

หัวข้อคุณูปนิพนธ์	วิทยาการระบาดระดับโมเลกุลของไวรัสโนโรและไวรัสซาโปและการวิเคราะห์วิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโนโรสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดในจังหวัดเชียงใหม่ในช่วงเวลาสิบปีที่ผ่านมา	
ผู้เขียน	นางสาว คณิตาพร สุภาเดช	
ปริญญา	ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร. ภัทรา คำรณิษฐ์ ศ.ดร. นิวัฒน์ มณีกาญจน์ ดร. แคทรียา คำทิพย์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไวรัสโนโรและไวรัสซาโปเป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบเฉียบพลันในเด็กทั่วโลก นอกจากนี้หนึ่งในกลไกที่ขับเคลื่อนวิวัฒนาการและการเกิดการระบาดของเชื้อไวรัสโนโรสายพันธุ์ใหม่ ๆ คือการเกิด homologous recombination การศึกษาหลาย ๆ การศึกษาจากทั่วโลกแสดงให้เห็นว่าไวรัสโนโรสายพันธุ์ลูกผสม (recombinant strain) ที่ตรวจพบ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัสโนโรสายพันธุ์ลูกผสม ในประเทศไทยยังมีข้อมูลอยู่ค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิทยาการระบาดระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโนโรและไวรัสซาโปและการตรวจหาคุณลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของไวรัสโนโรสายพันธุ์ที่เกิดจาก recombination ในผู้ป่วยเด็กที่มีอายุตั้งแต่ 2 เดือน ถึง 15 ปี ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการอุจจาระร่วงเฉียบพลันในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยทำการตรวจคัดกรองหาเชื้อไวรัสโนโรจีโนกรุป I (GI) จีโนกรุป II (GII) และไวรัสซาโปจากตัวอย่างอุจจาระจำนวน 812 ตัวอย่างที่เก็บในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2558 ถึง 2559 โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ multiplex-PCR ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับเชื้อเหล่านี้จะถูกนำไปศึกษาต่อเพื่อจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ทาง phylogenetics ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างที่พบว่าเป็นเชื้อไวรัสโนโรจำนวน 164 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.2 และไวรัสซาโปจำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.8 จากตัวอย่างเหล่านี้มี 2 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อทั้งไวรัสโนโรและไวรัสซาโปคิดเป็นร้อยละ 0.2 ในกลุ่มของเชื้อไวรัสโนโร

จีโนไทป์ที่พบว่ามีความชุกมากที่สุดคือ GII.4 รองลงมาคือ จีโนไทป์ GII.2, GII.3, GII.17, GII.13, GII.14, GII.15, GII.21, GI.6 และ GI.5 จากการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจัดจำแนก variant ของเชื้อไวรัส GII.4 พบว่า GII.4 Sydney 2012 เป็น variant ที่ตรวจพบได้มากที่สุด ในขณะที่ variant อื่น ๆ เช่น Asia 2003 และ New Orleans 2009 พบได้น้อย นอกจากนี้สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษานี้คือการตรวจพบการเพิ่มขึ้นของไวรัสโนโร GII.2 ในปี พ.ศ. 2559 โดยพบว่าร้อยละ 50 ของไวรัสโนโรสายพันธุ์ GII.2 ที่ทำการวิเคราะห์ และสายพันธุ์ที่ตรวจพบในปี พ.ศ. 2550 และปี พ.ศ. 2556 อย่างละหนึ่ง มีลักษณะสารพันธุกรรมเป็นสายพันธุ์ลูกผสม GII.P16/GII.2 สำหรับการตรวจวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสซาโปพบว่าจีโนไทป์หลักที่พบคือ GI.1 ตามด้วย GI.2 และ GII.5 สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของตัวเชื้อเพื่อศึกษาวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของไวรัสโนโรในการศึกษารุ่นนี้พบว่าเชื้อไวรัสโนโร GII สายพันธุ์ลูกผสม ที่ตรวจพบในจังหวัดเชียงใหม่มีความหลากหลายค่อนข้างสูง โดยพบว่าจากตัวอย่างทั้งหมด 1,938 ตัวอย่างที่ทำการเก็บในช่วงปี พ.ศ. 2548 ถึง 2558 ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสโนโรจำนวน 298 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ORF1 (RdRp) และ ORF2 (capsid) ด้วยวิธี phylogenetic analysis พบว่าไวรัสโนโร 21 ตัวอย่าง มีลักษณะของสารพันธุกรรมเป็นแบบสายพันธุ์ลูกผสม และเมื่อจัดกลุ่มตามลักษณะของการเกิด recombination สามารถแบ่งกลุ่มการเกิด recombination ได้ 9 รูปแบบ ได้แก่ GII.Pe/GII.4, GII.Pg/GII.1, GII.Pg/GII.12, GII.P7/GII.6, GII.P7/GII.14, GII.P12/GII.4, GII.P16/GII.2, GII.P16/GII.13 และ GII.P21/GII.3 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เกิดจาก recombination ทั้งหมดที่ตรวจพบ ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งการเกิด recombination breakpoint โดยใช้โปรแกรม Simplot และ RDP4 พบว่า recombination breakpoints เกิดขึ้นในช่วงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 5018 ถึง 5123 ซึ่งเกิดขึ้นใกล้กับรอยต่อของ ORF1 และ ORF2 โดยสรุปการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโนโรและเชื้อไวรัสซาโปในเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลันในปีพ.ศ. 2558 ถึง 2559 นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อไวรัสโนโรชนิดที่เป็นสายพันธุ์ลูกผสมที่หลากหลายสายพันธุ์ในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วงในจังหวัดเชียงใหม่ในช่วงระยะเวลาสิบปีที่ผ่านมา

Dissertation Title	Molecular Epidemiology of Norovirus and Sapovirus, and Evolutionary Genetic Analysis of Norovirus Strains Circulating in Chiang Mai Province During the Past Decade	
Author	Ms. Kanittapon Supadej	
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Pattara Khamrin	Advisor
	Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Co-advisor
	Dr. Kattareeya Kumthip	Co-advisor

ABSTRACT

Norovirus (NoV) and sapovirus (SaV) are the causes of acute gastroenteritis in children worldwide. In addition, one of the mechanisms that drives the evolution and emergence of NoV new variants is the homologous recombination. Several studies worldwide reveal that wide variety of NoV recombinant strains are detected. However, in Thailand, there are few studies that described the genetic characterization of NoV recombinant strains. Therefore, this study aimed to investigate the molecular epidemiology of NoV and SaV and to characterize genetic recombination of NoVs in pediatric patients with ages ranging from 2 months to 15 years admitted to hospitals with acute diarrhea in Chiang Mai province, Thailand. A total of 812 stool samples collected during 2015-2016 were screened for NoV GI, GII, and SaV by reverse transcription (RT) and multiplex-polymerase chain reaction (PCR) methods. The genotypes of detected viruses were further characterized by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. In this study, 164 (20.2%) and 15 (1.8%) stool specimens were positive for NoV and SaV, respectively. Of these, 2 samples (0.2%) were positive for both NoV and SaV. Among NoV, NoV GII.4 were the most predominant genotype, followed by GII.2, GII.3, GII.17, GII.6, GII.7, GII.13, GII.14, GII.15, GII.21, GI.6, and GI.5. For GII.4, the Sydney 2012 was the most predominant variant, while the others were Asia 2003 and New Orleans 2009.

Interestingly, the increasing detection of NoV GII.2 was observed in the surveillance year of 2016. Fifty percent of the characterized GII.2 strains and one each of the strain from 2007 and 2013 were identified as GII.P16/GII.2 recombinant strains. For SaV, the majority of SaV was GI.1 genotype, followed by GI.2 and GII.5. For the genetic evolutionary analysis of NoV, the present study also described wide variety of NoV GII recombinant strains circulating in Chiang Mai. From 1,938 stool samples collected during 2005-2015, 298 were positive for NoV GII. By phylogenetic analysis of partial sequence of ORF1 (RdRp)/ORF2 (capsid), 21 samples were identified as recombinant strains. Among these, 9 recombination patterns were detected, including GII.Pe/GII.4, GII.Pg/GII.1, GII.Pg/GII.12, GII.P7/GII.6, GII.P7/GII.14, GII.P12/GII.4, GII.P16/GII.2, GII.P16/ GII.13, and GII.P21/GII.3. All detected recombination patterns were further analyzed to predict the putative recombination breakpoint by using Simplot software and RDP4 program. The recombination breakpoints were observed at the nucleotide positions ranging from 5018-5123, which occurred near the junction of ORF1 and ORF2. In conclusion, our study provides the molecular epidemiological information of NoV and SaV in children hospitalized with acute gastroenteritis from 2015-2016. In addition, the data demonstrated that wide variety of NoV GII recombinant strains were detected in pediatric patients with acute gastroenteritis in Chiang Mai during the past decade.