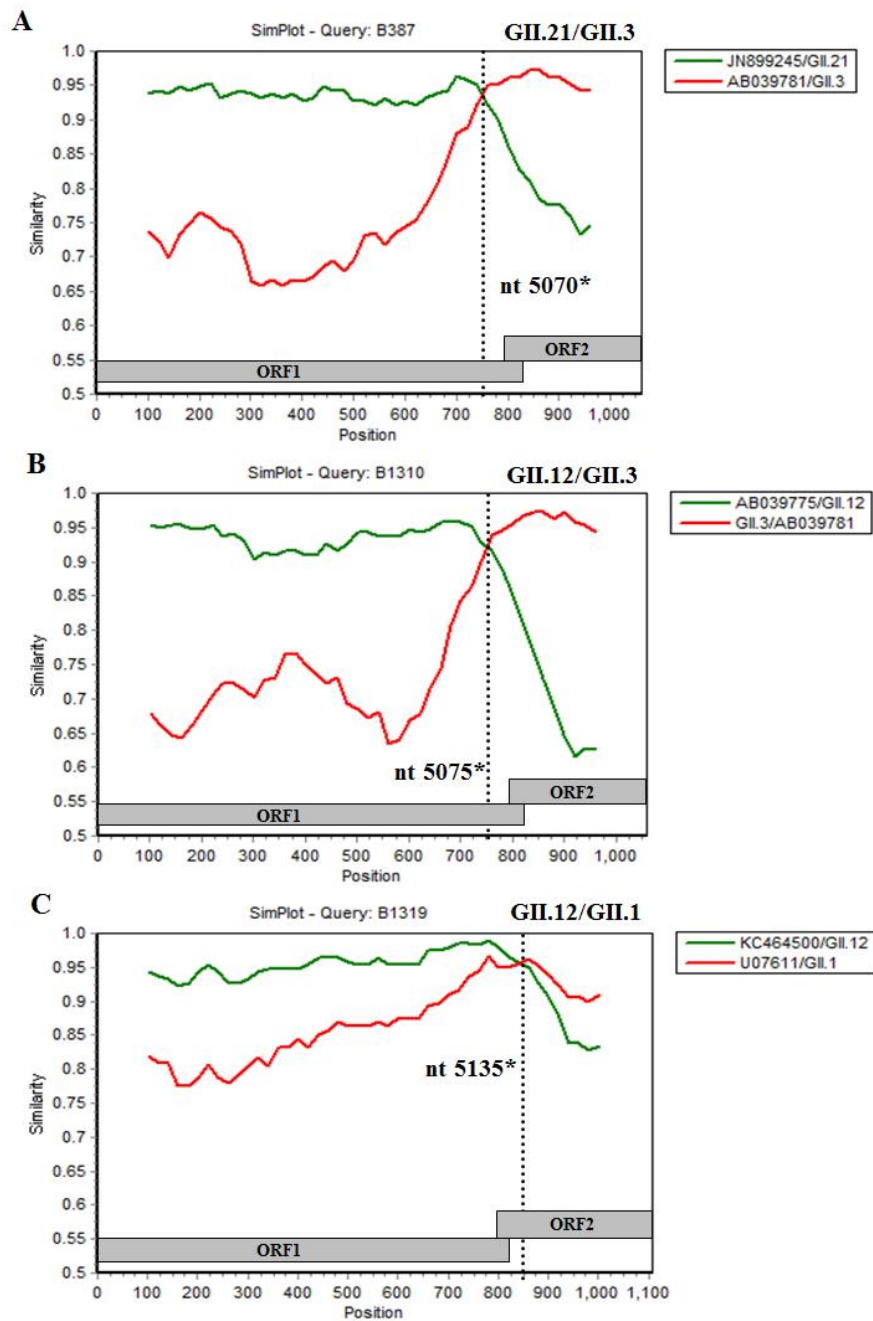
## 6. การวิเคราะห์ผลการเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส

จากผลการเปรียบเทียบจีโนมไทป์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน RdRp และ VP1 ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นว่า ตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมดนั้น มีการเกิด recombination ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยรูปแบบการเกิด recombination ทั้งหมด 3 รูปแบบ และจากการวิเคราะห์ผลการเกิด recombination ด้วยโปรแกรม Simplot เพื่อหาตำแหน่งของการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมระหว่าง 2 สายพันธุ์ ได้ดังรูปที่ 12 โดยการกำหนดให้ตัวอย่าง B387 เป็นตัวแทนของการเกิด recombination ในรูปแบบ GII.21/GII.3 ซึ่งในการวิเคราะห์จะต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังในรูป 12A จะใช้ Salisbury150/2011/USA (JN899245) ในเส้นสีเขียว แทนสายพันธุ์ GII.21 และ Saitama U18 (AB039781) ในเส้นสีแดง แทนสายพันธุ์ GII.3 ผลที่ได้พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง B387 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ GII.21 จากฐานข้อมูลในช่วงต้น หลังจากนั้นเกิดจุดตัดของการแลกเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นในช่วงปลายซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิด recombination ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีความคล้ายกันกับสายพันธุ์ GII.3 โดยจุดตัดที่ได้จากกราฟอยู่ในตำแหน่งที่ 741 จะตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 5,070 ใน Lordsdale genome (X86557) ซึ่งตำแหน่งนี้จะอยู่ก่อนหน้า (upstream) บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 (5,085-5,104) เล็กน้อย

ในรูปแบบการเกิด recombination GII.12/GII.3 กำหนดให้ตัวอย่าง B1310 เป็นตัวแทน และใช้ Saitama U1 (AB039775) ในเส้นสีเขียว แทนสายพันธุ์ GII.12 และ Saitama U18 (AB039781) ในเส้นสีแดง แทนสายพันธุ์ GII.3 ที่ได้จากฐานข้อมูล ดังในรูป 12B ผลที่ได้พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง B1310 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ GII.12 จากฐานข้อมูลในช่วงต้น หลังจากนั้นเกิดจุดตัดของการแลกเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นในช่วงปลายตำแหน่งที่ 741 ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงไปคล้ายกันกับสายพันธุ์ GII.3 โดยจุดตัดที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 5,075 ใน Lordsdale genome

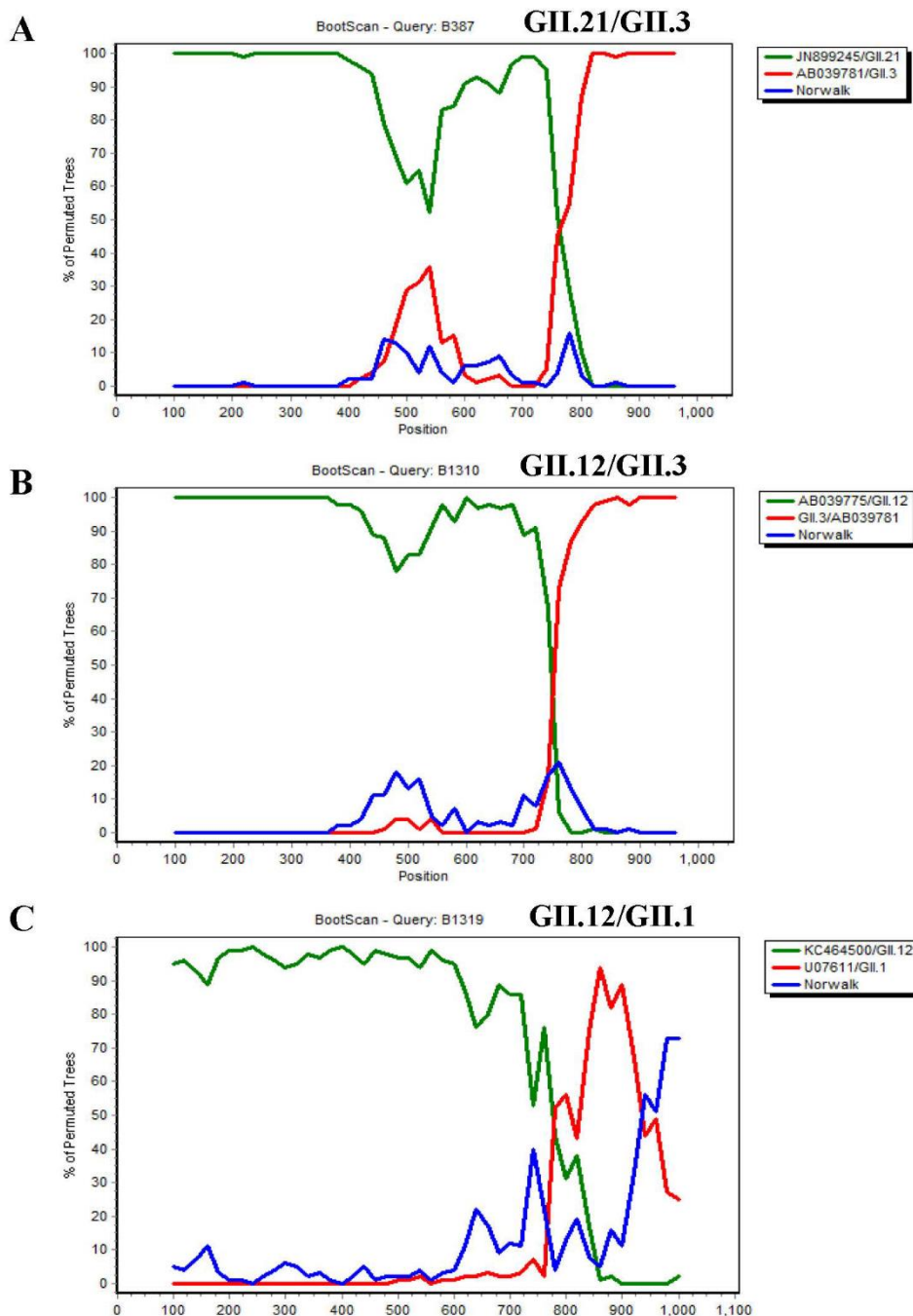
รูปแบบที่ 3 คือ การเกิด recombination GII.12/GII.1 กำหนดให้ตัวอย่าง B1319 เป็นตัวแทน และใช้ CGMH42/2010/TW (KC464500) ในเส้นสีเขียว แทนสายพันธุ์ GII.12 และ Hawaii calicivirus (U07611) ในเส้นสีแดง แทนสายพันธุ์ GII.1 ที่ได้จากฐานข้อมูล ดังในรูป 12C ผลที่ได้พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง B1319 มีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ GII.12 จากฐานข้อมูลในช่วงต้น หลังจากนั้นเกิดจุดตัดของการแลกเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นในช่วงปลาย ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงไปคล้ายกันกับสายพันธุ์ GII.3 โดยจุดตัดที่ได้จากในกราฟคือ ตำแหน่งที่ 841 จะตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 5,135 ใน Lordsdale

genome ซึ่งตำแหน่งนี้จะอยู่หลังจาก (downstream) บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 เป็นช่วงต้นของยีน VP1 (5' UTR)



รูปที่ 12 : Similarity Plot

โดยจุดตัดของการเกิด recombination ทั้ง 3 รูปแบบนั้น เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.0001$ ) ซึ่งได้จากหลักการทดสอบทางสถิติ maximum chi-squared test ของ Maynard Smith (1992) (<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/CSE/test/>) รวมทั้งการยืนยันการเกิด recombination ด้วย bootscan method ดังรูปที่ 13

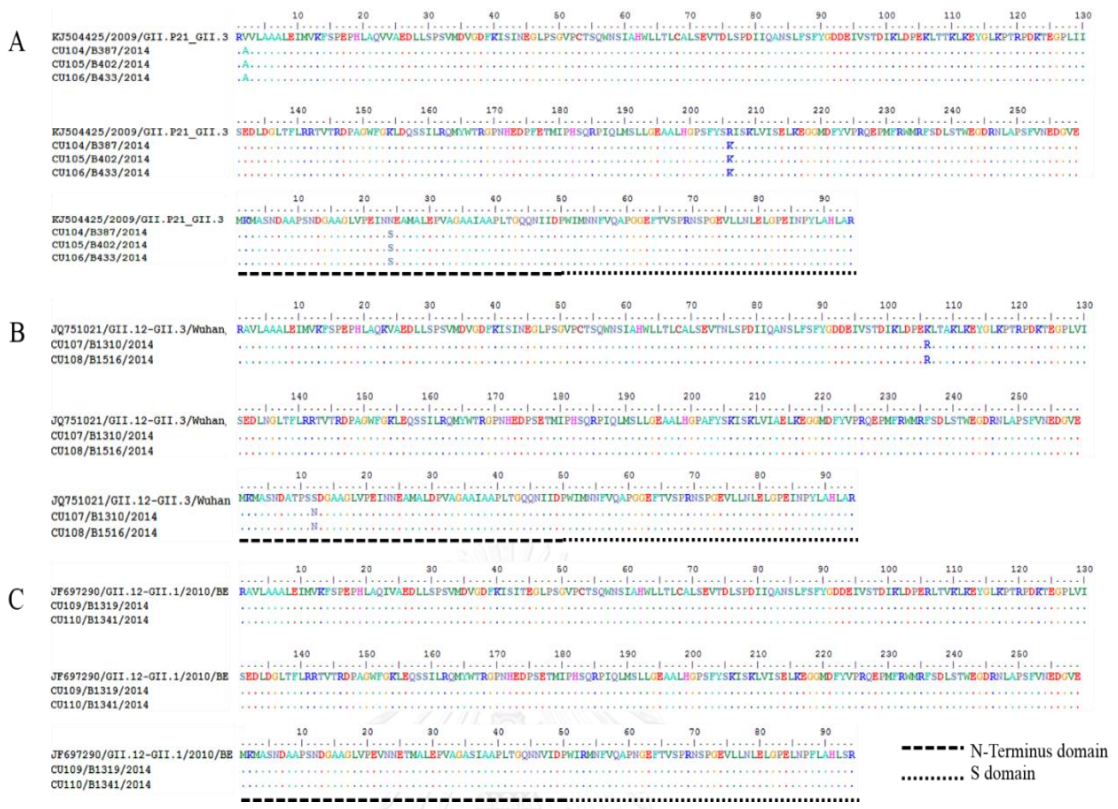


รูปที่ 13 : Bootscan method

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูลการแปลรหัสของลำดับกรดอะมิโน

การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ มีผลต่อองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ 2 ซึ่งจะส่งผลต่อลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้เช่นกัน ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในบางส่วนของยีน RdRp และ VP1 ที่เป็นสายพันธุ์ที่เกิด recombination จากการศึกษาคั้งนี้ กับสายพันธุ์ recombination อ้างอิงที่ได้จากฐานข้อมูล ดังรูปที่ 14 ซึ่งสายพันธุ์ recombination อ้างอิง ของ GII.21/GII.3 คือ KJ504425/2009/GII.P21-GII.3 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เกิด recombination B387 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 253 จาก arginine ไปเป็น lysine (Arg253Lys) และจาก valine เป็น alanine ที่ตำแหน่ง 457 (Val457Ala) ในยีน RdRp นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนภายในยีน VP1 ในตำแหน่งที่ 24 จาก asparagine เป็น serine (Asn24Ser)

นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของสายพันธุ์ที่เกิด recombination GII.12/GII.3 จากตัวอย่าง B1310 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ JQ751021/GII.P12-GII.3/Wuhan อีก 2 ตำแหน่ง คือ ในตำแหน่งที่ 357 โดยเปลี่ยนจาก lysine เป็น arginine (Lys357Arg) ภายในยีน RdRp และเปลี่ยนจาก serine เป็น asparagine (Ser12Asn) ในตำแหน่งที่ 12 ของยีน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนในสายพันธุ์ที่เกิด recombination GII.12/GII.1



รูปที่ 14 : การเปรียบเทียบการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของยีน RdRp และ VP1 ในสายพันธุ์ recombination

## 8. การวิเคราะห์สายพันธุ์ที่มีการเกิด recombination ที่พบในการศึกษานี้ กับประเทศอื่นๆ

เมื่อทำการวิเคราะห์สายพันธุ์ที่เกิด recombination ที่ค้นพบในการศึกษานี้ทั้ง 3 สายพันธุ์ กับประเทศอื่นๆ พบว่า มีหลายๆประเทศที่พบการระบาดของสายพันธุ์ recombination นี้เช่นกัน โดยเฉพาะในสายพันธุ์ GII.21/GII.3 ที่พบการระบาดอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชียทั้งประเทศจีน, ญี่ปุ่น, เกาหลีใต้, เวียดนาม รวมถึงในประเทศไทย และยังพบได้ในทวีปยุโรป, แอฟริกา, ออสเตรเลีย เช่น ในประเทศแอฟริกาใต้ เบลเยียม สเปน และสหรัฐอเมริกา อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเกิดการระบาดได้ตลอดทุกๆปี ตั้งแต่ปี 2002 จนถึง 2013

สำหรับสายพันธุ์ recombination GII.12/GII.3 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดได้บ่อยและมากที่สุดในประเทศจีน ตั้งแต่ปี 2008 จนถึง 2013 แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาการระบาดของสายพันธุ์ recombination GII.12/GII.1



ตารางที่ 30 การระบาดของสายพันธุ์ recombination ที่พบในประเทศอื่นๆ

Strain of recombination	Country	Year of study
	Australia (AY845056)	2002
	Belgium (FJ409631)	2002
	Japan (AB242256)	2003
	Japan (GU594164)	2007
	China (JQ751036)	2009
<b>GII.21/GII.3</b>	Spain (KJ504425)	2009
	Viet Nam (KM198484)	2009
	South Africa (KC962457)	2010
	US (JN899245)	2012
	South Korea (KC110855)	2012
	Taiwan (KJ145323)	2013
	China (JQ751021)	2008
<b>GII.12/GII.3</b>	China (GU991355)	2009
	China (KP174836)	2013
<b>GII.12/GII.1</b>	-	-

## 9. การวิเคราะห์อัตราการเกิด recombination ที่พบในการศึกษานี้ กับประเทศอื่นๆ

จากการศึกษานี้ พบการเกิด recombination ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างที่เกิดจากการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยยีน VP1 ทั้ง 104 ตัวอย่าง ดังนั้น สามารถคิดเป็นอัตราการพบทั้งหมด 6.73% และเมื่อทำการวิเคราะห์อัตราการพบการเกิด recombination ในประเทศต่างๆ เปรียบเทียบกับในการค้นพบครั้งนี้ของประเทศไทยแล้ว พบว่า ในหลายๆประเทศก็สามารถพบจำนวนสายพันธุ์ recombination ได้แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น อาจพบได้น้อยถึง 2.02% ในปี 2006-2007 ของประเทศญี่ปุ่น หรืออาจพบได้มากถึง 9.71% ในประเทศสเปน ในปี 2009-2012 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศไทยแล้ว พบว่า ประเทศสิงคโปร์มีอัตราการเกิด recombination ที่ใกล้เคียงกับที่พบในการศึกษานี้ คือ 6.09% จากตัวอย่างที่ศึกษาในปี 2004-2011

ตารางที่ 31 เปรียบเทียบอัตราการพบการเกิด recombination ในประเทศอื่นๆ

Country	No. of positive HNoV	No. recombination (%)	Year of study	Ref.
South Korea	19	1 (5.26)	2004-2007	(23)
Japan	99	2 (2.02)	2006-2007	(72)
Australia	86	3 (3.49)	2006-2008	(56)
China	106	8 (7.55)	2007-2008	(73)
Singapore	312	19 (6.09)	2004-2011	(55)
Spain	453	44 (9.71)	2009-2012	(62)
China	1118	102 (9.12)	2010-2013	(63)
Thailand	104	7 (6.73)	2009-2014	This study



## บทที่ 5

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแพร่ระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสมีอัตราที่สูงในหลายๆประเทศทั่วโลก แต่ในประเทศไทยนั้น มีอัตราการระบาดที่ไม่สูงมากนัก แม้ว่าจะมีการตรวจพบเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียฉับพลันอยู่บ้าง แต่ก็มีบางรายที่ไม่แสดงอาการออกมา (67, 74) การค้นพบการระบาดในประเทศไทยที่ต่ำกว่าในหลายๆประเทศอาจเนื่องมาจากความจริงที่ว่าอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงและสาเหตุของเชื้อโรคที่ไม่ได้รับการตรวจสอบมักจะเป็นเพราะขาดผู้ที่เชี่ยวชาญ ขาดความรู้เกี่ยวกับความรุนแรงของโรคและปัจจัยทางด้านต่างๆ เช่น สถานที่อยู่อาศัย, การเงิน เป็นต้น ทำให้ขาดผู้ที่สนใจที่จะศึกษาและวิเคราะห์การติดเชื้อจากฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย ทำให้อัตราการระบาดที่พบในประเทศไทยนั้นค่อนข้างต่ำกว่าในประเทศอื่นๆ

อีกสาเหตุหนึ่ง ที่ทำให้การศึกษาในครั้งนี้สามารถตรวจพบอัตราการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสได้ต่ำกว่าในหลายๆประเทศ เนื่องจากในการศึกษานี้มีข้อจำกัดในหลายประการ คือ ขนาดของประชากรที่ทำการศึกษามีข้อจำกัดทางความสามารถในการตรวจสอบหาการเกิด recombination นอกจากนี้ตัวอย่างที่เก็บมาทำการศึกษาเป็นการเก็บตัวอย่างมาจากคนไข้ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการทางระบบทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลันและส่งมาตรวจวิเคราะห์หาการติดเชื้อจากฮิวแมนโรตาไวรัสโดยเฉพาะ ไม่ได้เกิดจากอุบัติการณ์การระบาดของโรคทางเดินอาหาร ซึ่งลักษณะทั่วไปของการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส นั้น มักจะพบการระบาดแบบทันทีทันใดและค่อนข้างมีอาการแสดงออกอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้อาการคลื่นไส้ อาเจียนที่เป็นอาการที่มักพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากฮิวแมนโนโรไวรัสมากกว่าครึ่ง ไม่ได้ถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลวิเคราะห์ในการศึกษาในครั้งนี้ด้วย และนอกจากนี้ยังอาจจะพบการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในกลุ่มของผู้ที่ไม่แสดงอาการของโรคทางระบบทางเดินอาหารอีกด้วย แต่ไม่ได้มีการเก็บตัวอย่างเหล่านั้นมาวิเคราะห์

นอกจากนี้ ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส จากตัวอย่างประชากรซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) ที่น้อยกว่าเทคนิค real-time RT-PCR จะเห็นได้ชัดในรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค real-time RT-PCR ในการตรวจหาการติดเชื้อจากฮิวแมนโนโรไวรัสในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี สามารถพบการระบาดได้มากถึง 24% และตรวจพบการติดเชื้ออีก 6.8% ในกลุ่มควบคุม (control group) ที่ไม่แสดงอาการของโรคระบบทางเดินอาหาร

อีกด้วย (74) จะเห็นได้ว่าเทคนิคที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์ก็อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตรวจพบการระบาดของเชื้อไวรัสด้วย

จากผลการศึกษาที่ได้พบอัตราการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทยประมาณ 9% จากตัวอย่างอุจจาระของเด็กที่ป่วยด้วยอาการทางระบบทางเดินอาหารอักเสบ ด้วยการตรวจสอบที่บริเวณยีน RdRp และที่สามารถหาจีโนไทป์ได้อย่างแน่ชัด ประมาณ 6.2% เมื่อตรวจสอบที่บริเวณยีน VP1 ระหว่างปี 2009-2014 โดยสายพันธุ์ที่ระบาดมากที่สุด คือ สายพันธุ์ GII.4 ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องตามรายงานที่ค้นพบมาตั้งแต่ช่วงปี 2002-2011 คือ สายพันธุ์ GII.4 เป็นสายพันธุ์เด่นที่มีอัตราการระบาดมากที่สุดตลอดทั้งปีทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ทั่วโลก (14, 74-77) และอัตราการระบาดที่ค้นพบในครั้งนี้เทียบเท่ากับที่พบในการศึกษาก่อนหน้านั้นในประเทศไทยที่ทำการศึกษาในตัวอย่างที่เก็บได้จากเดือนตุลาคมปี 2004 ถึงเดือนธันวาคม ปี 2006 และเดือนมีนาคมปี 2008 ถึงเดือนสิงหาคมปี 2010 (67)

การตรวจพบสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจากผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree สามารถจำแนกจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 12 genotype คือ GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.12, GII.13, GII.14, GII.17 และ GII.21 จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยนั้นค่อนข้างมีความหลากหลาย โดยจีโนไทป์เหล่านี้สามารถพบได้ทั่วไปในหลายๆประเทศทั่วโลก นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์การระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในช่วงปีที่ทำการศึกษานี้ พบว่า มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ในประเทศไทยช่วงปี 2006 คือ จะพบอัตราการระบาดได้ 2 ช่วงคือ ช่วงปลายปี ประมาณเดือนสิงหาคม-พฤศจิกายน และระบาดต่อไปจนถึงต้นปีช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ ที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่ระบาดมากที่สุดจะเป็นเดือนกันยายน-ตุลาคม ที่มีอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส (74) ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาในปี 1929 ของ Zahorsky อธิบายเกี่ยวกับเชื้อโนโรไวรัสว่า เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการอาเจียนและท้องเสียอย่างเฉียบพลัน ซึ่งจะเกิดขึ้นโดยทั่วไปในช่วงเดือนที่หนาวเย็น ดังนั้นในเริ่มแรกจะรู้จักกันในชื่อ “winter vomiting disease” (78) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศเกาหลีใต้ และประเทศแคนาดา พบว่ามีอัตราการระบาดที่สูงมากขึ้นในช่วงฤดูฝน จึงส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนและแพร่กระจายตัวของเชื้อไปตามแหล่งน้ำเข้าสู่ชุมชนได้ (79, 80) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสนั้น จะเริ่มแพร่กระจายการระบาดได้ดีในช่วงปลายฤดูฝน และเพิ่มอัตราการระบาดได้มากที่สุดในช่วงฤดูหนาวของทุกๆ ปีของประเทศไทย

จากการวิเคราะห์การแพร่ระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสตามกลุ่มอายุ พบว่าสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในประเทศจีน ในปี 2009-2013 คือ พบการระบาดของเชื้อในกลุ่มวัยทารก 6-11

เดือน มากที่สุด ถึง 39.7% รองลงมาคือกลุ่มเด็กเล็ก 12-23 เดือน (22.3%) (68) นอกจากนี้ การศึกษาที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ในปี 2008-2010 พบว่า กลุ่มที่พบการระบาดของเชื้อฮิวแมน โนโรไวรัสมากที่สุด คือ ในกลุ่มอายุตั้งแต่ 7-24 เดือน (ประมาณ 18%) (67) และนอกจากนี้ยังพบการ ระบาดในกลุ่มอายุที่มากกว่า 30 ปีขึ้นไปอีก 2.5% (71) แสดงให้เห็นว่าการแพร่กระจายตัวของเชื้อ ฮิวแมนโนโรไวรัสสามารถระบาดได้ในทุกกลุ่มช่วงอายุ โดยความหลากหลายของการกระจายตัว ตามกลุ่มอายุนี้อาจสะท้อนให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของธรรมชาติในการสร้างระบบภูมิคุ้มกันใน ร่างกายที่แตกต่างกัน โดยการที่พบมากที่สุดในกลุ่มเด็กทารก (6-11 เดือน) และเด็กเล็ก (12-24 เดือน) เนื่องมาจากรูปแบบการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสส่วนใหญ่มาจากการรับประทานอาหาร และ น้ำดื่ม (food and water borne) ดังนั้นในเด็กที่อายุต่ำกว่า 6 เดือน อาจจะยังไม่ได้รับประทาน อาหาร จะกินนมแม่อย่างเดียวเป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้พบการติดเชื้อในเด็กที่อายุมากกว่า 6 เดือนไปจนถึง 2 ปีมากที่สุด และอาจเนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกันของเด็กกำลังพัฒนาไม่เต็มที่และเด็ก ในวัยนี้อยู่ในวัยกำลังหัดเดิน คลาน อาจจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้มาก

การวิเคราะห์ผลของการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสต่อเพศนั้น ไม่มีรายงานการศึกษาที่ ระบุว่าเพศมีผลต่อการติดเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบการติดเชื้อ ฮิวแมนโนโรไวรัสในเพศชายมากกว่าเพศหญิงนั้น อาจจะเป็นผลมาจากตัวอย่างที่ส่งมาตรวจการติด เชื้อนั้นเป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง ซึ่งเพศอาจจะไม่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้

## การเกิด recombination ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส

จากการตรวจแยกสายพันธุ์ของการติดเชื้อที่เป็น genogroup 2 (GII) ทั้งหมด ทำให้ระบุสายพันธุ์ที่มีการเกิด recombination ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (intra-genogroup) โดยจะสามารถแยกได้เป็น 2 รูปแบบ จากตำแหน่งที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรม คือ รูปแบบแรก จะเกิดจุดตัดของ recombination ตำแหน่งที่อยู่ก่อนหน้า (upstream) บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ภายในส่วนปลาย C (carboxyl terminus) ของยีน RdRp และรูปแบบที่ 2 คือ เกิด recombination ตำแหน่งที่อยู่หลัง (downstream) บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ภายในส่วนหน้าปลาย N (N-terminal) ของยีน VP1 โดยที่การเกิด recombination ทั้งหมดนี้ถูกตรวจสอบให้แน่ชัดด้วยการวิเคราะห์จาก phylogenetic tree, SimPlot และ maximum chi-square โดยเมื่อวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบอัตราการเกิด recombination ที่ได้จากการศึกษานี้เทียบกับในประเทศอื่นๆแล้ว พบว่า อัตราการเกิด recombination จะอยู่ในช่วง 5-9% โดยอาจจะพบมากหรือน้อยกว่านี้ได้ (23, 56, 57, 62, 72, 73, 81) ซึ่งการศึกษานี้พบการเกิด recombination ประมาณ 6% โดยเหตุผลที่พบในอัตราที่น้อยกว่าที่อื่นๆ ด้วยเหตุผลเดียวกับที่พบอัตราการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่น้อยกว่าในหลายๆประเทศ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนจากตัวอย่างที่มีการเกิด recombination นี้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยไม่ก็ตำแหน่ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้คาดว่าไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนทั้ง RdRp และ VP1 เนื่องจากว่ากรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น ยังคงเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดิม (การจัดกลุ่มตาม side chain) คือ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน RdRp ของสายพันธุ์ GI.21/GI.3 ที่ตำแหน่ง Arg253Lys ยังคงเป็นกรดอะมิโนในกลุ่ม positive charged และที่ตำแหน่ง Val457Ala เป็นกรดอะมิโนในกลุ่ม hydrophobic เช่นเดิม ส่วนการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของสายพันธุ์ที่เกิด recombination GI.12/GI.3 จาก Lys357Arg ภายในยีน RdRp ยังคงเป็นกรดอะมิโนในกลุ่ม positive charged ยกเว้น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ Serine และ Asparagine ของยีน VP1 ซึ่งแม้ว่าจะยังเป็นกรดอะมิโนในกลุ่ม polar uncharged เช่นเดิม แต่กรดอะมิโนทั้ง 2 ตัวนี้ จะมีการเชื่อมต่อกับน้ำตาล glycan ในกระบวนการ glycosylation ที่แตกต่างกัน คือ Serine จะมีหมู่ hydroxyl oxygen ทำให้เกิดการเกาะติดของ O-linked glycans ส่วน Asparagine จะมีหมู่ nitrogen ทำให้เกิดการเกาะติดของ N-linked glycans ดังนั้นจึงอาจส่งผลกระทบต่อรูปร่างของโครงสร้างในส่วนต้นของ VP1 ได้ แต่เนื่องจากส่วนต้นของ VP1 ในบริเวณที่ทำการศึกษานี้ ไม่ได้ถูกบรรจุอยู่ใน

โครงสร้างของไวรัส เป็นเพียงส่วนหางที่ยื่นออกมา ดังนั้นจึงไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของไวรัสมากนัก

ในขณะที่ข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาค้นพบว่า บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1/ORF2 และ P1-P2 junction ของ VP1 เป็นบริเวณที่มักเกิด recombination มากที่สุด (hot-spot) (82) ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ในตำแหน่ง P1-P2 junction ของ VP1 จะเป็นการศึกษาในส่วนของปลายของยีน RdRp จนถึงส่วนต้นของยีน VP1 ซึ่งจะรวมบริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1/ORF2 อยู่ในนั้นด้วย การศึกษา recombination ในเชื้ออิวแมนโนโรไวรัส นั้น ในปัจจุบันได้ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่การค้นพบในครั้งแรก (19, 49, 82-84) โดยการเกิด recombination ในมนุษย์นั้น ยังต้องเฝ้าสังเกตการณ์ เช่นเดียวกับใน bovine norovirus (85) และสมาชิกอื่นๆในสกุล calicivirus รวมทั้ง feline calicivirus (86) ที่สามารถค้นพบการเกิด recombination ได้บ่อย

ในการศึกษาครั้งนี้ รูปแบบ recombination ที่ถูกค้นพบสามารถแยกแยะได้เป็น 3 รูปแบบตามลักษณะของจีโนมที่เกิด recombination ระหว่าง ORF1 (ยีน RdRp) และ ORF2 (ยีน VP1) คือ สายพันธุ์ GII.21/GII.3, GII.12/GII.3 และ GII.12/GII.1 ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อโนโรไวรัสที่มีความยืดหยุ่นต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ของจีโนม โดยเฉพาะบริเวณ ORF1/ORF2 นี้ได้มีการค้นพบการเกิด recombination ในหลายๆการศึกษา เนื่องจากเชื้ออิวแมนโนโรไวรัสไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นจึงอ้างอิงจากหลักฐานที่ค้นพบก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า ที่ด้านปลาย carboxyl ของยีน RdRp ใน bovine norovirus นั้นประกอบไปด้วยโครงสร้างของ double-stem loop (87) รวมถึงการศึกษาโครงสร้างของยีน RdRp ใน Norwalk virus ที่เป็นตัวต้นแบบของการศึกษาโนโรไวรัสพบว่าที่ปลาย carboxyl มีความคล้ายคลึงกันสูงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มของโนโรไวรัสทั้งหมด และมีแนวโน้มที่จะมีความยืดหยุ่นและละลายได้ในตัวทำละลาย (solvent-exposed) (88) เช่นเดียวกับที่ปลาย amino ของยีน VP1 จะเป็นหางที่ยื่นออกมา ไม่ได้บรรจุอยู่ในอนุภาคของไวรัส (virion) (89) ซึ่ง 2 บริเวณที่กล่าวมาทั้งในยีน RdRp และ VP1 นั้นมีความยืดหยุ่นในการสอดแทรกหรือปรับเปลี่ยนสารพันธุกรรมของ murine norovirus (90) เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับหลักฐานก่อนหน้านี้ที่ค้นพบการเกิด recombination ที่บริเวณนี้ที่เป็นบริเวณ hot-spot (19, 84) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทั้งหมดแล้ว ทำให้สรุปได้ว่า ทั้ง 3 รูปแบบ recombination ที่ค้นพบได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะอยู่ภายในบริเวณที่กล่าวมาทั้งหมด

ได้มีผู้เสนอทฤษฎีกลไกการเกิด recombination ของเชื้อโนโรไวรัสในบริเวณนี้ ว่าเป็นการแลกเปลี่ยนอาร์เอ็นเอต้นแบบที่จะสังเคราะห์ (template switching) เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่ง ระหว่างการเพิ่มจำนวนพันธุกรรมของไวรัส (replication) (19) ทฤษฎีนี้ได้รับข้อสนับสนุนโดยการศึกษาที่

ผ่านมาแสดงให้เห็นว่ายีน RdRp สามารถจดจำ sub-genomic promoter ที่อยู่ใน hairpin loop ของบริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1/ORF2 ได้ (91) ในระหว่างการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัส non-structural polyproteins ถูกแปลรหัสมาจาก ORF1 และ hairpin loop ที่บริเวณปลายของยีน RdRp จะทำให้เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพการทำงานไป จึงเกิดการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอต้นแบบที่จะสังเคราะห์ (template switch) เป็น subgenomic ของไวรัสอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีการติดเชื้อร่วมกัน (co-infecting virus) ทำให้สามารถแปลรหัสให้เป็น capsid protein ต่อไปได้ ซึ่งจะเกิดเป็นไวรัสที่มีอาร์เอ็นเอผสมกันระหว่าง 2 สายพันธุ์ เป็นการเกิด recombination (92)

ถ้าหากว่าเชื้อโนโรไวรัสถูกจัดเป็นกลุ่มไวรัสที่มีโอกาสในการกลายพันธุ์หรือเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่สูง ทำให้ได้เป็นสายพันธุ์ต่างๆเพิ่มขึ้น (quasi-species) เหมือนกับอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดอื่นๆ จะมีสารพันธุกรรมแม่แบบที่ชัดเจนในระหว่างขั้นตอนการติดเชื้อ การติดเชื้อแบบผสม (Co-infection) โดยเชื้ออีวแมนโนโรไวรัสอีกสายพันธุ์หนึ่ง อาจส่งผลให้เกิดกลไกการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรม (recombination) ในระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรมได้

โดยปกติแล้วการเกิด recombination นั้น มักจะพบระหว่างยีน RdRp และ VP1 ซึ่งเป็นบริเวณที่ใกล้เคียงหรืออยู่ภายในช่วงที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 ดังนั้น การตรวจพบ recombination อาจจะถูกมองข้ามหรือไม่ค้นพบได้ เพราะโดยปกติการตรวจหาจีโนมที่ทั่วไปแล้ว จะทำการตรวจหาเฉพาะยีน RdRp หรือ VP1 เพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถทำการระบุว่ามี recombination เกิดขึ้นได้ จากรายงานการศึกษาระบุว่า จากทั่วโลกมีสายพันธุ์ที่เกิด recombination ภายในจีโนมเดียวกัน (intra-genotype) อย่างน้อย 23 สายพันธุ์ และระหว่างจีโนม (inter-genotype) อย่างน้อย 9 สายพันธุ์ (6, 93, 94) โดยสายพันธุ์ recombination ทั้ง 3 รูปแบบ ที่ค้นพบจากการศึกษานี้ได้เคยถูกพบการระบาดในประเทศอื่นๆ แล้ว ตัวอย่างเช่น การค้นพบสายพันธุ์ recombination GII.12/GII.3 จำนวนมากถึง 40 ตัวอย่างซึ่งกลายมาเป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุดในช่วงเวลานั้น รวมทั้งสายพันธุ์ GII.21/GII.3 ในประเทศจีน (63, 95) นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ GII.P21/GII.3 ที่พบการระบาดได้มากที่สุดรองจากสายพันธุ์ GII.4 ที่ตรวจพบได้จากเด็กที่พบอาการทางระบบทางเดินอาหารอักเสบในประเทศแอฟริกาใต้ (96) ส่วนสายพันธุ์ GII.12/GII.1 ยังไม่พบรายงานการศึกษาที่ระบุอย่างแน่ชัดว่ามีการค้นพบ recombination ของสายพันธุ์นี้

เป็นที่เชื่อกันโดยทั่วไปว่านอกเหนือจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตามธรรมชาติแล้ว เชื้อโนโรไวรัสยังมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมผ่านกลไก recombination ซึ่งเป็นกลไกที่ใช้โดยทั่วไปของอาร์เอ็นเอไวรัสจำนวนมาก (97) กลไกการเกิด recombination ของเชื้อไวรัสนั้นเป็นประโยชน์ต่อเชื้อหรือเป็นการหลบหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของ

เซลล์เจ้าบ้าน และทำให้มีเชื้อโนโรไวรัสสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นทำให้สามารถรอดพ้นจากการจับของระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมนุษย์ได้ อาจส่งผลให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสอย่างต่อเนื่องทั่วโลก การประเมินการเกิดขึ้นของสายพันธุ์ recombinant กับความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นของเชื้อ มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการระบุรูปแบบการระบาดและความชุกของโรคทั่วโลก เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนสุขภาพของประชาชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสที่เกิด recombination ที่พบในประเทศไทย เพื่อที่จะสามารถใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันควบคุมโรค และเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทยต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในด้านของจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษามีขนาดเล็ก และทำการศึกษากการเกิด recombination ที่บริเวณที่ทับซ้อนกันของ ORF1 และ ORF2 เท่านั้น ซึ่งแท้จริงแล้วการเกิด recombination นั้น สามารถเกิดได้ที่ตำแหน่งอื่นๆ อีก เช่น จากการศึกษาในประเทศอินเดีย พบการเกิด recombination ที่บริเวณ ORF2/ORF3 (98) และภายในบริเวณยีน RdRp และ VP1 (49) ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปในอนาคต ควรจะเพิ่มจำนวนประชากรที่ทำการศึกษาให้มากขึ้น และทำการศึกษากการเกิด recombination ในบริเวณอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์และความน่าเชื่อถือของข้อมูล

## รายการอ้างอิง

1. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology clinics of North America*. 2006;35(2):275-90, viii.
2. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*. 1972;10(5):1075-81.
3. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, Pang XL, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(5):802-12.
4. Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(1):95-102.
5. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *The New England journal of medicine*. 2009;361(18):1776-85.
6. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 12):3347-59.
7. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(5):607-25.
8. Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(1):16-22.
9. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiology and infection*. 2010;138(10):1454-8.
10. Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discovery medicine*. 2010;10(50):61-70.



11. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(8):1224-31.
12. Koo HL, Ajami NJ, Jiang ZD, Neill FH, Atmar RL, Ericsson CD, et al. Noroviruses as a cause of diarrhea in travelers to Guatemala, India, and Mexico. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(5):1673-6.
13. Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(1):27-36.
14. Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, et al. Norovirus and sapovirus infections in Thailand. *Japanese journal of infectious diseases*. 2004;57(6):276-8.
15. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, et al. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Journal of medical virology*. 2007;79(12):1921-6.
16. Khamrin P, Maneekarn N, Thongprachum A, Chaimongkol N, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new norovirus variants and genetic heterogeneity of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with diarrhea in Thailand. *Journal of medical virology*. 2010;82(2):289-96.
17. Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, et al. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Journal of medical virology*. 2008;80(10):1749-55.
18. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of virological methods*. 2002;100(1-2):107-14.
19. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(7):1079-85.

20. Nataraju SM, Pativada MS, Kumar R, Bhattacharya MK, Bagchi SR, Kobayashi N, et al. Emergence of novel Norovirus recombinants with NVGII.1/NVGII.5 RdRp gene and NVGII.13 capsid gene among children and adults in Kolkata, India. *International journal of molecular epidemiology and genetics*. 2011;2(2):130-7.
21. Mahar JE, Bok K, Green KY, Kirkwood CD. The importance of intergenic recombination in norovirus GII.3 evolution. *Journal of virology*. 2013;87(7):3687-98.
22. Le VP, Jung YC, Kang KS, Lim I, Myung SC, Kim W. Genetic characterization of norovirus GII.4 2006b variants from Jeju island, South Korea. *Journal of medical virology*. 2010;82(6):1065-70.
23. Won YJ, Park JW, Han SH, Cho HG, Kang LH, Lee SG, et al. Full-genomic analysis of a human norovirus recombinant GII.12/13 novel strain isolated from South Korea. *PloS one*. 2013;8(12):e85063.
24. Kapikian AZ. Overview of viral gastroenteritis. *Archives of virology Supplementum*. 1996;12:7-19.
25. Prasad BV, Crawford S, Lawton JA, Pesavento J, Hardy M, Estes MK. Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Foundation symposium*. 2001;238:26-37; discussion -46.
26. Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 2):278-91.
27. Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *Journal of medical virology*. 2007;79(9):1388-400.
28. Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;44(1):1-8.
29. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006;346(2):312-23.
30. Koo HL, Ajami NJ, Jiang ZD, Atmar RL, DuPont HL. Norovirus infection as a cause of sporadic healthcare-associated diarrhoea. *The Journal of hospital infection*. 2009;72(2):185-7.

31. Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *Journal of virology*. 2005;79(1):554-68.
32. Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gomara M. Molecular evolution of GII-4 Norovirus strains. *PloS one*. 2012;7(7):e41625.
33. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of virology*. 1992;66(11):6527-32.
34. Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of virology*. 2005;79(22):14017-30.
35. Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of medical virology*. 2008;80(8):1468-76.
36. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and infection*. 2000;124(3):481-7.
37. Sawyer LA, Murphy JJ, Kaplan JE, Pinsky PF, Chacon D, Walmsley S, et al. 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *American journal of epidemiology*. 1988;127(6):1261-71.
38. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *The New England journal of medicine*. 1977;297(2):86-9.
39. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature medicine*. 2003;9(5):548-53.
40. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(10):1553-7.
41. Goodgame R. Norovirus gastroenteritis. *Current gastroenterology reports*. 2006;8(5):401-8.

42. Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Current opinion in infectious diseases*. 2008;21(5):544-52.
43. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(4):1548-57.
44. Scipioni A, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Thiry E. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virology journal*. 2008;5:94.
45. Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2003;26(1):109-15.
46. Jimenez L, Chiang M. Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *American journal of infection control*. 2006;34(5):269-73.
47. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*. 2002;299(2):225-39.
48. Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of virological methods*. 2004;116(2):109-17.
49. Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *Journal of virology*. 2013;87(11):6270-82.
50. Bailey D, Thackray LB, Goodfellow IG. A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo. *Journal of virology*. 2008;82(15):7725-8.
51. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, et al. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *Journal of virology*. 2010;84(16):8085-97.

52. Ji L, Wu X, Yao W, Chen L, Xu D, Shen Y, et al. Rapid emergence of novel GII.4 sub-lineages noroviruses associated with outbreaks in Huzhou, China, 2008-2012. *PloS one*. 2013;8(12):e82627.
53. Medici MC, Tummolo F, Martella V, Giammanco GM, De Grazia S, Arcangeletti MC, et al. Novel recombinant GII.P16\_GII.13 and GII.P16\_GII.3 norovirus strains in Italy. *Virus research*. 2014;188:142-5.
54. Sai L, Wang G, Shao L, Liu H, Zhang Y, Qu C, et al. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in adults with acute gastroenteritis in Ji'nan, China. *Archives of virology*. 2013;158(11):2315-22.
55. Lim KL, Eden JS, Oon LL, White PA. Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004-2011. *Journal of medical virology*. 2013;85(10):1842-51.
56. Mahar JE, Kirkwood CD. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *Journal of medical virology*. 2011;83(12):2213-9.
57. Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, Botteldoorn N, Scipioni A, Vanderplasschen A, et al. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virology journal*. 2011;8:310.
58. Nataraju SM, Pativada M, Chatterjee D, Nayak MK, Ganesh B, Bhattacharya MK, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in children and adults: sequence analysis of region C indicates genetic diversity of NVGII strains in Kolkata, India. *Epidemiology and infection*. 2011;139(6):910-8.
59. Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES. Emergence of norovirus GII-4/2008 variant and recombinant strains in Seoul, Korea. *Archives of virology*. 2011;156(2):323-9.
60. Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, et al. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *Journal of medical virology*. 2012;84(3):517-25.
61. Sang S, Zhao Z, Suo J, Xing Y, Jia N, Gao Y, et al. Report of recombinant norovirus GII.g/GII.12 in Beijing, China. *PloS one*. 2014;9(2):e88210.

62. Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Perez-Trallero E. Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012. *PLoS one*. 2014;9(6):e98875.
63. Lu QB, Huang DD, Zhao J, Wang HY, Zhang XA, Xu HM, et al. An increasing prevalence of recombinant GII norovirus in pediatric patients with diarrhea during 2010-2013 in China. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2015;31:48-52.
64. Saupé AA, Kaehler D, Cebelinski EA, Nefzger B, Hall AJ, Smith KE. Norovirus surveillance among callers to foodborne illness complaint hotline, Minnesota, USA, 2011-2013. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(8):1293-6.
65. Zhirakovskaia EV, Tikunov AY, Bodnev SA, Klemesheva VV, Netesov SV, Tikunova NV. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003-2012. *Journal of medical virology*. 2015;87(5):740-53.
66. Trang NV, Luan le T, Kim-Anh le T, Hau VT, Nhung le TH, Phasuk P, et al. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam. *Journal of medical virology*. 2012;84(2):290-7.
67. Bodhidatta L, Abente E, Neesanant P, Nakjarung K, Sirichote P, Bunyarakyothin G, et al. Molecular epidemiology and genotype distribution of noroviruses in children in Thailand from 2004 to 2010: a multi-site study. *Journal of medical virology*. 2015;87(4):664-74.
68. Yu J, Jing H, Lai S, Xu W, Li M, Wu J, et al. Etiology of diarrhea among children under the age five in China: Results from a five-year surveillance. *The Journal of infection*. 2015.
69. Morton VK, Thomas MK, Mc ES. Estimated hospitalizations attributed to norovirus and rotavirus infection in Canada, 2006-2010. *Epidemiology and infection*. 2015:1-10.
70. So CW, Kim DS, Yu ST, Cho JH, Kim JD. Acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Iksan, Korea during December 2010-June 2011. *Korean journal of pediatrics*. 2013;56(9):383-8.

71. Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Journal of medical virology*. 2009;81(2):345-53.
72. Dey SK, Phan TG, Mizuguchia M, Okitsua S, Ushijima H. Novel recombinant norovirus in Japan. *Virus genes*. 2010;40(3):362-4.
73. Shen Q, Zhang W, Yang S, Chen Y, Shan T, Cui L, et al. Genomic organization and recombination analysis of human norovirus identified from China. *Molecular biology reports*. 2012;39(2):1275-81.
74. Neesanant P, Sirinarumitr T, Chantakru S, Boonyaparakob U, Chuwongkomon K, Bodhidatta L, et al. Optimization of one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for norovirus detection and molecular epidemiology of noroviruses in Thailand. *Journal of virological methods*. 2013;194(1-2):317-25.
75. Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Diraphat P, Sujirarat D, Khamrin P, et al. Norovirus GII-4 2006b variant circulating in patients with acute gastroenteritis in Thailand during a 2006-2007 study. *Journal of medical virology*. 2010;82(5):854-60.
76. Chaimongkol N, Khamrin P, Malasao R, Thongprachum A, Kongsricharoen T, Ukarapol N, et al. Molecular characterization of norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. *Journal of medical virology*. 2014;86(7):1210-8.
77. Thongprachum A, Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Okitsu S, Mizuguchi M, et al. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *Journal of medical virology*. 2010;82(12):2106-9.
78. Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1929;46:391-5.
79. Ayukekbong JA, Fobisong C, Tah F, Lindh M, Nkuo-Akenji T, Bergstrom T. Pattern of circulation of norovirus GII strains during natural infection. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(12):4253-9.

80. Park SH, Kim EJ, Oh SA, Kim CK, Choi SS, Cho SJ, et al. Viral agents associated with acute gastroenteritis in Seoul, Korea. *Clinical laboratory*. 2011;57(1-2):59-65.
81. Truong TC, Than VT, Kim W. Evolutionary phylodynamics of Korean noroviruses reveals a novel GII.2/GII.10 recombination event. *PloS one*. 2014;9(12):e113966.
82. Rohayem J, Munch J, Rethwilm A. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *Journal of virology*. 2005;79(8):4977-90.
83. Jiang X, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Archives of virology*. 1999;144(12):2377-87.
84. Jin M, Chen J, Zhang XH, Zhang M, Li HY, Cheng WX, et al. Genetic diversity of noroviruses in Chinese adults: potential recombination hotspots and GII-4/Den Haag-specific mutations at a putative epitope. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011;11(7):1716-26.
85. Han MG, Smiley JR, Thomas C, Saif LJ. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(11):5214-24.
86. Symes SJ, Job N, Ficorilli N, Hartley CA, Browning GF, Gilkerson JR. Novel assay to quantify recombination in a calicivirus. *Veterinary microbiology*. 2015;177(1-2):25-31.
87. McCormick CJ, Salim O, Lambden PR, Clarke IN. Translation termination reinitiation between open reading frame 1 (ORF1) and ORF2 enables capsid expression in a bovine norovirus without the need for production of viral subgenomic RNA. *Journal of virology*. 2008;82(17):8917-21.
88. Ng KK, Pendas-Franco N, Rojo J, Boga JA, Machin A, Alonso JM, et al. Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(16):16638-45.
89. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*. 1990;250(4987):1580-3.



90. Thorne L, Bailey D, Goodfellow I. High-resolution functional profiling of the norovirus genome. *Journal of virology*. 2012;86(21):11441-56.
91. Lin X, Thorne L, Jin Z, Hammad LA, Li S, Deval J, et al. Subgenomic promoter recognition by the norovirus RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic acids research*. 2015;43(1):446-60.
92. Yunus MA, Lin X, Bailey D, Karakasiliotis I, Chaudhry Y, Vashist S, et al. The murine norovirus core subgenomic RNA promoter consists of a stable stem-loop that can direct accurate initiation of RNA synthesis. *Journal of virology*. 2015;89(2):1218-29.
93. Nayak MK, Chatterjee D, Nataraju SM, Pativada M, Mitra U, Chatterjee MK, et al. A new variant of Norovirus GII.4/2007 and inter-genotype recombinant strains of NVGII causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(3):223-9.
94. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, et al. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *Journal of medical virology*. 2006;78(7):971-8.
95. Wang YH, Zhou DJ, Zhou X, Yang T, Ghosh S, Pang BB, et al. Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. *Archives of virology*. 2012;157(12):2417-24.
96. Mans J, Murray TY, Taylor MB. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. *Virology journal*. 2014;11:168.
97. Simon-Loriere E, Holmes EC. Why do RNA viruses recombine? *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(8):617-26.
98. Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Complete genome characterization of Genogroup II norovirus strains from India: Evidence of recombination in ORF2/3 overlap. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2010;10(7):1101-9.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**ภาคผนวก ก**  
**การเตรียมสารเคมี**

1. 1X PBS buffer

- PBS tablets 10 tablets
- Distilled water 1,000 ml

จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไป autoclave

2. 5X Tris Borate Buffer (5X TBE)

- Tris base 54 g
- Boric acid 27.5 g
- EDTA 4.16 g

จากนั้นเติม Distilled water ปริมาตร 1,000 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. Dep C water

- Dep C 0.1 ml
- Distilled water 100 ml

เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไป autoclave

4. Reverse Transcription Mixture

- Improm II buffer 4.0  $\mu$ l
- Improm II RT 1.0  $\mu$ l
- 10  $\mu$ M dNTP 2.5  $\mu$ l
- RNase inhibitor 1.0  $\mu$ l

ภาคผนวก ข  
ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

No.	Year	Code	Age	sex	Genotyping	
					RdRp	VP1
1	2009	B387	3m	M	GII-21	GII-3
2	2009	B394	6y	F	GII-21	GII-3
3	2009	B402	6m	F	GII-21	GII-3
4	2009	B420	6m	F	GII-3	-
5	2009	B433	1y	F	GII-3	GII-3
6	2009	B443	1.2y	M	GII-3	GII-3
7	2009	B450	1.2y	M	GII-3	GII-3
8	2009	B535	7m	M	GII-3	GII-3
9	2009	B541	9m	M	GII-4	GII-4
10	2009	B543	3m	F	GII-4	-
11	2009	B550	7m	M	GII-3	-
12	2009	B568	12y	M	GII-4	-
13	2009	B628	1y	F	GII-4	-
14	2009	B630	1y	M	GII-4	GII-4
15	2009	B635	1y	M	GII-4	GII-4
16	2009	B636	1y	M	GII-4	GII-4
17	2009	B637	1y	M	GII-4	GII-4
18	2009	B639	1y	M	GII-4	GII-4
19	2009	B640	1y	F	GII-4	GII-4
20	2009	B641	1y	M	GII-4	GII-4
21	2009	B642	1y	F	GII-4	GII-4
22	2009	B643	1y	M	GII-4	GII-4
23	2009	B644	1y	F	GII-4	GII-4
24	2009	B646	10m	M	GII-4	GII-4
25	2009	B652	1y	M	GII-4	GII-4
26	2009	B653	9m	M	GII-4	GII-4

27	2009	B657	1y	F	GII-4	-
28	2009	B660	2y	F	GII-4	GII-4
29	2009	B662	2y	M	GII-4	-
30	2009	B663	1y	M	GII-4	GII-4
31	2009	B665	11m	F	GII-4	GII-4
32	2009	B667	1y	M	GII-4	-
33	2009	B669	1y	M	GII-4	GII-4
34	2009	B671	4y	F	GII-4	GII-4
35	2009	B672	9m	F	GII-4	GII-4
36	2009	B679	9m	M	GII-7	GII-7
37	2009	B680	1.5y	M	GII-4	GII-4
38	2009	B682	1y	M	GII-4	GII-4
39	2009	B684	1y	M	GII-4	GII-4
40	2009	B685	1y	F	GII-4	GII-4
41	2009	B690	1y	F	GII-4	GII-4
42	2009	B691	1y	F	GII-4	GII-4
43	2009	B693	1.3y	M	GII-4	GII-4
44	2009	B696	11m	F	GII-4	-
45	2010	B698	7m	M	GII-4	-
46	2010	B713	1m	M	GII-4	-
47	2010	B714	1.5y	M	GII-4	GII-4
48	2010	B719	1y8m	F	GII-4	-
49	2010	B725	1y	F	GII-4	-
50	2010	B732	1m	F	GII-4	-
51	2010	B850	5m	M	GII-2	GII-2
52	2010	B852	5m	M	GII-2	GII-2
53	2010	B865	5m	M	GII-2	GII-2
54	2009	B882	1y	F	GII-4	GII-4
55	2010	B898	2.1y	F	GII-7	GII-7
56	2010	B909	2.9y	M	GII-21	GII-21

57	2010	B913	1m	M	GII-3	-
58	2010	B917	2.2y	M	GII-12	GII-12
59	2010	B928	1.2y	M	GII-21	GII-21
60	2010	B955	4y	M	GII-4	GII-4
61	2011	B969	1y	M	GII-6	-
62	2011	B1028	1y1m	F	GII-12	-
63	2011	B1049	2y	F	GII-12	GII-12
64	2011	B1050	1y	M	GII-12	-
65	2011	B1092	7m	F	GII-4	-
66	2011	B1184	1y4m	F	GII-4	-
67	2011	B1186	1y	F	GII-14	GII-14
68	2011	B1201	2y	F	GII-4	GII-4
69	2011	B1207	1y	M	GII-4	-
70	2011	B1214	1.7y	M	GII-4	GII-4
71	2011	B1215	1.4y	M	GII-4	GII-4
72	2011	B1216	3y	M	GII-4	GII-4
73	2011	B1223	10m	M	GII-4	-
74	2011	B1224	10m	F	GII-4	-
75	2011	B1229	1y5m	F	GII-4	-
76	2011	B1230	1y11m	M	GII-4	-
77	2011	B1232	1y6m	M	GII-4	-
78	2011	B1233	9m	F	GII-4	-
79	2011	B1235	1y	M	GII-4	-
80	2011	B1236	1m	M	GII-4	-
81	2011	B1238	1y1m	M	GII-4	GII-4
82	2011	B1248	1y4m	M	GII-4	-
83	2011	B1250	7m	F	GII-4	GII-4
84	2011	B1254	10m	M	GII-12	-
85	2011	B1255	1y3m	M	GII-4	GII-4
86	2011	B1256	9y9m	F	GII-4	-

87	2011	B1259	8m	M	GII-4	GII-4
88	2011	B1260	4m	M	GII-4	GII-4
89	2011	B1261	3y	M	GII-4	GII-4
90	2011	B1263	2y	M	GII-4	GII-4
91	2011	B1265	9m	F	GII-4	GII-4
92	2011	B1266	1y4m	M	GII-4	GII-4
93	2012	B1310	1y	M	GII-12	GII-3
94	2012	B1319	3y	M	GII-12	GII-1
95	2012	B1332	1y	M	GII-4	GII-4
96	2012	B1341	1y1m	F	GII-12	GII-1
97	2012	B1353	9m	M	GII-4	GII-4
98	2012	B1384	3y8m	F	GII-4	-
99	2012	B1507	1y7m	F	GII-3	GII-3
100	2012	B1516	3y	M	GII-12	GII-3
101	2012	B1544	5m	M	GII-4	GII-4
102	2012	B1546	10m	F	GII-4	GII-4
103	2012	B1558	1y1m	M	GII-4	GII-4
104	2012	B1594	1y11m	F	GII-4	GII-4
105	2012	B1603	1y	F	GII-4	-
106	2012	B1649	9m	F	GII-6	GII-6
107	2012	B1650	1y5m	M	GII-4	-
108	2012	B1651	10m	M	GII-4	-
109	2012	B1652	1y1m	F	GII-4	-
110	2012	B1653	9m	F	GII-4	-
111	2012	B1654	2y	F	GII-4	GII-4
112	2012	B1655	7m	M	GII-4	-
113	2012	B1669	1y8m	M	GII-4	-
114	2012	B1671	1y7m	F	GII-4	GII-4
115	2012	B1677	8m	M	GII-3	GII-3
116	2012	B1678	2y	M	GII-4	GII-4

117	2012	B1679	1y1m	F	GII-4	GII-4
118	2012	B1680	7m	F	GII-4	-
119	2013	B1705	4y	M	GII-4	GII-4
120	2013	B1712	3y	M	GII-5	GII-5
121	2013	B1714	5m	F	GII-3	GII-3
122	2013	B1715	5y	M	GII-4	-
123	2013	B1722	6m	M	GII-13	GII-13
124	2013	B1761	1y6m	M	GII-4	-
125	2013	B1801	1y2m	M	GII-4	GII-4
126	2013	B1802	10m	M	GII-6	GII-6
127	2013	B1803	1y7m	M	GII-4	GII-4
128	2013	B1805	1y10m	M	GII-4	GII-4
129	2013	B1806	1y1m	F	GII-4	GII-4
130	2013	B1808	1m	F	GII-4	GII-4
131	2013	B1809	1y3m	F	GII-6	GII-6
132	2013	B1811	1y	F	GII-3	GII-3
133	2013	B1813	2y3m	M	GII-6	GII-6
134	2014	B1852	1y2m	F	GII-4	GII-4
135	2014	B1853	1y4m	M	GII-4	GII-4
136	2014	B1855	10y7m	M	GII-3	GII-3
137	2014	B1864	5m	F	GII-3	GII-3
138	2014	B1868	4m	M	GII-3	GII-3
139	2014	B1936	11m	F	GII-4	GII-4
140	2014	B1943	10m	M	GII-4	GII-4
141	2014	B1944	1y2m	F	GII-4	GII-4
142	2014	B1976	11m	M	GII-4	GII-4
143	2014	B1977	10m	F	GII-4	GII-4
144	2014	B1978	1y	F	GII-4	GII-4
145	2014	B1979	1y	M	GII-4	-
146	2014	B1980	1y	F	GII-4	-



147	2014	B1986	2y	M	GII.4	-
148	2014	B1995	7m	F	GII-17	GII-17
149	2014	CU02	30y	F	GII-17	GII-17
150	2014	CU04	11m	F	GII-17	GII-17



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวทิฆัมพร พุ่มผลทรัพย์

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Tikumporn Phumpholsup

เกิดวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2534

สัญชาติไทย เชื้อชาติไทย ศาสนา พุทธ

สถานภาพ โสด

ที่อยู่ปัจจุบัน 622/102 ถ.บางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150

การศึกษา ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2552-2555

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

ผลงานทางวิชาการ

หัวข้อเรื่อง Human norovirus genogroup II recombinants in Thailand, 2009-2014

ชื่อผู้นิพนธ์ Tikumporn Phumpholsup, Thaweesak Chieochansin, Sompong Vongpunsawad, Viboonsuk Vuthitanachot and Yong Poovorawan

ตีพิมพ์ในวารสาร Archives of Virology

หัวข้อเรื่อง Norovirus outbreak in a daycare center in Bangkok, 2014

ชื่อผู้นิพนธ์ Tikumporn Phumpholsup, Apiradee Theamboonlers, Joshua A. Felber, Suvaporn Anugulruengkitt, Thanyawee Puthanakit, Sirinuch Chomto and Yong Poovorawan

ตีพิมพ์ในวารสาร Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health