

Chulalongkorn University

Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2020

การศึกษาระบาดวิทยาและความหลากหลายทางจีโนมของโรคไวรัสสายพันธุ์
เอ ที่พบในเด็กทารกและเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลัน ใน
ประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562

สิริพัทธ์ พลิชฐ์
คณะแพทยศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>

Recommended Citation

พลิชฐ์, สิริพัทธ์, "การศึกษาระบาดวิทยาและความหลากหลายทางจีโนมของโรคไวรัสสายพันธุ์เอ ที่พบในเด็กทารกและเด็ก
อายุต่ำกว่า 15 ปีที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลัน ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562" (2020). *Chulalongkorn
University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 4536.
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/4536>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for
inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of
Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การศึกษาระบาดวิทยาและความหลากหลายทางจีโนไทป์ของโรคไวรัสสายพันธุ์เอ ที่พบในเด็ก
ทารกและเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลัน ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง

2562



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The prevalence and genotype diversity of Human Rotavirus A circulating in infants and young children less younger 15 years of age with acute gastroenteritis in Thailand from 2016 to 2019



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

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

โดย

น.ส.สิริพัทธ์ พลิชัฐกูร

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงดวงพร วีระวัฒนานนท์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัญญา พงษ์กร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร ชินชัย)

สิริพัทธ์ พลิชฐังกูร : การศึกษาระบาดวิทยาและความหลากหลายทางจีโนไทป์ของ
 ไรต้าไวรัสสายพันธุ์เอ ที่พบในเด็กทารกและเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีที่มีอาการท้องเสีย
 เฉียบพลัน ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562. (The prevalence and genotype
 diversity of Human Rotavirus A circulating in infants and young children less
 younger 15 years of age with acute gastroenteritis in Thailand from 2016 to 2019) อ.
 ที่ปรึกษาหลัก : ศ. นพ.ยง ภู่วรวรรณ

อิวแมนไรต้าไวรัสสายพันธุ์ A (Human Rotavirus A) เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค
 อูจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสียในเด็กทารกและเด็กเล็กทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กอายุ
 น้อยกว่า 5 ปี อีกทั้งยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทยอีกด้วย ในงานวิจัย
 ครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อไรต้าไวรัสในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559
 ถึง 2562 โดยทำการเก็บตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีที่เข้ารับการรักษาด้วย
 อาการท้องเสียระหว่างเดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2559 ถึง เดือนธันวาคม ปีพ.ศ.2562 เป็นจำนวน
 ทั้งสิ้น 2,001 ตัวอย่าง การตรวจวินิจฉัยอิวแมนไรต้าไวรัสสายพันธุ์ A ใช้เทคนิค real-time PCR
 ผลการวิจัยพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไรต้าไวรัสจำนวน 301 ตัวอย่าง (15.0%) กลุ่มอายุผู้ป่วย
 ติดเชื้อไรต้าไวรัสพบมากในช่วงอายุ 0 ถึง 2 ปี โดยอัตราการติดเชื้อไรต้าไวรัสพบมากในช่วง
 เดือนธันวาคมถึงมีนาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาวของประเทศไทย จากการจัดจำแนกสายพันธุ์พบว่า
 สายพันธุ์ไรต้าไวรัสที่พบมากที่สุด คือ สายพันธุ์ G3P[8] (33.6%, 101/301), รองลงมาคือ G8P[8]
 (10.6%, 32/301), G9P[8] (6.3%, 19/301), G2P[4] (6.0%, 18/301) และ G1P[6] (5.3%, 16/301)
 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจพบไรต้าไวรัสสายพันธุ์ที่พบได้น้อยในคน อาทิ G2P[8], G3P[4]
 และ G9P[4] เมื่อทำการวิเคราะห์ในเชิง genetic backbone พบว่า DS-1-like G3P[8] เป็นสายพันธุ์
 ที่พบมากที่สุด (28.2%, 85/301) ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า DS-1-like
 G3P[8] ที่พบในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ DS-1-like G3P[8] ที่พบ
 ในประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก ดังนั้นความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมของเชื้อไรต้าไวรัสที่พบใน
 ประเทศไทยและต่างประเทศควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อเป็นประโยชน์ในการควบคุมการแพร่
 ระบาดของไรต้าไวรัสและการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการระบาดของโรคในอนาคตต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
 ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิติ
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6174081830 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Rotavirus, DS-1-like, Thailand

Siripat Pasittungkul : The prevalence and genotype diversity of Human Rotavirus A circulating in infants and young children less younger 15 years of age with acute gastroenteritis in Thailand from 2016 to 2019. Advisor: Yong Poovorawan

Human rotavirus A (RVA) infection is the primary cause of acute gastroenteritis (AGE) in infants and young children worldwide, especially in children under 5 years of age and is a major public health problem causing severe diarrhea in infants and young children in Thailand. This study aimed to investigate the prevalence, genotype diversity, and molecular characterization of rotavirus infection circulating in infants and young children diagnosed with AGE in Thailand from January 2016 to December 2019. A total of 2001 stool samples were collected from children (neonates to children <15 years of age) and tested for RVA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Amplified products were sequenced and submitted to an online genotyping tool for analysis. Overall, 301 (15.0%) stool samples were positive for RVA. RVA occurred most frequently among children aged 0-24 months. The seasonal incidence of rotavirus infection occurred typically in Thailand during the winter months (December-March). The G3P[8] genotype was identified as the most prevalent genotype (33.2%, 100/301), followed by G8P[8] (10.6%, 32/301), G9P[8] (6.3%, 19/301), G2P[4] (6.0%, 18/301), and G1P[6] (5.3%, 16/301). Uncommon G and P combinations such as G2P[8], G3P[4], G3P[9] and G9P[4] were also detected at low frequencies. In terms of genetic backbone, the unusual DS-1-like G3P[8] was the most frequently detected (28.2%, 85/301), and the phylogenetic analysis demonstrated high nucleotide identity with unusual DS-1-like G3P[8] detected in Thailand and several countries. Therefore, a genetic association between

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ยัง ภู่วรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทและได้ทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ แพทย์หญิง ฉัฐนิช สุทธิธรรม และ แพทย์หญิง ณสมน วรรณสถาพร ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และแก้ไขเนื้อหาในวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญาโทและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัวเป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สิริพัทธ์ พลิช้างกูร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background & Rationale)	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research Questions)	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย (Research Hypothesis)	2
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefit and Applications)	4
1.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรมของการวิจัย (Ethical Consideration)	4
1.8 คำสำคัญ (Key words)	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 เชื้อโรต้าไวรัส (Rotaviruses)	6
2.2 การแพร่กระจายและวงจรชีวิตของเชื้อโรต้าไวรัส	10
2.3 ระบาดวิทยาและความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัส	12
2.4 วัคซีนป้องกันเชื้อโรต้าไวรัส	17
2.5 การวินิจฉัยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่เกิดจากการติดเชื้อโรต้าไวรัส	18

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	20
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)	20
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)	20
3.2.1 การเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส	20
3.2.2 การเตรียมตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยเพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส	20
3.2.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม	21
3.2.4 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส ด้วยเทคนิค Real – Time PCR (qRT-PCR).....	21
3.2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR).....	23
3.2.6 การตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis	25
3.2.7 การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR Purification).....	26
3.2.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	26
3.2.9 ระบุจีโนไทป์ของเชื้อโรคไวรัส (GxP[x]).....	27
3.2.10 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)	27
3.2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	28
4.1 ระบาดวิทยาและความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อโรคไวรัสสายพันธุ์ A ในประเทศไทย.....	28
4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของเชื้อโรคไวรัส ด้วยวิธี Phylogenetic analysis	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ	36
5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	36
บรรณานุกรม	43
ประวัติผู้เขียน	52

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ขนาดของวัคซีนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้สำหรับป้องกันเชื้อโรคไวรัส.....	18
ตาราง 2 แสดงไพรเมอร์สำหรับ VP6 ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค qRT-PCR.....	21
ตาราง 3 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับเทคนิค Real-Time PCR.....	22
ตาราง 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค qRT-PCR	22
ตาราง 5 แสดงไพรเมอร์สำหรับ VP4 และ VP7 ที่ใช้ตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR.....	23
ตาราง 6 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR.....	23
ตาราง 7 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR สำหรับยีน VP4	24
ตาราง 8 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR สำหรับยีน VP6	24
ตาราง 9 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR สำหรับยีน VP7	25

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปภาพ 1 แสดงภาพจำลองโครงสร้างโรต้าไวรัส.....	7
รูปภาพ 2 แสดงภาพอาร์เอ็นเอทั้งหมด 11 ท่อนของโรต้าไวรัส	8
รูปภาพ 3 การแลกเปลี่ยนท่อนรหัสพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ (Gene reassortant).....	9
รูปภาพ 4 วงจรชีวิตของเชื้อโรต้าไวรัส.....	11
รูปภาพ 5 แนวโน้มจำนวนผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อโรต้าไวรัส	12
รูปภาพ 6 การศึกษาในปีพ.ศ. 2559 แสดงอัตราการเสียชีวิตในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสทั่วโลก.....	13
รูปภาพ 7 แนวโน้มสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสทั่วโลกในปีพ.ศ.2553 ถึง 2559.....	14
รูปภาพ 8 แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ปีพ.ศ. 2552 ถึงเดือนพฤษภาคม ปีพ.ศ. 2554	15
รูปภาพ 9 แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ปีพ.ศ. 2554 ถึง เดือนสิงหาคม ปีพ.ศ. 2557	16
รูปภาพ 10 การกระจายอายุของกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อโรต้าไวรัสสายพันธุ์ A ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562	28
รูปภาพ 11 แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2559 ถึง เดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2562	29
รูปภาพ 12 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ I genotype ของเชื้อโรต้าไวรัส	31
รูปภาพ 13 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ G genotype ของเชื้อโรต้าไวรัส	33
รูปภาพ 14 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ P genotype ของเชื้อโรต้าไวรัส	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background & Rationale)

โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสีย ถือเป็นหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญของการป่วยและการเสียชีวิตของคนทั่วโลก โดยเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคท้องเสีย ได้แก่ โรต้าไวรัส โนโรไวรัส เป็นต้น โรต้าไวรัส (Rotavirus) เป็นไวรัสที่มีหลากหลายสายพันธุ์ โดยในปัจจุบันมีการจำแนกสายพันธุ์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ A, B, C, D, E, F, G, H, I และ J [1] โดยสายพันธุ์ที่พบในคน ได้แก่ สายพันธุ์ A, B, C และ H แต่อย่างไรก็ตาม โรต้าไวรัสสายพันธุ์ A เป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสียในคน เนื่องด้วยเหตุที่เชื้อโรต้าไวรัสมีหลายสายพันธุ์จึงทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสติดเชื้อซ้ำได้หลายครั้ง [2] มักพบอาการรุนแรงในเด็กเล็ก โดยเฉพาะเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี อาการโดยทั่วไปมีตั้งแต่ ถ่ายเหลว สูญเสียน้ำ อาเจียน หรืออาเจียนรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ด้วยเหตุนี้หลายประเทศจึงมีการใช้วัคซีนป้องกันโรต้าไวรัส แต่อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนส่วนใหญ่อยู่ในประเทศที่พัฒนาแล้ว ส่วนประเทศกำลังพัฒนาโรต้าไวรัสยังเป็นปัญหาอยู่ [3] การศึกษานี้จึงให้ความสำคัญต่อการศึกษาระบาดวิทยา การวิเคราะห์การแพร่กระจาย การจัดจำแนกสายพันธุ์ และ molecular characterization ของเชื้อโรต้าไวรัสในช่วงปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 โดยแบ่งแนวทางการศึกษาดังต่อไปนี้

1. การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อโรต้าไวรัสให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้ Real – time PCR ที่จำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อโรต้าไวรัส ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัดเวลาและสามารถแยกกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสที่พบในคนได้
2. การศึกษาเชื้อโรต้าไวรัสในระดับโมเลกุลด้วยวิธี bioinformatics analysis การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อโรต้าไวรัสเพื่อศึกษาความหลากหลายของแต่ละสายพันธุ์

3. การวิเคราะห์ความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อโรต้าไวรัสที่ตรวจพบ การติดเชื้อโรต้าไวรัสเมื่อติดเชื้อแล้วสามารถติดเชื้อซ้ำได้อีก เนื่องจากโรต้าไวรัสสามารถเกิด reassortment ซึ่งทำให้ไวรัสมีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูง โดยการติดเชื้อในครั้งที่สอง สาม หรือครั้งถัดไป มักจะไม่ใช่อสายพันธุ์เดียวกับที่ติดครั้งแรก ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาและแยกแยะสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสเพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการติดเชื้อในอนาคตได้

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Questions)

1. การระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสในเด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปีในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 มีแนวโน้มเป็นอย่างไร
2. ความหลากหลายทางจีโนไทป์ของเชื้อโรต้าไวรัสที่พบในเด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปี มีความเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร

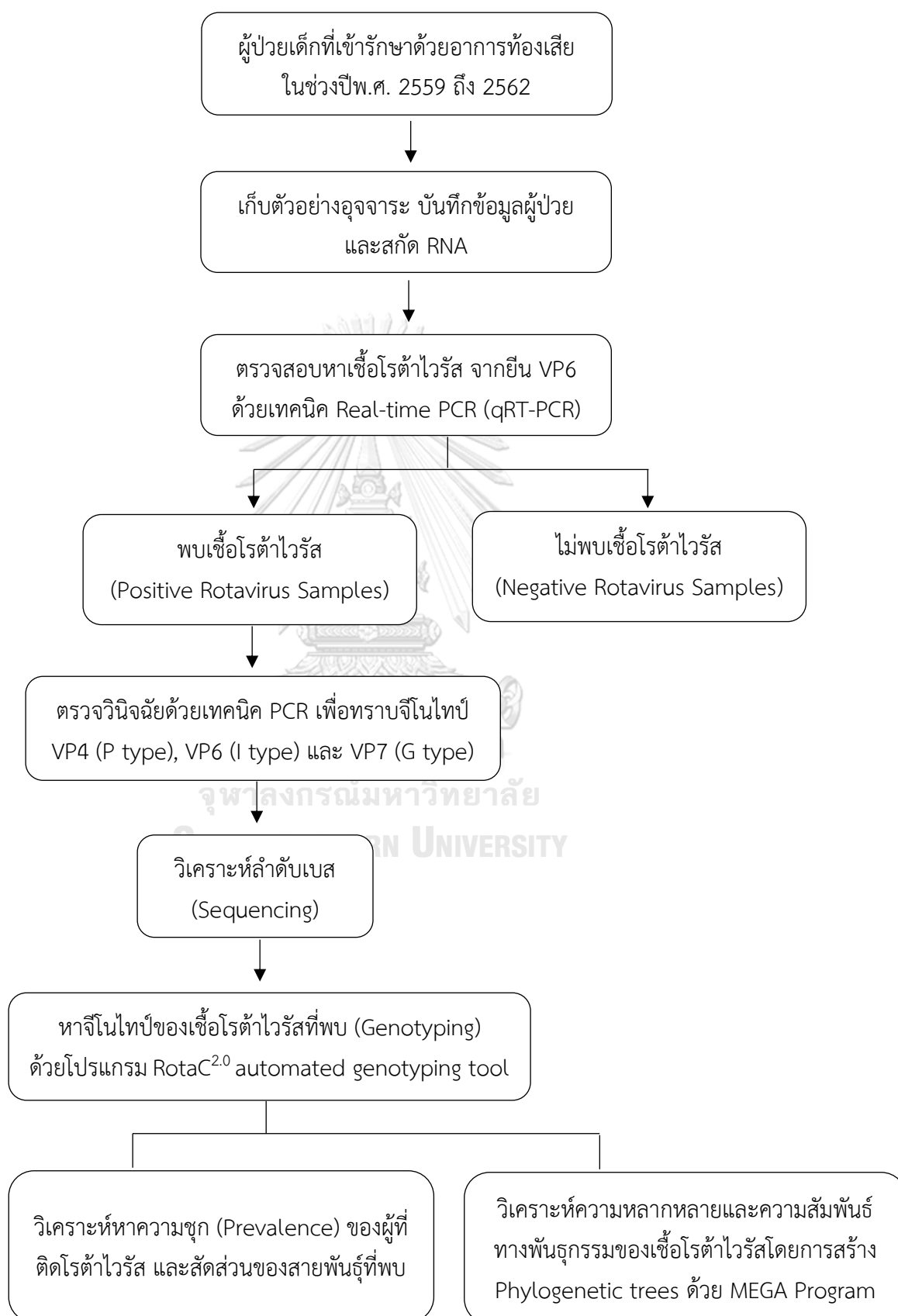
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

- 1 ศึกษาความชุกของการติดเชื้อโรต้าไวรัสในเด็กทารกและเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลัน ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562
- 2 วิเคราะห์ความหลากหลายทางจีโนไทป์ของโรต้าไวรัสที่พบในเด็กทารกและเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562

1.4 สมมติฐานของการวิจัย (Research Hypothesis)

1. ประเทศไทยมีการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสที่เหมือนกับประเทศต่างๆ หรือไม่
2. ถ้าพบการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสในเด็กในประเทศไทยแล้ว สายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสที่พบอาจมีความใกล้เคียงกับที่ระบาดทั่วโลกในระยะเวลาเดียวกัน หรือไม่

1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual framework)



1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefit and Applications)

1. ทราบความชุกของการติดเชื้อโรต้าไวรัสที่พบในทารกและเด็กในประเทศไทย
2. ทราบแนวโน้มของสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัส ที่กำลังระบาดในประเทศไทย
3. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ถูกนำไปเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ Genbank, NCBI เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงแก่งานวิจัยอื่นได้

1.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรมของการวิจัย (Ethical Consideration)

ใช้หลักจริยธรรมการทาวิจัยในคนทั่วไป ประกอบด้วย 3 หลัก ดังนี้

หลักความเคารพในบุคคล (Respect of person)

เคารพในศักดิ์ศรีความเป็นมนุษย์ โดยจะมีการให้ข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยแก่ผู้เข้าร่วมโครงการโดยไม่ปิดบัง และเคารพการตัดสินใจของการผู้เข้าร่วมโครงการ โดยปราศจากการบังคับหรือโน้มน้าว ผู้ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องลงลายมือชื่อลงในใบยินยอม (informed consent) ก่อนที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย นอกจากนี้แล้ว จะเคารพความเป็นส่วนตัวของผู้เข้าร่วมโครงการโดยเก็บรักษาข้อมูลส่วนตัวไว้เป็นความลับอย่างเคร่งครัด สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ จะขอใช้ตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลัน (Stool samples) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลบางปะกอก 1 โรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล โรงพยาบาลชุมแพ และโรงพยาบาลกรุงเทพฯ - พิชญ์โลก ที่ถูกส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักคุณประโยชน์ ไม่ก่ออันตราย (Beneficence)

จากการประเมินความเสี่ยง/อันตรายที่อาจเกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่าไม่มีผลเสียที่อาจจะส่งผลกระทบต่อผู้เข้าร่วมโครงการ และถึงแม้ว่าจะไม่มีผลประโยชน์โดยตรงต่อผู้ป่วย แต่งานวิจัยนี้อาจนำไปต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ในอนาคตได้

หลักความยุติธรรม (Justice)

การให้ความเป็นธรรม จะสามารถประเมินได้จากเกณฑ์การตัดเข้าของผู้เข้าร่วมโครงการมีความชัดเจน และไม่มีอคติในการเลือก นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ไม่ได้แสวงหาผลประโยชน์เพื่อบุคคลใดบุคคลหนึ่งแต่เป็นการศึกษาที่มุ่งหวังให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ในอนาคต

1.8 คำสำคัญ (Key words)

Rotavirus, Acute gastroenteritis, Children, DS-1-like, Thailand

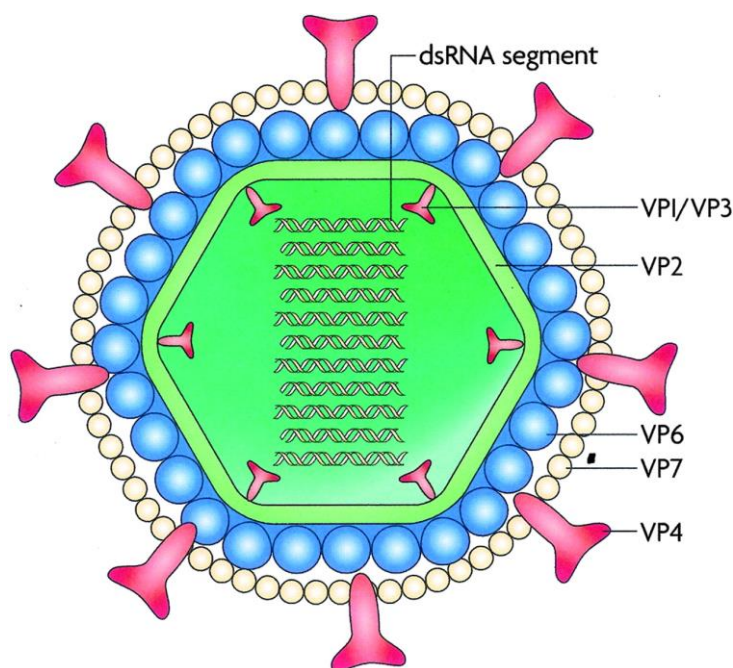


บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อโรต้าไวรัส (Rotaviruses)

เชื้อโรต้าไวรัส (Rotavirus) เป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสียในเด็ก โดยเฉพาะในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี อาการโดยทั่วไปมีตั้งแต่ ถ่ายเหลว สูญเสียน้ำ อาเจียน หรืออาเจียนรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ด้วยเหตุนี้หลายประเทศจึงมีการใช้วัคซีนป้องกันโรต้าไวรัส แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีการประกาศใช้วัคซีนของโรต้าไวรัส แต่ในปีค.ศ. 2016 ยังคงมีรายงานการเสียชีวิตจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีอยู่ประมาณ 128,500 คนทั่วโลก [1, 4] โรต้าไวรัสจัดอยู่ในวงศ์ *Reoviridae* และอยู่ในสกุล *Rotavirus* [5] ขนาดจีโนมของโรต้าไวรัส มีขนาดประมาณ 18.5 กิโลเบส มีลักษณะเป็น double-stranded RNA และประกอบด้วย 11 segment ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 6 ตัว (VP1-VP4, VP6 และ VP7) และไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง 5 ตัว (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 หรือ NSP6) เนื่องจากความไวของปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (serological reactivity) และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic variability) ของโปรตีน VP6 (intermediate protein) โรต้าไวรัสถูกจัดจำแนกออกเป็น 10 สายพันธุ์ ได้แก่ A, B, C, D, E, F, G, H, I และ J [1] โครงสร้างของโรต้าไวรัสประกอบด้วย 3 ชั้น (triple-layered structure) ได้แก่ โครงสร้างส่วนที่เป็นแกน โครงสร้างชั้นใน และโครงสร้างชั้นนอก (ภาพที่ 1) โดยโครงสร้างชั้นนอกของโรต้าไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 2 ตัว คือ VP4 (P type, protease sensitive) และ VP7 (G type, glycoprotein) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกจีโนมของโรต้าไวรัส เนื่องจากโปรตีนสองตัวนี้อยู่บริเวณผิวนอกของโครงสร้าง อีกทั้งยังทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนเป้าหมายและมีความสามารถในการกระตุ้น neutralizing antibodies ในผู้ที่ติดเชื้อได้ [6]



รูปภาพ 1 แสดงภาพจำลองโครงสร้างโรต้าไวรัส [7]

หนึ่งในสาเหตุที่ทำให้โรต้าไวรัสเกิดการระบาดขึ้นได้ในทุกปี อาจเกิดขึ้นจากลักษณะของสารพันธุกรรมที่เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่และมีลักษณะเป็นท่อน ซึ่งมีทั้งหมด 11 ท่อน ประกอบด้วย VP1 VP2 VP3 VP4 VP6 VP7 NSP1 NSP2 NSP3 NSP4 และ NSP5 หรือ NSP6 (ภาพที่ 2)

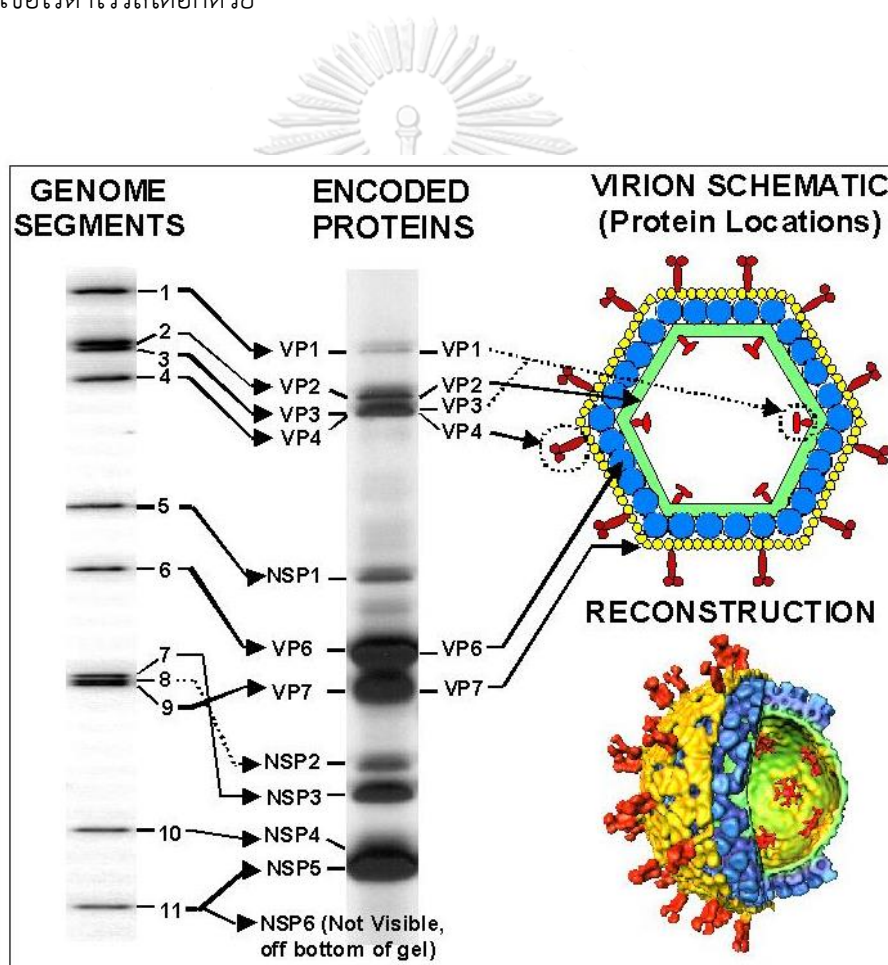
สารพันธุกรรมท่อนที่ 1 และ 3 แปลรหัสให้โปรตีน VP1 (RNA-dependent RNA polymerase) และ VP3 (Methyltransferase) มีขนาดประมาณ 3,320 และ 2591 เบส ตามลำดับ โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการถอดรหัส (transcription) และการจำลองตัวเอง (replication)

สารพันธุกรรมท่อนที่ 2 แปลรหัสให้โปรตีน VP2 หรือ Core protein เป็นโปรตีนที่สร้างแกนโครงสร้างของโรต้าไวรัส และมีขนาดประมาณ 2,690 เบส

สารพันธุกรรมท่อนที่ 4 และ 9 แปลรหัสให้โปรตีน VP4 (Protease-sensitive) และ VP7 (Glycosylated) มีขนาดประมาณ 1,000 - 2,500 เบส โดยทั้งสองโปรตีนอยู่บริเวณผิวนอกของโครงสร้างโรต้าไวรัส ซึ่งทำหน้าที่จับกับโปรตีนเป้าหมายและมีการกระตุ้น neutralizing antibodies ในผู้ที่ติดเชื้อ

สารพันธุกรรมท่อนที่ 5, 7, 8, 10 และ 11 แปลรหัสให้โปรตีน NSP1 (Interferon Antagonist), NSP2 (NTPase), NSP3 (Translation enhancer), NSP4 (Enterotoxin) และ NSP5 (phosphoprotein) หรือ NSP6 มีขนาดประมาณ 700 – 1,800 เบส ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่อยู่ในกลุ่ม non-structural proteins ที่ทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการเพิ่มจำนวนของโรต้าไวรัส

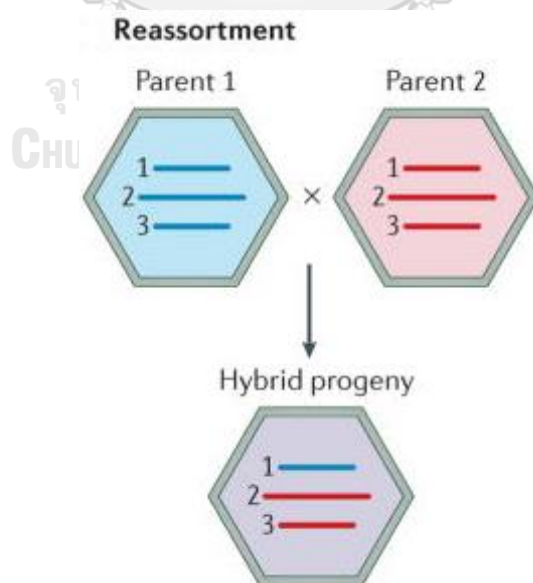
สารพันธุกรรมท่อนที่ 6 แปลรหัสให้โปรตีน VP6 หรือ Intermediate protein เป็นโปรตีนที่อยู่ในภายในโครงสร้างโรต้าไวรัส มีความอนุรักษ์มากกว่า โปรตีน VP4 และ VP7 ซึ่งทำให้โปรตีน VP6 ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อโรต้าไวรัสด้วยวิธี Real-time PCR อีกทั้งโปรตีน VP6 ยังใช้ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสได้อีกด้วย



รูปภาพ 2 แสดงภาพอาร์เอ็นเอทั้งหมด 11 ท่อนของโรต้าไวรัส [7]

โดย RCWG (Rotavirus Classification Working Group) ได้จำแนกการเรียกสายพันธุ์ตามสารพันธุกรรมทั้ง 11 ท่อน คือ VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4- NSP5/6 โดยเรียกเป็น Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx ซึ่งในปัจจุบันมีสายพันธุ์หลัก 2 สายพันธุ์คือ I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 เรียกว่าสายพันธุ์ Wa-like ซึ่งมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับคนและหมู และสายพันธุ์ I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 เรียกว่า DS-1-like ซึ่งมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับวัวและในปัจจุบันยังมีอีก 1 สายพันธุ์ที่เรียกว่า AU-1-like ที่มีสายพันธุ์เป็น I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 ซึ่งมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับแมว [8] [9] ในปัจจุบันมี 36 G, 51 P, 26 I, 22 R, 20 C, 20 M, 31 A, 22 N, 22 T, 27 E, และ 22 H genotypes ในคนและสัตว์ทั่วโลก โดย G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], และ G12P[8] เป็น G-P genotype ของโรต้าไวรัสที่พบในคนเป็นส่วนใหญ่ [1, 10]

ความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของโรต้าไวรัสเกิดจากการแลกเปลี่ยนท่อนรหัสพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ หรือที่เรียกว่า Gene reassortment โดยโรต้าไวรัสมีสารพันธุกรรมที่มีลักษณะเป็นท่อน จำนวน 11 ท่อนที่เป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นเมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส 2 สายพันธุ์ ในเซลล์เจ้าบ้านเดียวกัน ก็จะทำให้ไวรัสสามารถแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (Genetic reassortment) กลายเป็นไวรัสสายพันธุ์ลูกผสม (Reassortment virus) ซึ่งมีสารพันธุกรรมแบบผสมผสาน ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากเชื้อไวรัสตั้งต้น (ภาพที่ 3) ซึ่งในร่างกายจะไม่มีระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะกับตัวไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ เป็นผลทำให้อาจมีการระบาดของเชื้อไวรัสอย่างกว้างขวาง (Epidemic outbreak) [11]

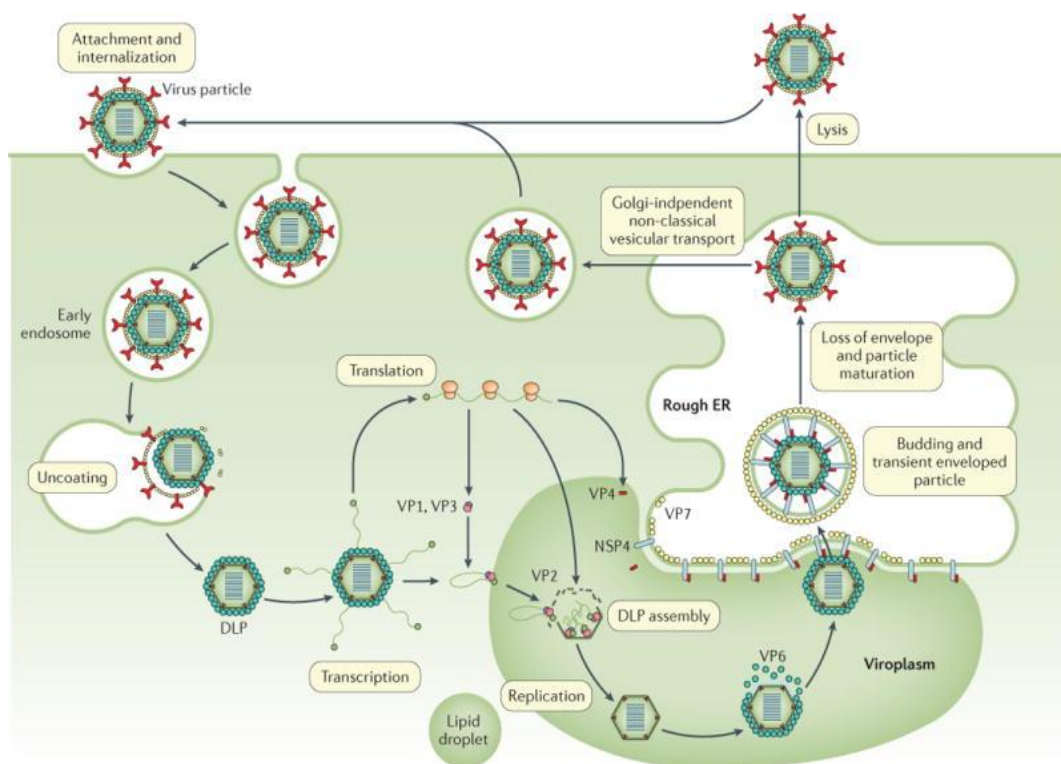


รูปภาพ 3 การแลกเปลี่ยนท่อนรหัสพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ (Gene reassortment) [11]

2.2 การแพร่กระจายและวงจรชีวิตของเชื้อโรต้าไวรัส

การแพร่กระจายของเชื้อโรต้าไวรัส เกิดขึ้นได้ทั้งจากคนสู่คน สัตว์สู่คน (zoonosis) และจากคนสู่สัตว์ได้ในบางสายพันธุ์ (reverse zoonosis) โดยเชื้อโรต้าไวรัสมีวิธีการแพร่ระบาดผ่านการปนเปื้อนเชื้อไวรัสในอาหาร น้ำดื่ม การสัมผัส ผ่านเข้าทางช่องปาก โดยเชื้อจะไปเจริญอยู่ที่ผนังลำไส้ ก่อให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุผนังลำไส้ ทำให้ไม่สามารถดูดซึมน้ำหรือสารอาหารได้ เกิดเป็นอาการท้องเสียเฉียบพลัน และสามารถแพร่ กระจายเชื้อสู่ผู้อื่นได้ทางอุจจาระ หรือที่เรียกว่า fecal-oral route [12]

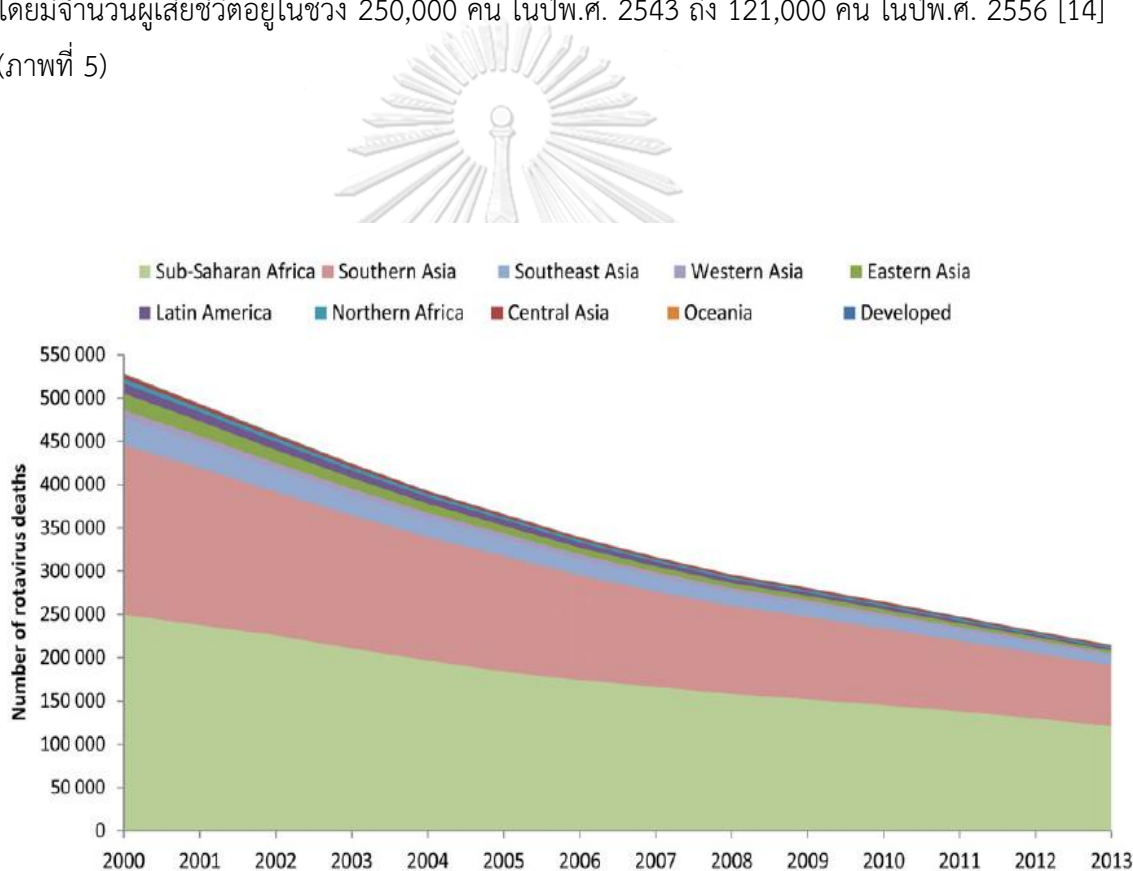
ในขั้นแรกเชื้อไวรัสจะจับกับเซลล์ของเจ้าบ้าน โดยอาศัยหลักการจับกันของโปรตีน VP4 (Protease-sensitive) บนเปลือกผิวของไวรัส กับ sialo-glycans หรือ histo-blood group antigens (HBGAs) บนผิวเซลล์ของเจ้าบ้าน ซึ่งการจับกันระหว่าง VP4 และ sialo-glycans หรือ HBGAs นั้น จะเหนี่ยวนำให้เกิดการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis กลายเป็น endosome อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งระดับความเข้มข้นของแคลเซียมที่ต่ำใน endosome เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนโครงสร้างชั้นนอกของโรต้าไวรัส (VP4 และ VP7) เหลือเป็นโครงสร้างสองชั้นคือ ส่วนที่เป็นแกน และส่วนที่เป็นโปรตีนชั้นใน (double-layered particle (DLP) เข้าสู่กระบวนการ transcription เพื่อสร้าง viral mRNA และการจำลองตัวเอง (replication) โดย viral mRNA จะถูกนำไปใช้ในการสร้าง viral protein ผ่านกระบวนการ translation หรือถูกนำไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับการสร้างสารพันธุกรรมสายลบในกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส (genome replication) และเมื่อองค์ประกอบพร้อมที่จะสร้างไวรัสอนุภาคใหม่ ไวรัสจะเกิดกระบวนการประกอบอนุภาค DLP ขึ้นมาใหม่ภายใน viroplasm ต่อมา DLP ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จะจับกับโปรตีน NSP4 เพื่อทำหน้าที่เป็น intracellular receptor และแบ่งตัวเข้าไปยัง endoplasmic reticulum (ER) และเกิด transient enveloped particle ขึ้นรอบ ๆ DLP-NSP4 complex ต่อมาเกิดการสลายตัวของ transient enveloped particle และโปรตีน NSP4 เหนี่ยวนำให้ VP4 และ VP7 มาประกอบรวมกับ DLP เกิดเป็น Triple-layered particle (TLP) ที่โตเต็มวัย หลังจากนั้นไวรัสสามารถแพร่กระจายไวรัสออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้โดยกระบวนการ Cell lysis หรือกระบวนการ Golgi-independent non-classical และกระบวนการ vesicular transport mechanism สำหรับเซลล์ชนิด polarized epithelial cells (ภาพที่ 4) [1, 13]



รูปภาพ 4 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัส [1]

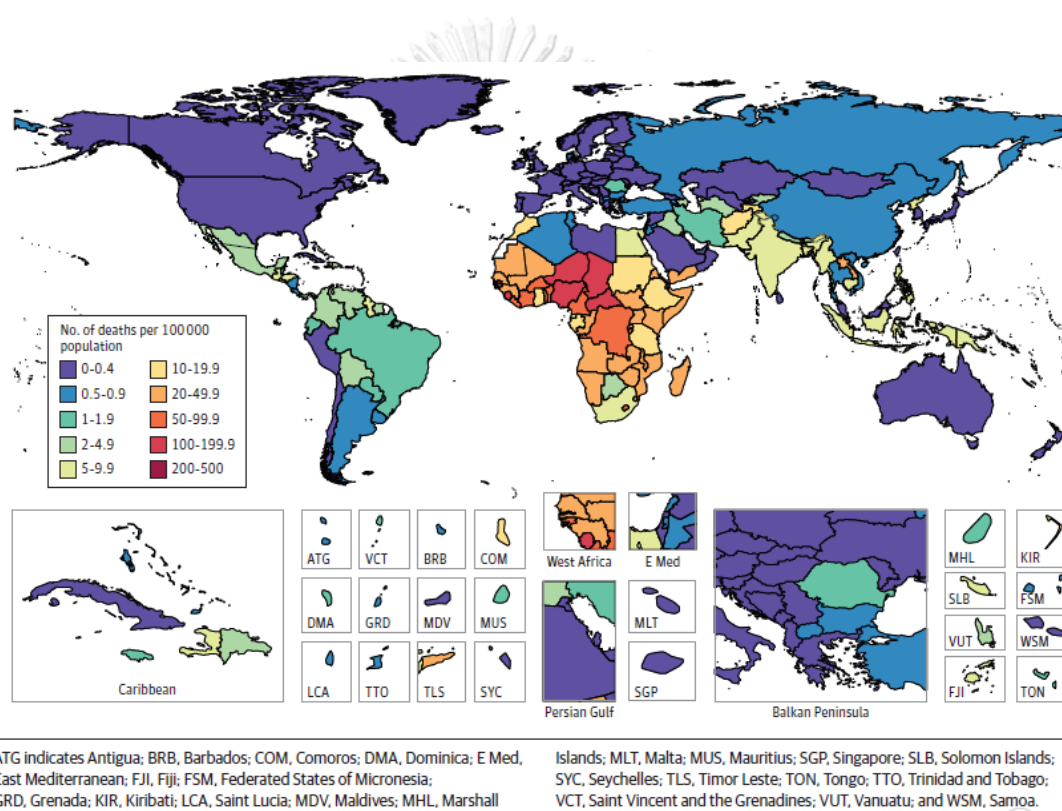
2.3 ระบาดวิทยาและความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัส

โรต้าไวรัสเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสีย ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการป่วยและการเสียชีวิตของคนทั่วโลก การติดเชื้อโรต้าไวรัสมักเกิดในเด็ก โดยเฉพาะเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2543 ถึง 2556 มีการรายงานการเสียชีวิตจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ประมาณ 528,000 คนทั่วโลก (42.5%) ในปีพ.ศ. 2543 และค่อยๆลดลงจนในปีพ.ศ.2556 พบจำนวนผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสอยู่ที่ 215,000 คน (37.3%) นอกจากนี้อัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสพบมากที่สุดในแอฟริกาใต้สะฮารา โดยมีจำนวนผู้เสียชีวิตอยู่ในช่วง 250,000 คน ในปีพ.ศ. 2543 ถึง 121,000 คน ในปีพ.ศ. 2556 [14] (ภาพที่ 5)



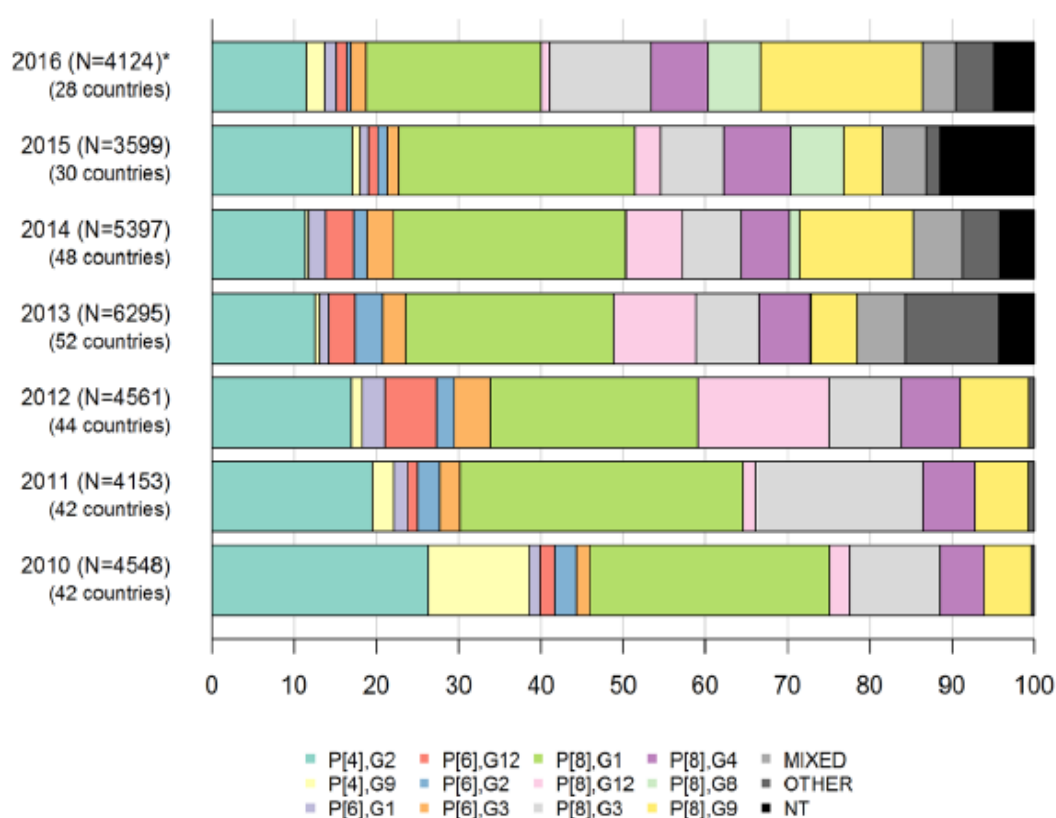
รูปภาพ 5 แนวโน้มจำนวนผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อโรต้าไวรัส [14]

ต่อมาในปีพ.ศ. 2558 และ 2559 มีรายงานการเสียชีวิตจากการติดเชื้อโรคไวรัสในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ประมาณ 146,500 คน และ 128,500 คน ตามลำดับ อีกทั้งพบอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อโรคไวรัสพบมากที่สุดใน แอฟริกาใต้สะฮารา, เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียใต้ แต่ต่ำมากในแถบยุโรป (ภาพที่ 6) [4] ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าเด็กที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อโรคไวรัสมากกว่า 90% มักอาศัยอยู่ในประเทศที่รายได้น้อย อาจเป็นเพราะปัจจัยต่าง ๆ อาทิ ขาดการเข้าถึงทางด้านสาธารณสุข ขาดการรักษาอันเนื่องจากการสูญเสียน้ำในร่างกาย หรือ ขาดสารอาหารซึ่งทำให้อ่อนแอ ภูมิคุ้มกันต่ำ เป็นผลให้ร่างกายสามารถติดเชื้อได้ง่าย [1]



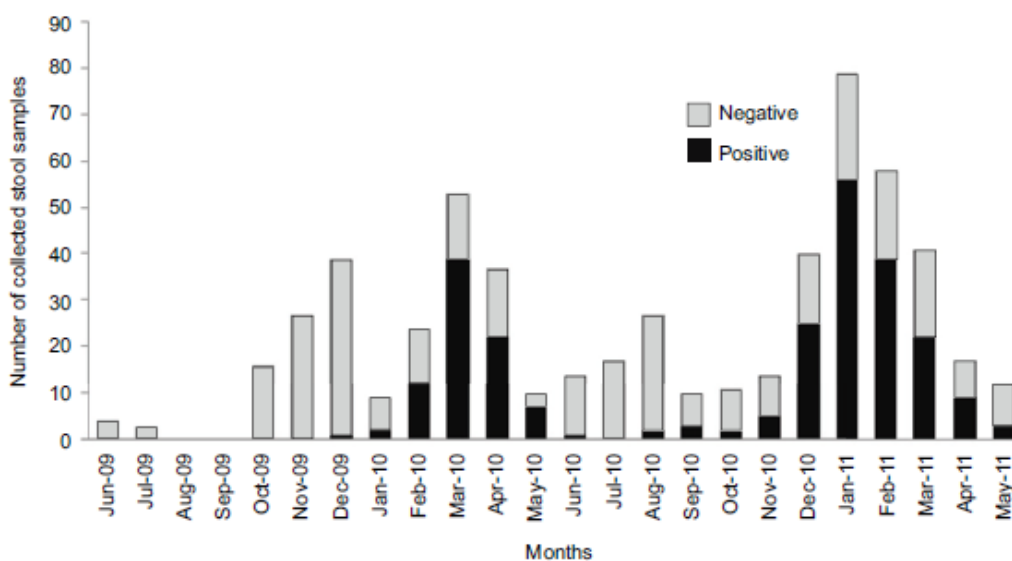
รูปภาพ 6 การศึกษาในปีพ.ศ. 2559 แสดงอัตราการเสียชีวิตในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อโรคไวรัสทั่วโลก [4]

ในการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อโรคไวรัส พบว่า G-Genotypes ที่พบมากในคนคือ G1, G2, G3, G4, G9 และ G12 ส่วน P-genotypes คือ P[4], P[6] และ P[8] โดยโรคไวรัสสายพันธุ์ G1P[8] เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดทั่วโลก ในขณะที่ G9P[6] และ G12P[6], G2P[6] และ G8P[6] พบมากในเอเชียใต้และแอฟริกาใต้สะฮารา ตามลำดับ [15] ในปีพ.ศ. 2561 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้รายงานความหลากหลายทางสายพันธุ์ของโรคไวรัส ตั้งแต่ปีพ.ศ.2553 ถึง 2559 พบว่า G1P[8] เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ G2P[4] และ G3P[8] ตามลำดับ [16] (ภาพที่ 7)

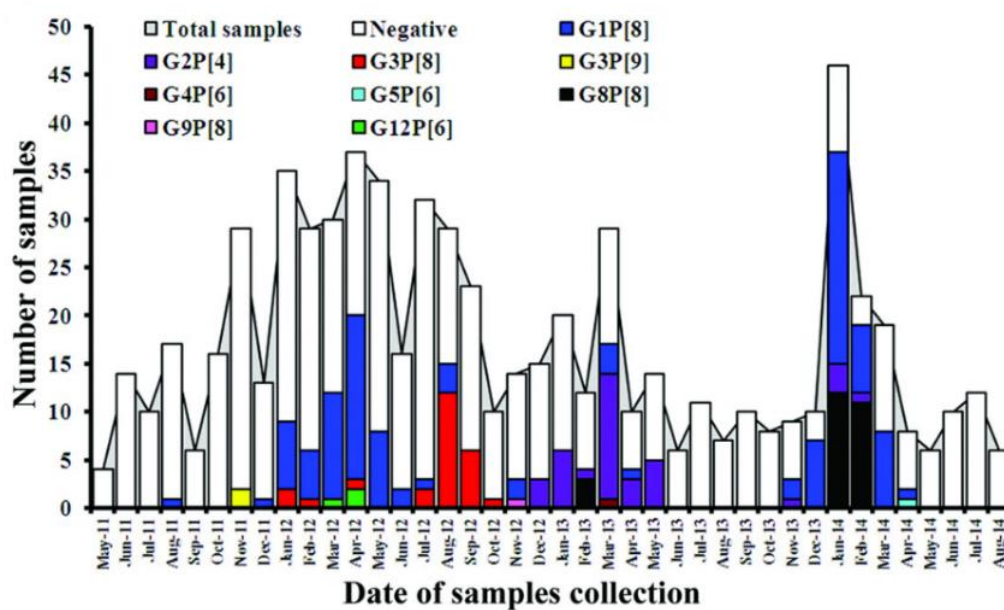


รูปภาพ 7 แนวโน้มสายพันธุ์ของเชื้อโรคไวรัสทั่วโลกในปีพ.ศ.2553 ถึง 2559 [16]

การศึกษาระบาดวิทยาของการติดเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทย พบว่าตั้งแต่เดือนมิถุนายน ปีพ.ศ. 2552 ถึง เดือนพฤษภาคม ปีพ.ศ. 2554 มีเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีติดเชื้อโรต้าไวรัส มากถึงร้อยละ 44.5 และการศึกษาพบว่าเด็กที่มีอายุช่วง 6 – 12 เดือนเกิดการติดเชื้อโรต้าไวรัสมากที่สุด โดยสายพันธุ์ที่พบมากคือ G3P[8], G1P[8] และ G2P[4] ตามลำดับ [17] ต่อมาในช่วงเดือน พฤษภาคม ปีพ.ศ.2554 ถึง เดือนสิงหาคม ปีพ.ศ. 2557 พบการติดเชื้อโรต้าไวรัส ร้อยละ 30 ซึ่งลดลงกว่าในปีก่อนหน้า การติดเชื้อโรต้าไวรัสพบมากในเด็กอายุ 6 เดือน ถึง 5 ปี และสายพันธุ์ที่พบมากคือ G1P[8], G2P[4] และ G3P[8] ตามลำดับ [18] โดยปกติแล้วจะพบการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสในฤดูหนาว [2] และการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย พบการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสมากที่สุดในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนกุมภาพันธ์ และค่อยๆ ลดลงจนถึงเดือนพฤษภาคม (ภาพที่ 8 และ ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นเดือนที่ประเทศไทยมีอากาศเย็น อีกทั้งการที่พบเชื้อโรต้าไวรัสมากในเด็กอายุ 6 เดือนถึง 5 ปี เป็นเพราะเด็กมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อต่ำ



รูปภาพ 8 แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ปีพ.ศ. 2552 ถึง เดือนพฤษภาคม ปีพ.ศ. 2554 [17]



รูปภาพ 9 แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อโรคไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2554 ถึง เดือนสิงหาคม ปีพ.ศ. 2557 [18]

2.4 วัคซีนป้องกันเชื้อโรต้าไวรัส

วัคซีนป้องกันเชื้อโรต้าไวรัสเป็นวัคซีนที่ให้ทางรับประทาน (oral vaccine) โดยในอดีตเคยได้มีการนำวัคซีน Tetravalent Rhesus Rotavirus Vaccine หรือมีชื่อการค้าว่า Rotashields™ มาใช้ ซึ่งผลิตจากเชื้อโรต้าไวรัสของลิง มีคุณสมบัติเหมือนโรต้าไวรัสสายพันธุ์ G3 ในมนุษย์ แล้ว reassorted กับโรต้าไวรัสของมนุษย์สายพันธุ์ G1, G2 และ G4 วัคซีนให้โดยการรับประทาน 3 ครั้ง ในเด็กอายุ 2, 4 และ 6 เดือน มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรต้าไวรัสได้โดยรวมร้อยละ 46-68 และสามารถป้องกันการเกิดโรคอุจจาระร่วงจากเชื้อโรต้าไวรัสชนิดรุนแรงได้ถึงร้อยละ 70-100 [19, 20] วัคซีนนี้ได้รับการขึ้นทะเบียนและถูกบรรจุเข้าโปรแกรมการให้วัคซีนในเด็กของประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อเดือนสิงหาคม ปีพ.ศ. 2541 และหลังจากที่มีการให้วัคซีนในเด็กกว่า 9 แสนราย พบอุบัติการณ์ของโรคลำไส้กลืนกันเพิ่มขึ้นในเด็กที่ได้วัคซีนนี้ โดยส่วนใหญ่เกิดลำไส้กลืนกันภายใน 2 สัปดาห์หลังได้วัคซีนโดสแรก ดังนั้นจึงได้มีการหยุดใช้วัคซีนชนิดนี้ไปเมื่อเดือนตุลาคม ปีพ.ศ. 2542 [21, 22] ต่อมาได้มีการพัฒนาวัคซีนให้มีความปลอดภัยมากขึ้น วัคซีนป้องกันโรต้าไวรัสที่มีใช้ในปัจจุบัน [23, 24] ได้แก่

- 1) Rotarix™ หรือ Monovalent vaccine เป็นวัคซีนที่ประกอบด้วยเชื้อโรต้าไวรัส G1P[8] ชนิดจำเพาะหนึ่งสายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดี่ยวแบบมีชีวิตชนิดอ่อนกำลังที่ได้จากมนุษย์ วัคซีนชนิดนี้ใช้สำหรับป้องกันภาวะอุจจาระร่วงที่เกิดจากไวรัสทั้งชนิด G1 และไม่ใช่ G1 (G3, G4 และ G9) โดยวัคซีนชนิดนี้ได้รับอนุญาตให้ใช้ครั้งแรกเมื่อเดือนมิถุนายน ปีพ.ศ. 2549 ที่ประเทศเม็กซิโก และมีการใช้วัคซีนนี้อย่างแพร่หลายในประเทศแถบลาตินอเมริกา ทวีปแอฟริกา เอเชีย และบางประเทศในแถบยุโรป
- 2) Rotateq™ หรือ Pentavalent vaccine เป็นวัคซีนที่ได้จากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนของเชื้อโรต้าไวรัสที่ก่อโรคในคนและวัว (human-bovine reassortants) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อโรต้าไวรัส serotype G1, G2, G3, G4 และ P[8]

โดยในปัจจุบัน Rotarix® และ RotaTeq® ได้รับการจดทะเบียนและนำมาใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก อีกทั้งยังถูกจัดอยู่ในโปรแกรมการให้วัคซีนตามแบบแผนเสริมสร้างภูมิคุ้มกันแห่งชาติ หรือที่เรียกว่า national immunization program (NIP) เพื่อป้องกันการเกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันจากการติดเชื้อโรต้าไวรัส ในประเทศที่พัฒนาแล้วอีกด้วย [25]

ตาราง 1 ขนาดของวัคซีนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้สำหรับป้องกันเชื้อโรต้าไวรัส [23, 24]

ชื่อวัคซีน	จำนวนโดสที่ให้	อายุที่ควรให้		อายุที่แนะนำแต่ละโดส
		โดสแรก	โดสต่อไป	
Rotarix™	2	อายุ 6-15 สัปดาห์	ห่างกันแต่ละโดส	2, 4 เดือน
Rotateq™	3		ไม่น้อยกว่า 4 สัปดาห์ โดสสุดท้ายไม่เกิน อายุ 8 เดือน	2, 4, 6 เดือน

*วัคซีนทั้ง 2 ชนิดให้โดยวิธีรับประทานเท่านั้น ห้ามนำไปฉีดเด็ดขาด

2.5 การวินิจฉัยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่เกิดจากการติดเชื้อโรต้าไวรัส

เนื่องจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสนั้น ก่อให้เกิดอาการ ถ่ายเหลว สูญเสียน้ำ อาเจียน หรืออาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ และสามารถแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่นได้ทางอุจจาระ หรือที่เรียกว่า fecal-oral route ดังนั้นการวินิจฉัยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่เกิดจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสจึงเป็นกระบวนการที่สำคัญที่สามารถช่วยควบคุมโรค ช่วยลดโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสและอาจลดอัตราการเสียชีวิตลงได้หากตรวจพบโดยเร็ว วิธีการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสในปัจจุบันประกอบด้วย 2 วิธีหลัก ได้แก่ Real-time PCR (qRT-PCR) และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR)

Real-time PCR หรือที่รู้จักกันในชื่อ Quantitative PCR (qRT-PCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้ และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน วิธีการ real-time PCR เป็นวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอจำนวนจริงที่เพิ่มจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย [26] โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ SYBR-Green I fluorescence ซึ่งเป็นสียฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถเข้าจับกับบริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่จำเพาะ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งในช่วงการ denature เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยวนั้น SYBR Green I จะยังไม่สามารถเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SYBR Green I จะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอเส้นคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ดังนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย real-time PCR สัญญาณของสารเรืองแสง SYBR Green I

ก็จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยโมเลกุลของสีจะจับได้มากขึ้นกับความยาวของ PCR product [27, 28]

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การทำให้สายดีเอ็นเอคลายเกลียวโดยใช้อุณหภูมิสูง (Denaturation) การเข้าคู่กันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอเป้าหมาย (Annealing) และสุดท้ายการต่อสายดีเอ็นเอ (Extension) โดยปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนจะเกิดขึ้นเป็นวงรอบและซ้ำต่อเนื่องกันไป ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นของดีเอ็นเอแบบทวีคูณ (Exponential) ซึ่งการใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ เรียกว่าเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) คือมีการเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอ (RNA) ให้เป็นซีดีเอ็นเอ (cDNA) ก่อนที่จะเพิ่มจำนวน cDNA ที่สนใจนั้นโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากนั้นจะตรวจหาการเพิ่มจำนวนของซีดีเอ็นเอ ด้วย Gel electrophoresis [18, 29, 30]



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

Case control study

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

3.2.1 การเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรต้าไวรัส

เก็บตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยเด็กทารกและเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปี (Stool samples) ที่มีอาการอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลบางปะกอก 1 โรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล โรงพยาบาลชุมแพ และโรงพยาบาลกรุงเทพฯ – พิชญโลก ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 จำนวน 2,001 ตัวอย่าง ซึ่งขนส่งในอุณหภูมิเย็นมายังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยเพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรต้าไวรัส

ตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยถูกนำมาสกัด RNA ด้วยเครื่อง Maglead 12gc โดยดำเนินการขั้นตอนดังต่อไปนี้

- เจือจางตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยด้วยสารละลาย 0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS) ในอัตรา 1:9 ในหลอดแก้วทดลอง และทำการ vortex เพื่อให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน
- ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดเก็บส่วนที่เป็นสารละลาย ใส่ microtube ขนาด 2.0 ml จำนวน 2 tube (Supernatant)
- ดูดแบ่งสารละลายตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยมา 200 μ l ลงใน microtube ขนาด 1.5 ml ของชุดสกัดสำหรับนำเข้าเครื่อง Maglead 12gc ส่วน Supernatant ที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

- เตรียม Reagent Catridge, Samples, Tip sets และ Elution Tube ตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง Maglead 12gc หลังจากนั้นทำการกด Start ที่เครื่องเพื่อ Run Protocol
- เมื่อเครื่องทำงานเสร็จสมบูรณ์ ให้เก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 °C

3.2.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

การออกแบบไพรเมอร์ สามารถใช้โปรแกรม BioEdit เวอร์ชัน 7.0.5.3 โดยต้องเลือกส่วนที่อนุรักษ์ (conserve) ในยีน VP4, VP6 และ VP7 ของเชื้อโรต้าไวรัส ซึ่งข้อกำหนดลักษณะของไพรเมอร์ที่จะออกแบบได้แก่

- มีขนาดประมาณ 18-25 base pairs
- %CG อยู่ในช่วง 40-60%
- Melting temperature (Tm) อยู่ที่ประมาณ 55-66°C และห่างกันไม่เกิน 2°C
- มีเบสซ้ำติดกันไม่เกิน 4 เบส
- หลีกเลี่ยงการเกิดโครงสร้างแบบทุติยภูมิ

3.2.4 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรต้าไวรัส ด้วยเทคนิค Real – Time PCR (qRT-PCR)

1. ไพรเมอร์สำหรับ VP6 ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรต้าไวรัสโดยใช้เทคนิค qRT-PCR

ตาราง 2 แสดงไพรเมอร์สำหรับ VP6 ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรต้าไวรัสโดยใช้เทคนิค qRT-PCR

ยีนเป้าหมาย	ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'→3'
VP6	ROTA_VP6_F1	GGCTTTAAACGAAGTCTTC
	ROTA_VP6_R1357	GGTCACATCCTCTCACTA

2. ผสมสารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส ด้วยเทคนิค Real-Time PCR (qRT - PCR) ดังตารางที่ 3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อโรคไวรัสตามตารางที่ 2

ตาราง 3 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับเทคนิค Real-Time PCR

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	1X	12.5
10 μM Forward Primer	0.5 μM	1.25
10 μM Reverse Primer	0.5 μM	1.25
Reverse Transcriptase Enzyme Mix (100X)	1X	0.25
Nuclease-free Water	-	7.75
RNA template	-	2
Total		25

3. ตั้งสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสด้วยเทคนิค qRT-PCR ในเครื่อง ViiA™ 7 Real-Time PCR System ดังตารางที่ 4

ตาราง 4 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค qRT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Reverse transcription	50 °C	30 นาที	1
PCR initial activation steps	95 °C	15 นาที	1
Denaturation	94 °C	15 วินาที	45
Annealing	50 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	45 วินาที	

4. นำสารเคมีที่เตรียมในข้อ 2 ลงเครื่อง ViiA™ 7 Real-Time PCR System

5. สังเกตและบันทึกผลค่า Cycle threshold (Ct) เพื่อคัดกรองผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคไวรัส

3.2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

1. ไพรเมอร์สำหรับ VP4 และ VP7 ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR

ตาราง 5 แสดงไพรเมอร์สำหรับ VP4 และ VP7 ที่ใช้ตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR

ยีนเป้าหมาย	ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' → 3'
VP4	CON3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA
	CON2	ATTTTCGGACCATTACC
VP6	VP6F	GGCTTTTAAACGAAGTCTTC
	VP6R	GGTCACATCCTCTCACTA
VP7	BEG9	GGCTTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG
	END9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG

2. ผสมสารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคไวรัส ด้วยเทคนิค PCR ดังตารางที่ 6 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อโรคไวรัส ดังตารางที่ 5

ตาราง 6 แสดงสารเคมีที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
2X SensiFAST Probe No-ROX One-Step Mix	1X	10
10 μM Forward Primer	0.4 μM	0.8
10 μM Reverse Primer	0.4 μM	0.8
Reverse transcriptase	-	0.2
10 U/μl RNase Inhibitor	0.1 U	0.4
5 mM Magnesium Sulfate	0.1 mM	0.5
distilled water	-	3.3
RNA template	-	4
Total		20

3. ตั้งสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสด้วยเทคนิค PCR ในเครื่อง Mastercycler® (Eppendorf, Germany) ให้สอดคล้องกับคู่มือและเอนไซม์ที่ใช้ดังตารางที่ 7, 8 และ 9

ตาราง 7 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR สำหรับ ยีน VP4

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	40
Annealing	46	30 วินาที	
Extension	68	1 นาที	
Final-extension	68	5 นาที	1

ตาราง 8 แสดงสภาวะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR สำหรับ ยีน VP6

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	1 นาที	35
Annealing	45	1 นาที	
Extension	72	1.30 นาที	
Final-extension	72	10 นาที	1

ตาราง 9 แสดงสถานะที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR สำหรับ ยีน VP7

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	40
Annealing	48	30 วินาที	
Extension	68	1 นาที	
Final-extension	68	5 นาที	1

4. นำสารเคมีที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ลงเครื่อง Mastercycler®
5. เมื่อเครื่องดำเนินการเรียบร้อยแล้ว สามารถเก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.6 การตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

1. ละลาย 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ TBE และเทลงในถาดที่เสียบหัวไว้
2. เมื่อเจลแข็ง นำหัวเสียบออก แล้วแช่เจลลงในแทงค์
3. นำ PCR product ผสมกับ 6x loading dye ในอัตราส่วน 1:5 และปิเปตลงในหลุมเจล
4. ปิเปต DNA Marker ขนาด 100-3,000 base pairs (GeneDirex, Taiwan) ลงในหลุมแรก และเปิดใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100-volt เป็นเวลา 40 นาที
5. เมื่อครบเวลา นำไปส่องภายใต้แสงยูวี เพื่อสังเกตแถบแบน PCR ที่คาดหวัง

3.2.7 การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR Purification)

1. นำ PCR product จากกระบวนการ gel electrophoresis ผสมกับ GB buffer 400 μ l
2. บ่ม 50°C ประมาณ 15 นาที (จนเจลละลาย) และดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน SV column
3. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
4. เทสารละลายทิ้ง และใส่ NW buffer 700 μ l
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
6. เทสารละลายทิ้ง และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง
7. ย้าย filter ใส่ลงใน Tube 1.5 ml ที่เตรียมไว้ใหม่
8. ใส่ EB buffer 30 μ l
9. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
10. ทิ้ง filter และเก็บ PCR product ที่ผ่านการ purification ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.2.7 ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้ nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop™) วัดค่าการดูดกลืนแสง DNA / RNA ในช่วงของ UV ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 nm เพื่อดูว่าความเข้มข้นเหมาะสมเพียงพอต่อการส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยควรมีความเข้มข้นมากกว่า 10 μ g/ μ l ซึ่งการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำการจัดส่งไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และผลของลำดับนิวคลีโอไทด์จะถูกอ่านด้วย Chromas Lite Software เพื่อตรวจสอบในลำดับถัดไป

3.2.9 ระบุจีโนไทป์ของเชื้อโรต้าไวรัส (GxP[x])

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.2.8 ไปเข้า RotaC2.0 automated genotyping tool (<http://rotac.regatools.be>) เพื่อระบุจีโนไทป์ของเชื้อโรต้าไวรัสที่พบ

3.2.10 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ผลการทดลองทั้งหมดจะถูกบันทึกทั้งในสมุดจดบันทึกและในไฟล์คอมพิวเตอร์ รวมถึงบันทึกเป็นชุดภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV จากนั้นข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมารวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เมื่อทราบจีโนไทป์ของเชื้อโรต้าไวรัส จาก RotaC2.0 automated genotyping tool แล้วจะรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ รหัสของตัวอย่างที่พบเชื้อโรต้าไวรัส เพศ อายุ และ สายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัส มาสร้างกราฟเพื่อดูความชุกของการติดเชื้อโรต้าไวรัสในทารก และเด็กในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2559 ถึง เดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2562 ด้วยโปรแกรม Microsoft office excel

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4, VP6 และ VP7 จะถูกนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน โดยการเทียบความแตกต่างกับฐานข้อมูลในงานวิจัยอื่น (Reference sequences) ซอฟต์แวร์ที่เลือกใช้ ได้แก่ BioEdit, Seqman และ MEGA 6.0

Bioedit เป็นโปรแกรมที่ช่วยในการอ่าน ตัดแต่งและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังช่วยจัดเรียงความใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่าง (Reference sequences)

Seqman เป็นโปรแกรมที่ช่วยในการ contig หรือรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการแยกเป็น 2 ชุด ให้เป็นเส้นเดียว

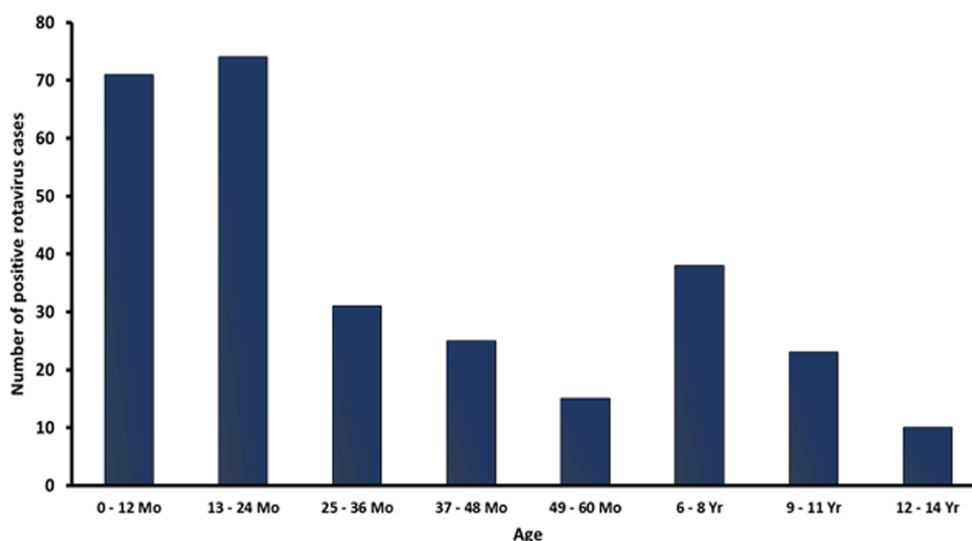
MEGA 6.0 เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับสร้าง Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4, VP6 และ VP7

บทที่ 4

ผลการทดลอง

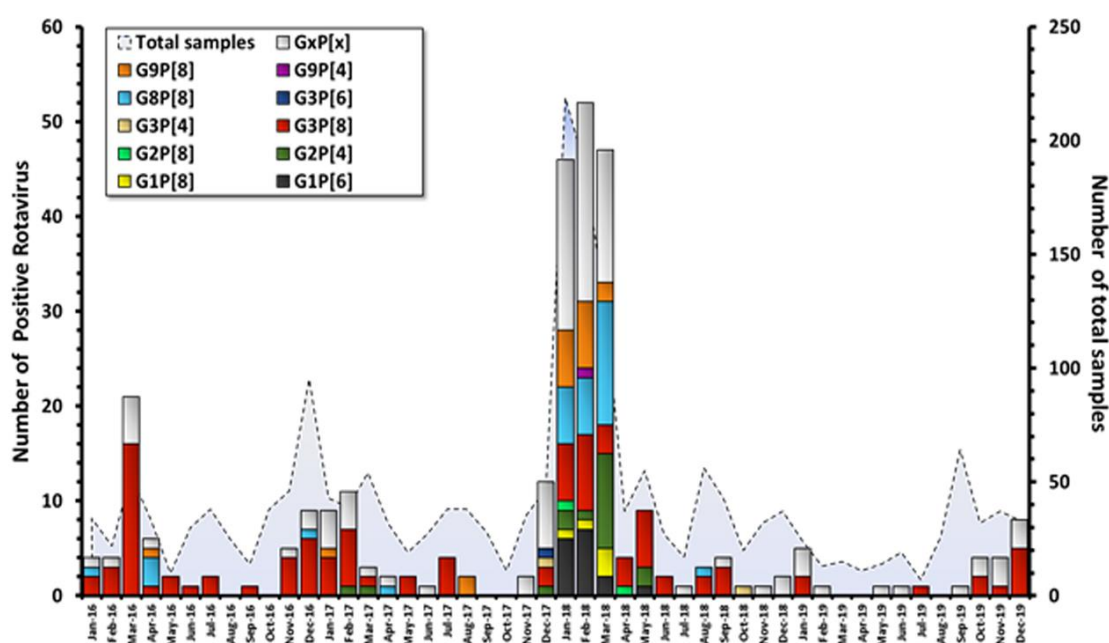
4.1 ระบาดวิทยาและความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสสายพันธุ์ A ในประเทศไทย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรต้าไวรัสในตัวอย่างอุจจาระเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีอาการอุจจาระร่วงเฉียบพลันในปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 ด้วยวิธี real-time RT-PCR จำนวน 2,001 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 438, 411, 857 และ 295 ตัวอย่าง ในปีพ.ศ. 2559, 2560, 2561 และ 2562 ตามลำดับ จากการศึกษากับผู้ป่วยเด็กทารกและเด็กเล็กติดเชื้อโรต้าไวรัสทั้งหมด 301 ราย (15.0%, 301/2,001) อีกทั้งพบการระบาดใหญ่ของเชื้อโรต้าไวรัสในเดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2561 ถึง เดือนธันวาคมปีพ.ศ. 2561 โดยเกิดการติดเชื้อโรต้าไวรัสในผู้ป่วยเด็กทารกและเด็กเล็กจำนวน 172 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 857 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.1 และจากการศึกษาพบว่าผู้ติดเชื้อโรต้าไวรัสส่วนใหญ่เป็นเด็กที่มีช่วงอายุอยู่ระหว่าง 0 ถึง 24 เดือน (48.2%, 145/301) (ภาพที่ 10)



รูปภาพ 10 การกระจายอายุของกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อโรต้าไวรัสสายพันธุ์ A ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562

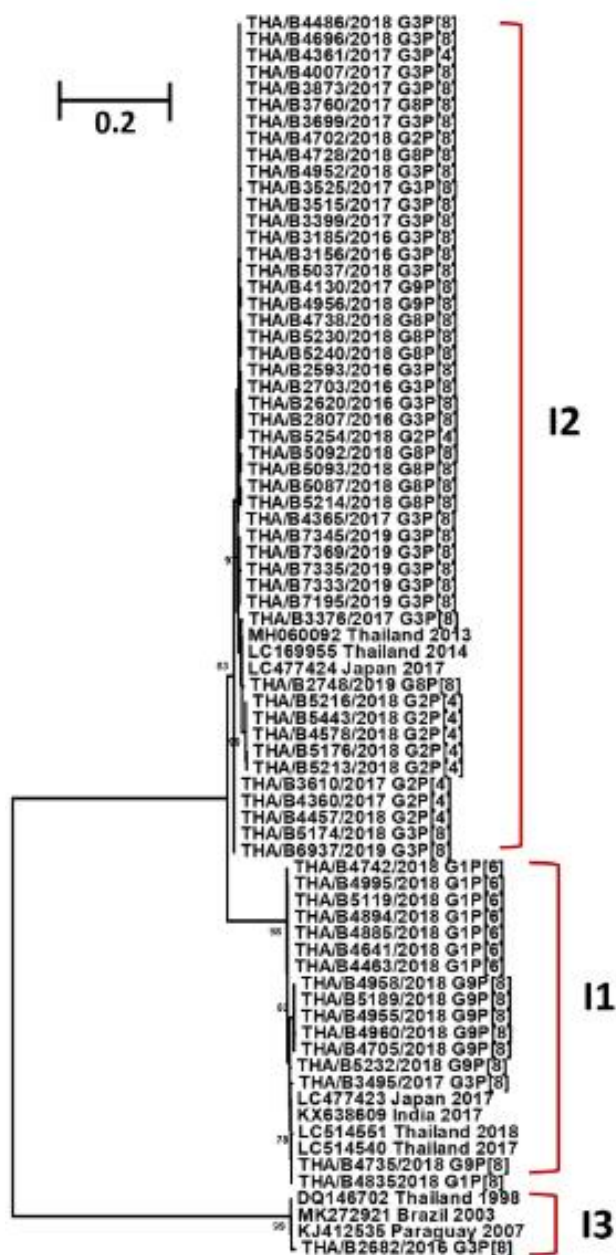
อัตราการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสถูกพบมากในช่วงเดือนธันวาคมถึงมีนาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาวของประเทศไทย และเมื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อโรต้าไวรัสสายพันธุ์ A ที่พบในผู้ป่วยเด็กทารกและผู้ป่วยเด็กเล็กในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 พบว่า G3P[8] เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (33.6%, 101/301), รองลงมา G8P[8] (10.6%, 32/301), G9P[8] (6.3%, 19/301), G2P[4] (6.0%, 18/301) และ G1P[6] (5.3%, 16/301) ตามลำดับ อีกทั้งยังตรวจพบโรต้าไวรัสสายพันธุ์ที่พบยากในคน อาทิ G2P[8], G3P[4], G3P[9] และ G9P[4] (ภาพที่ 11) นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ยีน VP6 เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของ I genotype (Wa, DS-1, and Au genogroups) พบว่า unusual DS-1-like strain (G3/8/9-P[4/6/8]-I2) เป็นชนิดสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (42.2%, 127/301), รองลงมา Wa-like strain (G1/3/9-P[4/8]-I1) (13.0%, 39/301), DS-1-like strain (G2-P[4]-I2) (6.6%, 20/301), Au-like strain (0.3%, 1/301), และ unclassified types (38.2%, 115/301) ตามลำดับ



รูปภาพ 11 แสดงอุบัติการณ์การติดเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2559 ถึง เดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2562

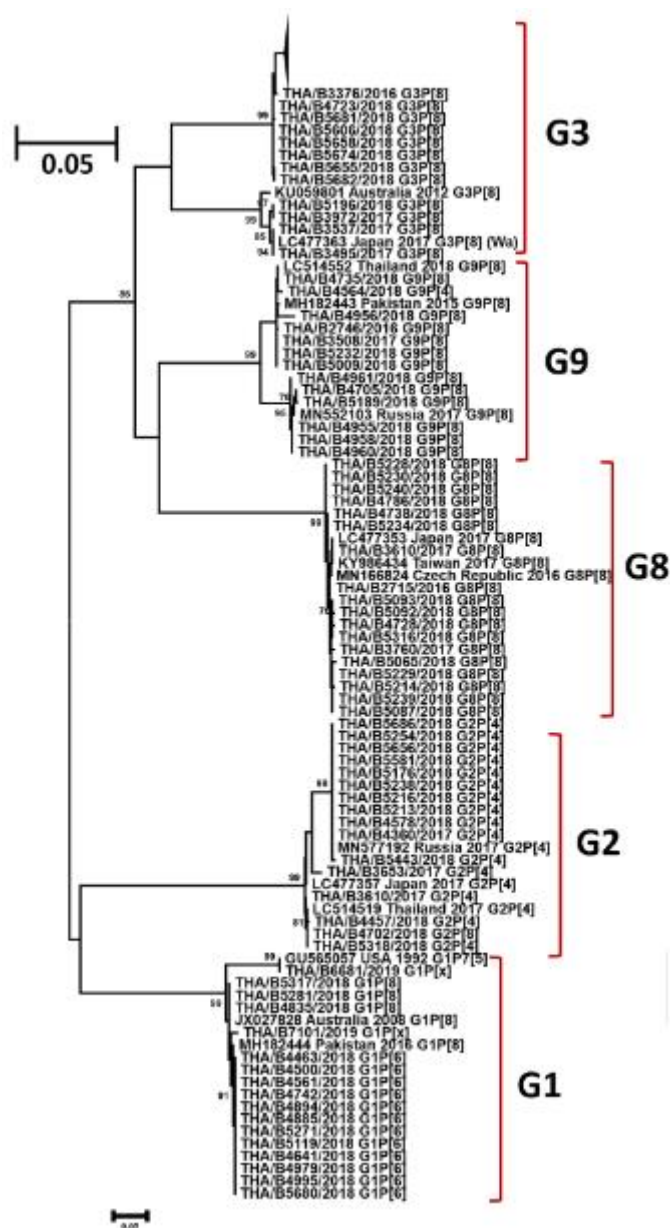
4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของเชื้อโรต้าไวรัส ด้วยวิธี Phylogenetic analysis

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพันธุกรรมของเชื้อโรต้าไวรัส จากยีน VP6, VP7 และ VP4 ด้วยวิธี Phylogenetic analysis เพื่อจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามลำดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP6 (I genotype) บางส่วน ที่มีขนาดความยาว 361 nt จำนวน 65 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อโรต้าไวรัส มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการสร้าง phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างโรต้าไวรัส ถูกจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ I1 (Wa-like), I2 (DS-1-like) และ I3 (Au-like) จากการศึกษาี้ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่า %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าในกลุ่มของ I1 มีค่า %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ระหว่าง 96.3-98.4% และมีค่า %sequence identity ระหว่าง 96.9-99.6% เมื่อเทียบกับ KX638609 และ LC477423 ซึ่งเป็น RVA strains ที่มีในรายงานก่อนหน้าในประเทศอินเดียปีพ.ศ.2560 และประเทศญี่ปุ่นปีพ.ศ.2560 ในกลุ่ม I2 มีค่า %sequence identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ระหว่าง 96.3-100% และมีค่า %sequence identity ระหว่าง 96.6-99.3% เมื่อเทียบกับ MH060092, LC169955 และ LC477424 ซึ่งเป็น RVA strains ที่มีในรายงานก่อนหน้าในประเทศไทยปีพ.ศ.2556 และปีพ.ศ.2557 และในประเทศญี่ปุ่นปีพ.ศ.2560 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ I3 พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมใกล้เคียงกับ KJ412535 ซึ่งเป็น RVA strains ที่มีในรายงานก่อนหน้าในประเทศสาธารณรัฐปารากวัย ซึ่งมีค่า %sequence identity อยู่ที่ 98.7% (ภาพที่ 12)



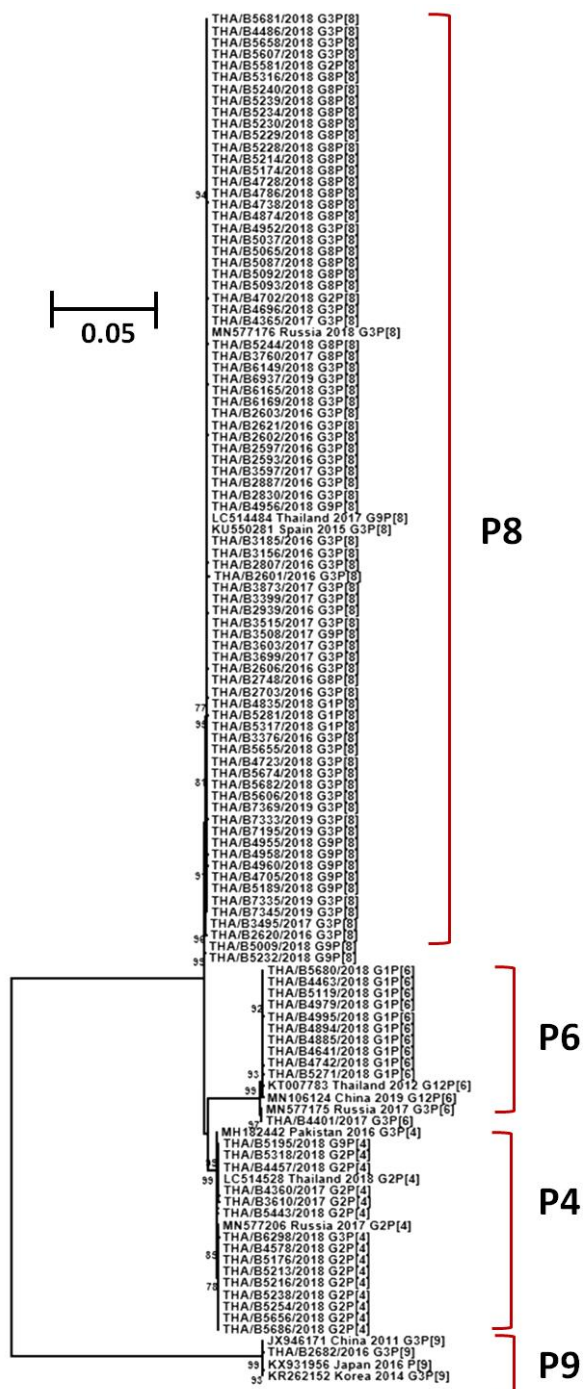
รูปภาพ 12 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ I genotype ของเชื้อไวรัส โดยใช้อำนาจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP6 บางส่วน (361 nt) จำนวน 65 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetics Analysis version 6.0 (MEGA6) (www.megasoftware.net) โดยเลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Tamura 3-parameter model และ ค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000

ผลวิเคราะห์ phylogenetic analysis ของยีน VP7 (G genotype) บางส่วน ที่มีขนาดความยาว 561 nt จำนวน 113 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อโรต้าไวรัส พบว่า G genotype ของเชื้อโรต้าไวรัสในการศึกษานี้ถูกจัดจำแนกออกเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ G1, G2, G3, G8 และ G9 โดยในการศึกษานี้พบว่า G1 เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการระบาดสูงที่สุด และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ G1 ส่วนใหญ่ มีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 92.8-100% เมื่อเทียบกับ JX027828 และ MH182444 ซึ่งเป็น RVA strain ที่มีในรายงานก่อนหน้าในประเทศออสเตรเลียปีพ.ศ.2551 และประเทศปากีสถานปีพ.ศ.2559 นอกจากนี้พบว่ามี G1 จำนวน 1 ตัวอย่าง (THA/B6681/2019 G1P[x]) มีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมใกล้ชิดกับ RotaTeq® vaccine strain (GU565057) ด้วยค่า %sequence identity 100% และในกลุ่มสายพันธุ์ G2 พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์มีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 95.7-100% และมีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 96.2-99.6% เมื่อเทียบกับ MN577192 และ LC477357 ซึ่งเป็น RVA strain ที่มีในรายงานก่อนหน้าในปีพ.ศ.2560 ทั้งของประเทศรัสเซียและประเทศญี่ปุ่น เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ G3 พบว่ามีการจัดจำแนกสายพันธุ์ G3 ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Wa-like G3 และ unusual DS-1-like G3 และมีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 80.7-100% นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์ของ G8 พบว่ามีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 98.7-100% และมีค่า %sequence identity มากกว่า 98.9% เมื่อเทียบกับ LC477353, KY986434 และ MN166824 ซึ่งเป็น RVA strain ที่มีในรายงานก่อนหน้าในประเทศญี่ปุ่น, ไต้หวัน และสาธารณรัฐเช็ก ตามลำดับ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มสายพันธุ์ G9 พบว่ามีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 92.3-100% และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MH182443 และ MN552103 ซึ่งเป็น RVA strain ที่พบในรายงานก่อนหน้าในประเทศรัสเซียและประเทศปากีสถาน ตามลำดับ พบว่ามีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 92.6-99.8% (ภาพที่ 13)



รูปภาพ 13 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ G genotype ของเชื้อโรคไวรัส โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP7 บางส่วน (561 nt) จำนวน 113 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetics Analysis version 6.0 (MEGA6) (www.megasoftware.net) โดยเลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Tamura 3-parameter model และ ค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000

ในส่วนของการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ของยีน VP4 (P genotype) บางส่วน ขนาดความยาว 438 nt จำนวน 106 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อโรต้าไวรัส พบว่า P genotype ของเชื้อโรต้าไวรัสในการศึกษานี้ถูกจัดจำแนกออกเป็น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ P[4], P[6] P[8] และ P[9] โดยสายพันธุ์ P[8] เป็นสายพันธุ์ที่อัตราการระบาดมากที่สุดในการศึกษานี้ รองลงมาคือ P[4], P[6] และ P[9] ตามลำดับ โดยเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ P[8] มาวิเคราะห์ พบว่ามีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 96.3-100% และมีค่า %sequence identity มากกว่า 95.8% เมื่อเทียบกับ MN577176, KU550281 และ LC514484 ซึ่งเป็น RVA strain ที่มีในรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศรัสเซีย, สเปน และ ไทย ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ P[4] มีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 96.3-100% และมีค่า %sequence identity มากกว่า 96.0% เมื่อเทียบกับ MN577206, MH182442 และ LC514528 ซึ่งเป็น RVA strain ที่พบในรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศรัสเซีย, ปากีสถาน และ ไทย ตามลำดับ ส่วนข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ P[6] มีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 92.6-100% และมีค่า %sequence identity มากกว่า 93.6% เมื่อเทียบกับ MN106124 ซึ่งเป็น RVA strain ที่พบในรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศจีน และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ P[9] พบว่า มีค่า %sequence identity อยู่ระหว่าง 98.0-99.1% เมื่อเทียบกับ JX946171, KX931956 และ KR262152 ซึ่งเป็น RVA strain ที่พบในรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศจีน, ญี่ปุ่น และ เกาหลี ตามลำดับ (ภาพที่ 14)



รูปภาพ 14 Phylogenetic tree แสดงผลการจำแนกสายพันธุ์ของ P genotype ของเชื้อไวรัส โดยใชข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP4 บางส่วน (438 nt) จำนวน 106 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก ในการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetics Analysis version 6.0 (MEGA6) (www.megasoftware.net) โดยเลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ Tamura 3-parameter model และ ค่า bootstrap replicate เท่ากับ 1,000

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

เชื้อโรคตาไวรัส เป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสียรุนแรงในเด็ก โดยเฉพาะเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี และจากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อโรคตาไวรัสในประเทศไทย พบว่าตั้งแต่ปีพ.ศ. 2550 ถึง 2557 มีอัตราการระบาดของเชื้อโรคตาไวรัสอยู่ระหว่าง 28.4-44.5% คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 34.3% [17, 18, 31]

ผลจากการศึกษาการระบาดของเชื้อโรคตาไวรัส ในเด็กทารกและเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีอาการอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 ด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่ามีค่าความชุกของการติดเชื้อโรคตาไวรัสเท่ากับ 15.0% โดยปกติแล้วการระบาดของเชื้อโรคตาไวรัสมีกระบาดในช่วงฤดูหนาว และจากการศึกษานี้พบว่า การระบาดใหญ่ของเชื้อโรคตาไวรัสอยู่ในช่วงเดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2560 ถึง เดือนมีนาคม ปีพ.ศ. 2561 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบการระบาดของเชื้อโรคตาไวรัสในผู้ใหญ่ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ปีพ.ศ. 2560 ถึง เดือนมีนาคม ปีพ.ศ. 2561 [32] ซึ่งเป็นช่วงที่ประเทศไทยมีอากาศหนาวเย็น กลุ่มอายุผู้ป่วยติดเชื้อโรคตาไวรัสในการศึกษานี้พบมากในช่วงอายุ 0 ถึง 2 ปี โดยกลุ่มอายุผู้ป่วยติดเชื้อโรคตาไวรัสในการศึกษานี้พบมากในช่วงอายุ 0 ถึง 2 ปี ซึ่งการศึกษาก่อนหน้าในเม็กซิโก พบว่าภายใน 2 ขวบแรก เด็กจะติดเชื้อโรคตาไวรัสอย่างน้อย 1 ครั้ง และ จำนวน 2 ใน 3 ของเด็กที่ติดเชื้อ จะติดเชื้อมากกว่า 2 ครั้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ประมาณร้อยละ 10 ของเด็กที่ติดเชื้อ มีการติดเชื้อโรคตาไวรัส ถึง 5 ครั้ง โดยในการติดเชื้อโรคตาไวรัสครั้งหลังๆจะมีอาการรุนแรงน้อยกว่าการติดเชื้อครั้งแรก และการติดเชื้อโรคตาไวรัสในครั้งที่สอง หรือครั้งถัดไป สายพันธุ์ที่พบมักจะไม่ใช้สายพันธุ์เดียวกับที่ติดเชื้อครั้งแรก [33] อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าจำนวนผู้ติดเชื้อโรคตาไวรัสลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเด็กมีอายุมากขึ้น เนื่องจากเด็กอาจมี protective immunity ซึ่งทำให้ร่างกายสามารถยับยั้งการติดเชื้อซ้ำในครั้งถัดไปได้ [34]

จากการศึกษาสายพันธุ์ของโรคตาไวรัสในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2543 ถึง 2559 พบว่าสายพันธุ์ก่อโรคที่พบบ่อยในคน ได้แก่ G1P[8], G2P[4], G3P[8] และ G9P[8] และสายพันธุ์ที่พบน้อยในคน ได้แก่ G2P[8], G3P[3], G3P[9], G3P[10], G3P[19], G12P[6] และ G12P[8] นอกจากนี้มีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของไวรัสโรคตาในแต่ละช่วงปี โดยพบสายพันธุ์ G9P[8] มากในปีพ.ศ. 2543 ถึง 2547, G1P[8] ในปีพ.ศ. 2548 ถึง 2552, G3P[8] ในปีพ.ศ. 2552 ถึง 2554, G1P[8] ในปีพ.ศ. 2555 ถึง 2557 และ G9P[8] ในปีพ.ศ. 2558 ถึง 2559 [35-39] และจากการจำแนกสายพันธุ์ของโรคตาไวรัส

ในการศึกษานี้พบว่า G3P[8] เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด, รองลงมาคือ G8P[8] (10.6%, 32/301), G9P[8] (6.3%, 19/301), G2P[4] (6.0%, 18/301) และ G1P[6] (5.3%, 16/301) ตามลำดับ และเมื่อทำการวิเคราะห์ในเชิง genetic backbone พบสายพันธุ์ที่เป็น DS-1-like strain มากถึง 147 ตัวอย่างจาก 301 ตัวอย่าง (48.8%) และ DS-1-like G3P[8] เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (57.8%, 85/147) รองลงมาคือ unusual DS-1-like G8P[8]I2 (21.1%, 31/147) และ G2P[4]I2 (12.2%, 18/147)

ในปีพ.ศ. 2555 unusual DS-1-like G1P[8] ถูกตรวจพบครั้งแรกในเด็กอายุน้อยกว่า 15 ปี ที่มีการท้องเสียเฉียบพลันที่ประเทศญี่ปุ่น [36, 40, 41] ต่อมาถูกตรวจพบที่ประเทศไทย, ฟิลิปปินส์, เวียดนาม และบราซิล ในระหว่างปีพ.ศ. 2555 ถึง 2556 [25, 42-44] หลังจากนั้น ในปีพ.ศ. 2556 มีการตรวจพบ unusual DS-1-like G3P[8] ที่ประเทศไทยและออสเตรเลีย [45, 46] และต่อมา unusual DS-1-like G3P[8] ถูกตรวจพบในประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก อาทิ ประเทศฮังการี, เยอรมัน, อินโดนีเซีย, ญี่ปุ่น, สเปน, สหรัฐอเมริกา, บราซิล และอิตาลี เป็นต้น [46-53] นอกจากนี้ในการศึกษานี้ตรวจพบ unusual DS-1-like G3P[8] มากที่สุดในเด็กทารกและเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีในประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 และผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน VP7 ของกลุ่มสายพันธุ์ unusual DS-1-like G3P[8] มีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมใกล้ชิดกับ MK161359 ซึ่งเป็น RVA strain ที่พบในรายงานก่อนหน้านี้ที่ประเทศไทยในปีพ.ศ. 2559 โดยมีค่า %nucleotide identity เท่ากับ 98.0-99.8% นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ VP4 และ VP6 แสดงให้เห็นว่า กลุ่มสายพันธุ์ unusual DS-1-like G3P[8] ที่พบมีความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมใกล้ชิดกับ unusual DS-1-like backbone ที่พบที่ประเทศสเปน, รัสเซีย, ญี่ปุ่น และ ไทย ดังนั้น unusual DS-1-like G3P[8] strain ที่ตรวจพบในการศึกษานี้ อาจเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการติดเชื้อภายในประเทศไทย หรือจากต่างประเทศเข้าสู่ประเทศไทยก็เป็นได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันข้อมูลจีโนมของโรต้าไวรัสยังคงเป็นที่ต้องการเพิ่มเติมเพื่อให้เราสามารถเข้าใจวิวัฒนาการของ DS-1-like G3P[8] strains มากขึ้นอีกด้วย

ช่วงก่อนมีการประกาศใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสียรุนแรงจากการติดเชื้อโรต้าไวรัส ได้มีการศึกษาการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 ถึง 2547 พบว่าการระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสสายพันธุ์ G1P[8] มากถึง 70% ในแถบอเมริกาเหนือ, ยุโรป และประเทศออสเตรเลีย อีกทั้งยังพบมากในแถบอเมริกาใต้และเอเชียมากถึง 30% และในแอฟริกา 23% นอกจากนี้ยังพบโรต้าไวรัสสายพันธุ์อื่นด้วย อาทิ G3P[8], G2P[4] และ G4P[8] [54] และหลังจากที่มีการประกาศใช้วัคซีน RotaTeq® ในปีพ.ศ. 2549 พบว่าจำนวนผู้ติดเชื้อโรต้าไวรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [1] และโดยปกติแล้วในวัคซีน Rotarix® ประกอบด้วยเชื้อโรต้าไวรัส G1P[8] ซึ่งเป็นสาย

พันธุ์ที่มีลักษณะเป็น Wa-like genetic backbone ในขณะที่ G2P[4] เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะเป็น DS-1-like genetic backbone [55] และจากการติดตามสถานการณ์การระบาดของเชื้อโรต้าไวรัส หลังมีการประกาศใช้วัคซีน RotaTeq® พบว่ามีโรต้าไวรัสสายพันธุ์ G3P[8] มากขึ้นในอเมริกาและบางเมืองของประเทศออสเตรเลีย [45, 56, 57] อีกทั้งพบโรต้าไวรัสสายพันธุ์ G2P[4] มากขึ้นในประเทศบราซิล, เบลีเยม และบางเมืองของประเทศออสเตรเลีย หลังจากที่มีการประกาศใช้วัคซีน Rotarix® [58] แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากได้มีรายงานว่า วัคซีน Rotarix® มีความสามารถในการป้องกันเชื้อโรต้าไวรัสสายพันธุ์ G2P[4] ได้อย่างมีนัยสำคัญ [25, 59] ดังนั้นรายงานข้อมูลเหล่านี้ยังคงเป็นหลักฐานสนับสนุนการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันหรือท้องเสียรุนแรงจากการติดเชื้อโรต้าไวรัสทั้งสายพันธุ์ที่เป็น Wa-like หรือ DS-1-like genetic backbone ได้ต่อไป





ภาคผนวก ก

การคำนวณขนาดตัวอย่าง : สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$n = \frac{(Z)^2 PQ}{e^2}$$

เมื่อ n แทน จำนวนตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อโรต้าไวรัส

Z แทน ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เท่ากับ 1.96

P แทน การระบาดของเชื้อโรต้าไวรัสในประเทศไทยจากการศึกษาก่อนหน้า เท่ากับ 30%

Q แทน 1-P

e แทน acceptable error เท่ากับ 5%

จะได้
$$n = \frac{(1.96)^2 (0.30)(0.70)}{(0.05)^2}$$

$$n = 322.69$$

ดังนั้น จากการคำนวณดังที่กล่าวมาจึงสามารถสรุปได้ว่า จะต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษานี้ อย่างน้อย 323 ตัวอย่าง จึงจะสามารถดำเนินการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อโรต้าไวรัสที่พบในทารก และเด็กในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2559 ถึง 2562 ได้อย่างน่าเชื่อถือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. 5x Tris borate buffer (5xTBEs)

Tris-base 54 กรัม

Boric acid 27.5 กรัม

EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1x Tris borate buffer (1xTBE)

5x TBE 200 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

3. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel 4 กรัม

1x TBE 200 มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

4. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide 30 ไมโครลิตร

น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

5. Loading dye

0.25% Bromophenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. ผลงานวิจัยได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Peer J ซึ่งเป็นวารสารระดับนานาชาติ ที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI หัวข้อเรื่อง High prevalence of circulating DS-1-like Human Rotavirus A and genotype diversity in infants and children with acute gastroenteritis in Thailand from 2016 to 2019



บรรณานุกรม

1. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17083.
2. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD; World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. Clin Infect Dis. 2016;62 Suppl 2:S96-S105.
3. Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, et al. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. J Virol. 2006;80(10):4820-4832.
4. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. JAMA Pediatr. 2018;172(10):958-965
5. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus proteins: structure and assembly. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;309:189-219.
6. Coulson BS, Kirkwood C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. J Virol. 1991;65(11):5968-5974.
7. Rotavirus Classification, Structure composition and Properties, Replication, Mode of Transmission, Pathogenesis, Clinical symptoms, laboratory diagnosis, Treatment, Prevention and Control [updated 1 December 2019. Available from: <https://www.onlinebiologynotes.com/rotavirus-classification-structure-composition-properties-replication-mode-transmission-pathogenesis-clinical-symptoms-laboratory-diagnosis-treatment-prevention-control/>]

8. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijis I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008;82(7):3204-3219.
9. Nakagomi T, Nakagomi O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J Virol*. 1989;63(3):1431-1434.
10. Rotavirus Classification Working Group: RCWG 2019 [updated 1 December 2019]. Available from: [\[https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg\]](https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg)
11. McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, Patton JT. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14:448-60.
12. Dennehy PH. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:S103-5.
13. Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):380-388.
14. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD; World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis*. 2016;62 Suppl 2:S96-S105.
15. Sadiq, A, Bostan, N, Yinda, KC, Naseem, S, Sattar, S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol*. 2018;28:e2003.
16. World Health Organization: WHO 2018 [Updated 16 November 2020]. Available from: [\[https://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/adam_cohen_0.pdf\]](https://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/adam_cohen_0.pdf).
17. Maiklang O, Vutithanachot V, Vutithanachot C, Hacharoen P, Chieochansin T, Poovorawan Y. Prevalence of group A genotype human rotavirus among

- children with diarrhea in Thailand, 2009-2011. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012;43(4):904-916.
18. Chieochansin T, Vutithanachot V, Phumpholsup T, Posuwan N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. The prevalence and genotype diversity of Human Rotavirus A circulating in Thailand, 2011-2014. *Infect Genet Evol*. 2016;37:129-36.
 19. Bernstein DI, Glass RI, Rodgers G, Davidson BL, Sack DA. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *JAMA*. 1995;273:1191-6.
 20. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, Bernstein DI, Pichichero ME, Zito ET, et al. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics*. 1996;97:7-13.
 21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine - United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999;48:577-81.
 22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999;48:1007.
 23. Reddy S, Nair NP, Giri S, Mohan VR, Tate JE, Parashar UD, et al. Indian Intussusception Surveillance Network. Safety monitoring of ROTAVAC vaccine and etiological investigation of intussusception in India: study protocol. *BMC Public Health*. 2018;18:898.
 24. World Health Organization Position Paper, "Rotavirus vaccines" *Weekly Epidemiological Record*. 2013;88(5):49-64.
 25. Vesikari T. Rotavirus vaccination: a concise review. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 5:57-63.

26. Jia Y. Chapter 3 - Real-Time PCR. In P. M. Conn (Ed.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press. 2012;112:55-68.
27. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5:209-19.
28. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003;3:18
29. Chieochansin T, Vutithanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Evaluation of the rapid test for human rotavirus A in Thai children with acute gastroenteritis. *Clin Lab*. 2014;60:511-4.
30. Theamboonlers A, Bhattarakosol P, Chongsrisawat V, Sungkapalee T, Wutthirattanakowit N, Poovorawan Y. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. *Virus Genes*. 2008;36:289-98.
31. Khananurak K, Vutithanachot V, Simakachorn N, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Prevalence and phylogenetic analysis of rotavirus genotypes in Thailand between 2007 and 2009. *Infect Genet Evol*. 2010;10(4):537-545.
32. Chansaenroj J, Chuchaona W, Lestari FB, Pasittungkul S, Klinfueng S, Wanlapakorn N, et al. High prevalence of DS-1-like rotavirus infection in Thai adults between 2016 and 2019. *PLoS One*. 2020;15(6):e0235280.
33. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1022-1028.

34. Echeverria P, Burke DS, Blacklow NR, Cukor G, Charoenkul C, Yanggratoke S. Age-specific prevalence of antibody to rotavirus, Escherichia coli heat-labile enterotoxin, Norwalk virus, and hepatitis A virus in a rural community in Thailand. *J Clin Microbiol.* 1983;17(5):923-925.
35. Pongsuwannana Y, Guntapong R, Tacharoenmuang R, Prapanpoj M, Kameoka M, Taniguchi K. A long-term survey on the distribution of the human rotavirus G type in Thailand. *J Med Virol.* 2010;82:157-163.
36. Maneekarn N, Khamrin P. Rotavirus associated gastroenteritis in Thailand. *Virusdisease.* 2014;25(2):201-207.
37. Theamboonlers A, Maiklang O, Thongmee T, Chieochansin T, Vuthitanachot V, Poovorawan Y. Complete genotype constellation of human rotavirus group A circulating in Thailand, 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 2014;21:295-302.
38. Guntapong R, Tacharoenmuang R, Singchai P, Upachai S, Sutthiwarakom K, Komoto S, et al. Predominant prevalence of human rotaviruses with the G1P[8] and G8P[8] genotypes with a short RNA profile in 2013 and 2014 in Sukhothai and Phetchaboon provinces, Thailand. *J Med Virol.* 2017;89(4):615-620.
39. Chan-It W, Chanta C. Emergence of G9P[8] rotaviruses in children with acute gastroenteritis in Thailand, 2015-2016. *J Med Virol.* 2018 Mar;90(3):477-484.
40. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan YH, et al. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* 2014;28:426-433.
41. Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Kida K, Mizoguchi Y, Kanadani T, Nishimura K, Kishimoto T. Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *J Med Virol.* 2014;86(6):1056-1064.

42. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, et al. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141739.
43. Nakagomi T, Nguyen MQ, Gauchan P, Agbemabiese CA, Kaneko M, Do LP, et al. Evolution of DS-1-like G1P[8] double-gene reassortant rotavirus A strains causing gastroenteritis in children in Vietnam in 2012/2013. *Arch Virol*. 2017;162(3):739-748.
44. Luchs A, da Costa AC, Cilli A, Komninakis SCV, Carmona RCC, Morillo SG, et al. First Detection of DS-1-like G1P[8] Double-gene Reassortant Rotavirus Strains on The American Continent, Brazil, 2013. *Sci Rep*. 2019;9(1):2210.
45. Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J Gen Virol*. 2016;97(2):403-410.
46. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Tsuji T, Yoshikawa T, et al. Reassortment of Human and Animal Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148416.
47. Arana A, Montes M, Jere KC, Alkorta M, Iturriza-Gómara M, Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect Genet Evol*. 2016;44:137-144.
48. Dóro R, Marton S, Bartókné AH, Lengyel G, Agócs Z, Jakab F, Bányai K. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain?. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016;63(2):243-255.
49. Kikuchi W, Nakagomi T, Gauchan P, Agbemabiese CA, Noguchi A, Nakagomi O, Takahashi T. Detection in Japan of an equine-like G3P[8] reassortant rotavirus A strain that is highly homologous to European strains across all genome

- segments. *Arch Virol.* 2018;163(3):791-794.
50. Komoto S, Ide T, Negoro M, Tanaka T, Asada K, Umemoto M, et al. Characterization of unusual DS-1-like G3P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Japan. *J Med Virol.* 2018;90(5):890-898.
 51. Pietsch C, Liebert UG. Molecular characterization of different equine-like G3 rotavirus strains from Germany. *Infect Genet Evol.* 2018;57:46-50.
 52. Utsumi T, Wahyuni RM, Doan YH, Dinana Z, Soegijanto S, Fujii Y, et al. Equine-like G3 rotavirus strains as predominant strains among children in Indonesia in 2015-2016. *Infect Genet Evol.* 2018;61:224-228.
 53. Esposito S, Camilloni B, Bianchini S, Ianiro G, Polinori I, et al. First detection of a reassortant G3P[8] rotavirus A strain in Italy: a case report in an 8-year-old child. *Virol J.* 2019;16(1):64.
 54. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;15(1):29-56.
 55. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011;156(8):1397-1413.
 56. Bibera GL, Chen J, Pereira P, Benninghoff B. Dynamics of G2P[4] strain evolution and rotavirus vaccination: A review of evidence for Rotarix. *Vaccine.* 2020 Jul 31;38(35):5591-5600.
 57. Hull JJ, Teel EN, Kerin TK, Freeman MM, Esona MD, Gentsch JR, et al. United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1 Suppl):S42-S47.

58. Dóro R, László B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, Bányai K, et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure?. *Infect Genet Evol.* 2014;28:446-461.
59. De Vos B, Han HH, Bouckennooghe A, Debrus S, Gillard P, Ward R, et al. Live attenuated human rotavirus vaccine, RIX4414, provides clinical protection in infants against rotavirus strains with and without shared G and P genotypes: integrated analysis of randomized controlled trials. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(4):261-266.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว สิริพัทธ์ พิชัยรุ่งอรุณ
วัน เดือน ปี เกิด	29 มิถุนายน 2538
สถานที่เกิด	ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาในระดับ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีพุทธศักราช 2560 และกำลังศึกษาอยู่ในระดับ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ การแพทย์ แขนงวิชาชีวเคมีประยุกต์และอนุชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	339/8 หมู่ที่ 6 ซอย 1 ถนน พหลโยธิน ตำบล ชมพู อำเภอ เมือง จังหวัด ลำปาง รหัสไปรษณีย์ 52100
ผลงานตีพิมพ์	เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : High prevalence of circulating DS-1-like Human Rotavirus A and genotype diversity in infants and children with acute gastroenteritis in Thailand from 2016 to 2019 เพื่อตีพิมพ์วารสาร Peer J