เนื้อหางานวิจัย

งานวิจัยที่ทำอยู่ขอสรุปได้ตามนักวิจัยของศูนย์ที่ทำมีดังนี้

1.1 การศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี ในแผนการให้วัคซีนแห่งชาติและ seroprevalence ของไวรัสตับอักเสบ เอ และ ซี

ผู้วิจัยหลัก

ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ

โครงการวิจัยไวรัสตับอักเสบ ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี ในทารกตามแผนการให้วัคซีนแห่งชาติ และศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ และ ซี ในประเทศไทย โดยการศึกษาในประชากรที่แข็งปกติอายุตั้งแต่ 6 เดือน จนถึง 60 ปี จำนวน 6000 ราย ในท้องที่ตัวแทนภาคเหนือ (อุตรดิตถ์ และพิษณุโลก) ภาคกลาง (อยุธยา และลพบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) ภาคใต้ (นราธิวาส และตรัง) โดยแบ่งภาคละ 1500 คน การศึกษาทั้งไวรัส เอ บี และ ซี งานดังกล่าวเป็นการประเมินผลการให้วัคซีนไวรัส บี มากกว่า 20 ปี และข้อมูลจะเป็นแห่งอ่างอิงและนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ งานวิจัยได้ดำเนินการเสร็จแล้ว อยู่ระหว่างการเตรียมผลงานเผยแพร่ในวารสาร

1.2 การศึกษาความชุกและการจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียเฉียบพลัน

ผู้วิจัยหลัก

ดร.ทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์

อาการท้องเสียเฉียบพลันนี้เป็นปัญหาที่สำคัญต่อสุขลักษณะของเด็กทั่วโลกนอกจากการติดเชื้อฮิวแมนโรตาไวรัสที่เป็นสาเหตุหลักอาการดังกล่าวแล้วยังมีไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับอาการดังกล่าว ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อต้องทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นความชุกของเชื้อไวรัสทั้งหมด ๕ ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการท้องเสียเฉียบพลันโดยเฉพาะในเด็ก ได้แก่ เชื้อฮิวแมนโรตาไวรัส เชื้อฮิวแมนแอสโทรไวรัส เชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส เชื้อฮิวแมนแซฟโฟไวรัส และ เชื้ออะดิโนไวรัส รวมไปถึงการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัส ต่าง ๆ ที่พบในผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาอาการท้องเสียเฉียบพลันในสถานพยาบาล ในการศึกษาทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด ๑,๑๗๒ ตัวอย่างจากสองแหล่งคือ แผนกผู้ป่วยใน ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร จำนวน ๒๑๒ ตัวอย่าง และ แผนกเด็กผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลเมืองซุมแพ อำเภอซุมแพ จ. ขอนแก่น จำนวน ๙๖๐ ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างทีเก็บตลอดช่วง ๕ ปี (พ.ศ.๒๕๕๒ – ๒๕๕๖) ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อฮิวแมนโรตาไวรัส ๔๖๕ ตัวอย่าง คิดเป็นประมาณร้อยละ ๓๙.๗ พบเชื้อฮิวแมนแอสโทรไวรัส ๓๑ ตัวอย่างซึ่งคิดเป็นร้อยละ ๒.๖ พบเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส ๑๒๔ ตัวอย่างซึ่งคิดเป็นร้อยละ ๑๐.๖ พบเชื้อฮิวแมนแซฟโฟไวรัส ๓๙ ตัวอย่างซึ่งคิดเป็นร้อยละ

๓.๓ และ เชื้ออะดิโนไวรัส ๖๖ ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ ๕.๖ ของตัวอย่างทั้งหมด ในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสแต่ล่ะชนิดแล้วพบว่ามีความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่ค่อนข้างมาก คือ สามารถแบ่งสายพันธุ์ G-type ของเชื้อฮิวแมนโรตาไวรัส ได้ทั้งหมด ๗ สายพันธุ์ ได้แก่ G1, G2, G3, G4, G8, G9 และ G12 ในขณะที่สามารถแบ่ง P-type ออกได้เป็น ๔ สายพันธุ์ ได้แก่ P[4], P[6], P[8] และ P[9] และเมื่อรวมกันระหว่าง G-type และ P-type สามารถจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสได้ทั้งหมด ๑๑ สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดสามสายพันธุ์ได้แก่ G1P[8], G3P[8] และ G2P[4] ในขณะที่พบฮิวแมนแอสโทรไวรัสสามารถจำแนกออกได้เป็น ๕ สายพันธุ์ ได้แก่ HAstV1, HAstV3, HAstV5, HAstV7, และ HAstV8 ฮิวแมนโนโรไวรัสสามารถจำแนกออกได้เป็น ๙ สายพันธุ์ ได้แก่ GII.1 ถึง GII.7, GII.12, และ GII.13 ฮิวแซฟโฟไวรัสสามารถจำแนกออกได้ทั้งหมด ๔ สายพันธุ์ ได้แก่ G.1, GI.2, GI.3 และ GII.1 และฮิวแมนอะดิโนไวรัสสามารถจำแนกได้ทั้งหมด ๑๒ สายพันธุ์ B1, B3, B7, C1, C2, C3, C5, C6, D8, D17, F40 และ F41 จากทั้งอุบัติการณ์ ลักษณะการกระจายรวมไปถึงสายพันธุ์ที่พบในทั้งสองช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง และแหล่งที่มาของตัวอย่าง มีความหลากหลาย รวมไปถึงยังมีตัวอย่างจำนวนหนึ่งที่ยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียเฉียบพลัน ดังนั้นการเฝ้าระวังการแพร่กระจาย หรือการระบาดของไวรัสในกลุ่มที่ทำการศึกษา หรือแม้แต่ไวรัสในกลุ่มอื่น ๆ ที่มีการรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการท้องเสียเฉียบพลันในเด็กจึงยังคงมีความจำเป็นเป็นอย่างมากดำเนินการเสร็จแล้ว อยู่ระหว่างการเตรียมผลงานเผยแพร่ในวารสาร

1.3 การศึกษา สัดส่วนการกระจาย จีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในประเทศไทย และความหลากหลายของยีน IL28B และ ITPA ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซี และพัฒนาวิธีตรวจจีโนไทป์ของ SNP บนยีน ITPA ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซี

ผู้วิจัยหลัก

ดร.รุจิพัชร์ วสิษฐ์ธัญเกษม

ศึกษาระบาดวิทยาของจีโนไทป์ไวรัสตับอักเสบซีในแต่ละภูมิภาคของประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบ การเฝ้าระวังระบาดวิทยาของการติดเชื้อ และอุบัติการของโรคตับอันเกิดจากไวรัสตับอักเสบซี ในแต่ละจีโนไทป์ โดยพบว่า ผู้ป่วยชาวไทยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทป์ 3a มากที่สุด รองลงมาคือจีโนไทป์ 6 จีโนโนไทป์ 1a และ 1b จีโนไทป์ 3b และ 2a พบสัดส่วนไวรัสจีโนไทป์ 3a มากที่สุดในทุกภูมิภาค ยกเว้นภาคเหนือ โดยทางภาคเหนือพบสัดส่วนไวรัสจีโนไทป์ 6 มากที่สุด และมีความหลากหลายของสับไทป์ของจีโนไทป์ 6 มากที่สุดถึง 6 สับไทป์ ส่วนภาคใต้พบสัดส่วนและความหลากหลายของจีโนไทป์ 6 ได้น้อยที่สุด

ศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล เหตุการณ์ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับกันติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในอดีตที่ส่งผลต่อการติดเชื้อในปัจจุบัน รวมทั้งแนวโน้มของอุบัติการ์ณโรคตับอันเกิดจากไวรัสตัวนี้ในอนาคต โดยพบว่าไวรัสตับอักเสบซีได้มีอยู่ในประเทศไทยมากกว่า 200 ปีแล้ว และจากการ

คำนวนมีการระบาดใหญ่เมื่อประมาณกลางทศวรรษ 1970 ถึงกลางทศวรรษ 1980 ซึ่งคาบเกี่ยวกับช่วงสงครามเวียดนามและมีฐานทัพอเมริกันมาตั้งอยู่ในประเทศไทยจำนวนมาก ทั้งยังนำการใช้เข็มฉีดยาเข้ามาในช่วงเวลานั้นด้วย

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของคนไข้ในบริเวณยีน IL28B กับผลการรักษาด้วยยา Interferon alpha และ ribavirin เพื่อใช้เป็นตัวชี้ทำนายแนวโน้มการตอบสนองและวางแผนการรักษาคนไข้ก่อนทำการรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพและประสิทธิผลสูงสุด โดยพบว่าผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีชาวไทยส่วนใหญ่มีลักษณะพันธุกรรมของ SNP:rs12979860 เป็นแบบ CC genotype และ SNP ดังกล่าวสามารถใช้ทำนายผลการรักษาได้เฉพาะผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี จีโนไทป์ 1 เท่านั้นไม่สามารถใช้ทำนายผลการรักษาในผู้ติดเชื้อไวรัสจีโนไทป์ 3 และ 6 ได้

ทำการพัฒนาวิธีการตรวจ ITPA-SNP ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว และได้ทราบข้อมูลพันธุกรรมของ ITPA-SNP โดยวิธีการนี้ได้ใช้ Tagman assay ซึ่งสามารถตรวจวัดดีเอนเอได้ความละเอียดต่ำสุด 1000 copy ต่อ uL

1.4 การศึกษาความชุกของภูมิคุ้มกันของประชากรไทยต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71

ผู้วิจัยหลัก

ดร. ปิยดา หลินศุวนนท์

งานวิจัยที่ดำเนินการแล้ว

ทำการตรวจวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 หรือวิธี microneutralization assay การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยานี้มีความไวและความจำเพาะสูงเนื่องจากเป็นการตรวจหาแอนติบอดี (antibody) ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส โดยการทดสอบจะทำเพื่อดูปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมของอาสาสมัครและแอนติเจนของเชื้อไวรัสเอนเทอโรไวรัส 71 ถ้าหากในตัวอย่างซีรัมมีแอนติบอดีอยู่ สารแอนติบอดีเข้าจับบนแอนติเจนของไวรัส และจะทำให้เกิดการลบล้างฤทธิ์ของเชื้อไวรัสลงได้ โดยจำนวนตัวอย่างซีรัมที่จะใช้ในการวิจัยมีทั้งหมด 600 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งออกเป็นตัวอย่างจากอาสามสมัครช่วงอายุต่างๆ ดังต่อไปนี้ กลุ่มที่ 1 เด็กแรกเกิดถึง 6 เดือน กลุ่มที่ 2 เด็กทารกอายุมากกว่า 6 เดือนถึง 2 ปี กลุ่มที่ 3 เด็กก่อนวัยเรียนอายุมากกว่า 2 ปีถึง 5 ปี กลุ่มที่ 4 เด็กปฐมวัยอายุมากกว่า 5 ปีถึง 12 ปี กลุ่มที่ 5 เด็กอายุมากกว่า 12 ปีถึง 18 ปี และกลุ่มที่ 6 อาสามสมัครอายุมากกว่า 18 ปีขึ้นไป

จากระยะเวลาดำเนินการวิจัย 6 เดือนที่ผ่านมา สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 161 ตัวอย่าง โดยมีอัตราส่วนของตัวอย่างที่ได้จากอาสาสมัครเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1:1.27 ค่าเฉลี่ยอายุของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างแจกแจงตามช่วงอายุแสดงดังรูปที่ 4 ผลค่าระดับภูมิคุ้มกันที่ตรวจวิเคราะห์ได้นั้น จะแปลผลดังต่อไปนี้ (1) กลุ่มตัวอย่างที่มีระดับ Antibody titer ตั้งแต่ 1:8 ถึง 1:64 จัดว่ามีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (2) กลุ่มตัวอย่างที่มีระดับ Antibody titer ตั้งแต่

1:128 ถึง 1:256 จัดว่ามีระดับภูมิคุ้มกันปานกลาง และ (3) กลุ่มตัวอย่างที่มีระดับ Antibody titer ตั้งแต่ 1:512ขึ้นไป จัดว่ามีภูมิคุ้มกันระดับสูงพบว่ามีกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอนเทอโรไวรัส หรือเท่ากับ 34.2% จากกลุ่มตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันเชื้อเอนเทอโรไวรัส 71 ทั้งหมด 106 ตัวอย่าง พบว่า 72 ตัวอย่างมีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (67.9%) 28 ตัวอย่างมีระดับภูมิคุ้มกันปานกลาง (26.4%) และ 6 ตัวอย่างมีระดับภูมิคุ้มกันสูง (5.7%) โดยมีค่าผลการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันเฉลี่ย (geometric mean titer: GMT) ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% (95%confidence interval) เท่ากับ 46.2 งานทางด้านภูมิต้านทานได้เสร็จแล้วขณะนี้รอเขียนรายงานแผยแพร่ในวารสารอีก 1 เรื่อง

1.5 การศึกษาและการวิเคราะห์ซีรั่มในลักษณะเชิงโมเลกุลของไวรัสที่มียุงเป็นพาหะ (ไข้เลือดออก, ไข้ชิคุนกันย่า, และไข้ไวรัสซิก้า) ในผู้ป่วยที่มีอาการไข้สูงเฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ ในประเทศไทย

ผู้วิจัยหลัก

ดร.สมพงษ์ วงษ์พันสวัสดิ์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ (1 ศึกษาผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาอาการป่วยไข้เฉียบพลันในระหว่างปี 2551-2552 ในภาคใต้และในปี 2556 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากไวรัสที่มียุงเป็นพาหะ 2) ตรวจสอบไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อไข้เลือดออก, ชิคุนกันย่า, และซิก้า และแหล่งพื้นที่ซึ่งทำให้เกิดการระบาด ผ่านลักษณะ genome ของไวรัส วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการและการกระจายทางภูมิศาสตร์ของไวรัสเหล่านี้ในประเทศไทย ความพยายามเหล่านี้อาจจะนำไปสู่กระบวนการตัดสินใจในการสร้างนโยบายสุขภาพของประชาชนและการปรับปรุงสาธารณสุขโดยรวมของสุขภาพของคนไทย

เมื่อต้นปี 2557 ทำการวิเคราะห์ ซีรั่ม ที่ได้รับจาก ผู้ป่วยที่มี โรคเหมือนไข้เลือดออกที่มาพบแพทย์ ที่โรงพยาบาลในจังหวัด นราธิวาส และ บึงกาฬ เนื่องจากปกติ จะไม่มีการตรวจวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบ สาเหตุของคนที่ไม่สบายและมีไข้เฉียบพลัน ตัวอย่างเลือดของคนไข้ถูกส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญไวรัสวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการวิเคราะห์ ผมแยก RNAรวมจากตัวอย่างเลือด และนำมาทำ RT- PCR เพื่อ แยกแยะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไวรัสที่พบ ถึงแม้ว่าสามารถตรวจยืนยันการติดเชื้อไข้เลือดออกใน ผู้ป่วยบางราย ผู้ป่วยจำนวนมากมีการติดเชื้อไวรัสชิคุนกันย่า การค้นพบนี้ได้รับการยอมรับในการตีพิมพ์ในวารสาร Emerging Infectious Diseases เมื่อเร็ว ๆ นี้

ถึงแม้ว่าในขณะนี้จะไม่มีการตรวจพบไวรัสซิก้าในผู้ป่วยที่ผมตรวจสอบ การตรวจสอบก็จะเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากว่าไวรัสซิก้าได้พบแล้วในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น มาเลเซีย, อินโดนีเซีย, และ ล่าสุดในประเทศกัมพูชา เนื่องจากความชุกของยุงลาย (*Aedes aegypti*) และยุง

Aedes albopictus ซึ่งทั้งสองเป็นพาหะของโรคไข้เลือดออก, ไข้ชิคุนกันย่า, และไข้ซิก้า และคนไทยจะยังประสบความเสี่ยงของการติดเชื้อโรคที่เหมือนไข้เลือดออกเหล่านี้ ดังนั้นการรับรู้ของการติดเชื้อไวรัสที่ถูกต้อง เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการดูแลทางการแพทย์ที่เหมาะสม และความตระหนักของการแพร่ระบาดของโรคจะมีผลต่อการวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วและถูกต้อง รวมถึงข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการป้องกันและการศึกษาระบาดวิทยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และคนไข้ต่อไปในอนาคต

1.6 การศึกษาระบาดวิทยา การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่และการแสดงออก ของ microRNA ระดับเซลล์ระหว่างการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่

ผู้วิจัยหลัก

นางสาวสลิลภร ปรัชญางค์ปรีชา

ปีที่แล้วได้ทำการออกแบบการตรวจวินิจฉัยไข้หวัดสายพันธุ์ H7N9 โดยวิธี Multiplex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (Multiplex RT-PCR) หลังที่มีการระบาดในประเทศจีนเมื่อปีที่แล้วโดยทดสอบความจำเพาะของ probe และ primer ที่ทางศูนย์ออกแบบกับตัวอย่างจากคนไข้ที่ตรวจพบไวรัสในระบบทางเดินหายใจชนิดต่างๆ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ประจำฤดูกาลรวมถึงไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังโรค รวมถึงการตรวจจับเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว ตั้งแต่ช่วงเดือนตุลาคมของปี 2556 จนถึงเมษายน 2557 ที่ผ่านมาได้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับ next-generation sequencing (454) ร่วมกับกลุ่มของ Dr. Bart Haagmans, virology department, Erasmus medical center โดยนำตัวอย่าง nasopharyngeal suction จากผู้ป่วยเด็กที่ผ่านการตรวจด้วยไวรัสในระบบทางเดินหายใจจากศูนย์เชี่ยวชาญทางไวรัสวิทยาคลีนิคแล้วผลเป็น negative ไปทำ next-generation sequencing ที่ประเทศ Netherlands หลังจากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับเทคนิค real-time PCR ว่ามี specificity และ sensitivity ที่เทียบเคียงกันได้หรือไม่

สำหรับความก้าวหน้าของผลงานตีพิมพ์นั้น ขณะนี้ได้อยู่ระหว่างการเขียนเรื่อง Application of next-generation sequencing in virus detection และ Influenza activity and occurrence in different climates คาดว่าจะสำเร็จการศึกษาภายในเทอมการศึกษานี้ (2557-2558)

1.7 ศึกษาความสัมพันธ์ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอับเสบบีหรือหายจากการติดเชื้อ กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Human leukocyte antigens (HLA) ในประชากรไทย

ผู้วิจัยหลัก

นางสาวนวรัตน์ โพธิ์สุวรรณ

Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร PLOS ONE, 2014 Jan 23

;9(1):e86007 นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการประเมินผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบบี ในงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ และภาวะภูมิคุ้มกันต่อโรคตับอักเสบ เอ บี และ ซี ในประชากรไทย ปีงบประมาณ 2545 - 2558

ในอนาคต งานที่กำลังจะเขียนเรื่องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอับเสบบี และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COL18A1, GRIK1 และ HLA-DQA1/DRB1 ในประชากรไทย เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร PLOS ONE

นางสาวนวรัตน์ โพธิ์สุวรรณ อยู่ในโครงการศึกษาปริญญาเอกร่วมกับประเทศญี่ปุ่น (Ronpaku) และจะสำเร็จการศึกษาในปีนี้

1.8 ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ whole genome และ evolution ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H3N2, H1N1 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี

ผู้วิจัยหลัก

นส. นิภาพร เทวาวงค์

งานวิจัยย้อนหลังและงานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่

ใช้วิธี Nested PCR และ DNA sequencing วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางด้าน bioinformatics เพื่อดูข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาและวิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ก่อโรคในมนุษย์เก็บข้อมูลการระบาดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H7N9เพาะเลี้ยงไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H3N2, H1N1 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในจังหวัดกรุงเทพมหานคร และขอนแก่น โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง MDCK (Madin-Darby kidney) cell และไข่ไก่ฟัก งานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไปและผลที่คาดว่าจะได้รับ วิเคราะห์ข้อมูล whole genome ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H3N2, H1N1 และไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี Expected outcome: ข้อมูลทางระบาดวิทยา อัตราการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (substitution rate) และ selection pressure ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ตรวจหาระดับแอนติบอดีในน้ำเหลือง (serum) ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆที่ก่อโรคในมนุษย์ โดยตัวอย่าง serum ได้จากประชากรจังหวัดขอนแก่นประมาณ 500 คน ทดสอบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการใน MDCK cells หรือไข่ไก่ฟัก (isolate และเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสที่ได้จาก Nasal / Nasopharyngeal swab ของผู้ป่วยปี 2014) โดยใช้วิธี Haemagglutination Inhibition test (HI test) และ Microneutralization assay test (MN test)

1.9 สำรวจด้านระบาดวิทยา พัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อเอนเทอโรไวรัสในประเทศไทย

ผู้วิจัยหลัก

นส.จิรัชญา พื้นผา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการระบาดของเชื้อเอนเทอโรไวรัสในประเทศไทยปี พ.ศ. 2555 ผลการศึกษาที่ได้พบว่า ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อเอนเทอโรไวรัสจากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการป่วยเป็นโรคมือเท้าปาก, herpangina และ influenza like illness ด้วยวิธี semi-nested PCR สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอนเทอโรไวรัสได้ทั้งสิ้น 17 สายพันธุ์ (coxsackievirus A4 (CAV4), A5, A6, A8, A9, A10, A12, A16, A21, B1, B2, B4, B5, echovirus 7, 16, 25 and Enterovirus 71) ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อเอนเทอโรไวรัสจากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการป่วยเป็นโรคมือเท้าปาก พบว่าเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุของโรคมากที่สุดคือ CAV6 (33.5%) รองลงมาคือ CAV16 (9.4%) และ EV71 (8.8%) ตามลำดับ ผู้ป่วยเด็กที่มีอาการป่วยเป็นโรค herpangina เชื้อไวรัสที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคมากที่สุดคือ CAV8 (19.3%) และผู้ป่วยเด็กที่มีอาการป่วยเป็นโรค influenza like illness เชื้อไวรัสที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคมากที่สุดคือ CAV6 (1.5%) งานวิจัยนอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาการตรวจวินิจฉัย เพื่อให้สามารถจำแนกเชื้อ Enterovirus และ Coxsakievirus โดยใช้การวินิจฉัยในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิค Multiplex-Real-time RT-PCR ได้ทำการพัฒนา 2 reactions ได้แก่ ใน reaction แรกประกอบด้วย primer และ probes ที่จำเพาะต่อยีน 5′UTR ของเชื้อ panenteroviruses เพื่อใช้ในการ screening และ ยีน GAPDH เป็น internal control และ ใน reaction ที่สองประกอบด้วย primer และ probes ที่จำเพาะต่อยีน VP1 ของเชื้อ EV71, CAV16 และ CAV6 เพื่อที่จะระบุสายพันธุ์ของเชื้อเอนเทอโรไวรัสที่พบมากที่สุดในการก่อให้เกิดโรคมือเท้าปาก

. . . . . .

1.10 ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจพบไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาในน้ำปัสสาวะกับเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูกในสตรีและได้ทำการศึกษาการตรวจพบไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาในน้ำปัสสาวะของผู้ชาย โดยใช้เทคนิค PCR และ DNA chip

ผู้วิจัยหลัก

นางสาวภรจริม นิลยนิมิต

ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการตีพิมพ์ในวารสาร Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (Nilyanimit P, Wanlapakorn N, Niruthisard S, Pohthipornthawat N, Karalak A, Laowahutanont P, Phanuphak N, Gemma N, Poovorawan Y. Detection of human papillomavirus in male and female urine by electrochemical DNA chip and PCR sequencing. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(9):5519-25.) และยังทำการศึกษาเปรียบเทียบการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูก

ด้วยตนเองกับการเก็บตัวอย่างเซลล์โดยแพทย์ ในการตรวจหาไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาในสตรีนอกจากนี้ยังทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *Uridine glucuronosiltransferase* (*UGT1A1*) ซึ่งก่อให้เกิดโรค Gilbert's syndrome และ Crigler-Najjar syndrome

งานที่จะวางแผนที่จะทำต่อในอนาคต คือทำการศึกษาการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งตัวของไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาจีโนไทป์11 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ที่ผ่าตัดหูดหงอนไก่ ชิ้นเนื้อของผู้ที่เป็นมะเร็งกล่องเสียงและในเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูก

1.11 ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

ผู้วิจัยหลัก

นส.หทัยพันธน์ รวมพรรณพงศ์

โรคติดเชื้อไวรัสเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในเด็กวัยแรกเกิดจนถึง 6 ปี และส่วนใหญ่มักพบในเด็กก่อนวัยเรียน บางครั้งเป็นถึงปีละหลายครั้ง โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อไวรัส อาจมีความรุนแรงแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของไวรัส และภูมิต้านทานของเด็กด้วย ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่างในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เป็นเชื้อที่มีความหลากหลาย สามารถจัดจำแนกทางซีวโมกุลได้ 4 สายพันธุ์ คือ HPIV-1 HPIV-2 HPIV-3 และ HPIV-4 ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาระบาดวิทยาเชิงซีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV โดยศึกษาจากตัวอย่างในระบบทางเดินหายใจ ครอบคลุมในภาคกลางของประเทศไทย ระยะเวลาที่ทำการศึกษาเป็นเวลา 4 ปีกับข้อมูลของการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV เชิงซีวโมเลกุลทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ตัวอย่างที่ทำการศึกษาครั้งนี้ทั้งสิ้น 650 ตัวอย่าง ในระหว่างปี 2010-2013 โดยใช้วิธี multiplex semi-nested PCR ในการคัดกรอง ผลการศึกษาพบว่า 4.76% (31/650) ของตัวอย่างให้ผลบวกต่อเชื้อ HPIV และมีการติดเชื้อร่วมของ HPIV กับไวรัสอื่นๆ ที่พบเป็นจำนวน 5 ตัวอย่าง ส่วนการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับซีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV ด้วยการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน HN พบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HPIV มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับ HPIV strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล ลำดับสายวิวัฒนาการของ HPIV ถูกแยกออก เป็นสองกลุ่มหลัก แต่ละกลุ่มได้รับการจำแนกออกเป็นกิ่งย่อย โดย HPIV ทั้ง 4 สายพันธุ์ ถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ในสายพันธุ์เดียวกันของ HPIV นั้น มีค่าตั้งแต่ 84.4-100% แม้ว่าอัตราการระบาดของเชื้อ HPIV มีอัตราการระบาดที่ต่ำ แต่เป็นภาระทางการเงินของระบบสาธารณสุขของประเทศ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับข้อมูลการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคนี้ในอนาคต

1.12 การศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส

ผู้วิจัยหลัก

นส ประภาพร คุณทา

โดยใช้ตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหาร ผ่านการวิเคราะห์ในส่วนของยีน hexon และ fiber ในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2552-2557

1. Screen หาเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2556 ถึงปลายปี พ.ศ. 2556 โดยใช้ตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหาร ที่ได้จากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และ DNA sequencing ในส่วนของยีน Hexon นอกจากนี้ได้นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสจำนวน 76 ตัวอย่าง ที่ได้เคยมีการศึกษาวิจัยมาก่อนหน้านี้ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2555 มาทำการสกัด DNA ใหม่ จากนั้นนำไปทำ PCR และ DNA sequencing ในส่วนของยีน Fiber เพื่อดูการเกิดรีคอมบิเนชั่นของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสในประเทศไทยตั้งแต่ พ.ศ.2552-2557

2. จากตัวอย่างของระบบทางเดินอาหารทั้งหมด 106 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัสทั้งหมด 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 14.15% โดยจะพบในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันออกไป คือพบ HAdV-F41 4 ตัวอย่าง HAdV-F40 3 ตัวอย่าง HAdV-C1 2 ตัวอย่าง HAdV-C2 2 ตัวอย่าง HAdV-D15 2 ตัวอย่าง HAdV-C5 1 ตัวอย่าง และ HAdV-C6 1 ตัวอย่าง

3. งานที่จะทำต่อไปคือ นำ sequence ที่ได้จากการวิเคราะห์ในส่วนของยีน Fiber ไป Blast ใน NCBI เปรียบเทียบกับ sequence ที่ได้จากการวิเคราะห์ในส่วนของยีน Hexon เพื่อดูการเกิดรีคอมบิเนชั่นของเชื้อฮิวแมนอะดิโนไวรัส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HAdV มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Phylogenetic analysis เพื่อจัดกลุ่มของ HAdV genotype ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับ reference strain ใน Gen bank

1.13 ระบาดวิทยาและจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโคโรนาที่มี การติดเชื้อในผู้ป่วยไทยช่วงปี ค.ศ. 2012-2013

ผู้วิจัยหลัก

นส.รพีพรรณ สูณรงค์

ศึกษาจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Coronavirus (HCoV) ที่แพร่กระจายในช่วงปี 2012-2013 ขอบข่ายงานวิจัยในครั้งนี้จะเริ่มจากการเตรียม positive control ที่ได้รับความช่วยเหลือเรื่องตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MERS-CoV จากสถาบัน Erasmus Medical Center ประเทศเนเธอร์แลนด์ ส่วนตัวอย่างที่เป็น positive ของ HCoV สายพันธุ์อื่นๆ (229E, OC43, NL63, HKU1) จะได้จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกในรูปแบบ nasal swab โดยใช้วิธี DNA cloning ซึ่งออกแบบไพร์เมอร์ที่ใช้ในบริเวณยีน *Orf1b* และ *S* เมื่อเตรียม positive control เรียบร้อยแล้วก็เข้าสู่กระบวนการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งมาตรวจสอบที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ของระบบทางเดินหายใจ เช่น

nasopharyngeal swab และ nasopharyngeal aspiration จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลบางปะกอก 9 โรงพยาบาลชุมแพ และโรงพยาบาลชลบุรี เป็นจำนวนทั้งสิ้น 5,833 ตัวอย่างโดยเริ่มจากนำสิ่งส่งตรวจที่ได้มาสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA) ออกจากเซลล์ จากนั้นก็ทำ reverse transcription เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA เสร็จแล้วตรวจสอบผลการสกัดโดยดูการแสดงออกของ GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene แล้วจึงเข้าสู่การการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาด้วยวิธี semi-nested PCR โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบจะออกแบบในส่วนยีน *Orf1b* และยืนยันผลที่ได้โดยออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน *S* แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis หากพบว่าตัวอย่างนั้นให้ผลบวกต่อ MERS-CoV ก็จะส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่บริษัท First base laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยวิธีของ Sanger

ผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษา ไวรัสโคโรนา ในประเทศไทย พบว่าสิ่งส่งตรวจที่นำมาตรวจสอบนั้นยังไม่พบสิ่งส่งตรวจใดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ MERS-CoV ประเทศไทยและพบสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์อื่นๆ 46 ตัวอย่างจากจำนวน 5,833 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.79 แบ่งเป็นสายพันธุ์ HCoV-229E 5 ตัวอย่าง HCoV-OC43 3 ตัวอย่าง HCoV-HKU1 19 ตัวอย่างและ HCoV-NL63 19 ตัวอย่าง งานวิจัยนี้ก็ยังมีการทดสอบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ ไวรัสโคโรนา ด้วย โดยพบว่าความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบในการศึกษาต่อปริมาณ copy ของ template ที่น้อยที่สุดถึง 10 copy/μl และเมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ ก็พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อเชื้อ ไวรัสโคโรนา เท่านั้น

การวางแผนงานในอนาคตจะเฝ้าติดตามการระบาดของเชื้อ MERS-CoV ในประเทศไทย ถึงแม้จะยังไม่พบผู้ติดเชื้อแต่ถึงอย่างไรก็ตามก็จะต้องมีการสอบสวนและเฝ้าระวังโรคนี้อย่างใกล้ชิด ช่วยให้สามารถตรวจพบการเข้ามาของเชื้อ ได้อย่างทันท่วงที และจำกัดวงการแพร่ระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้บางส่วนได้ตีพิมพ์ลงในวารสารกุมารเวชศาสตร์ในบทความเรื่อง "การติดเชื้อฮิวแมนโคโรน่าไวรัสในผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย 2555" ฉบับที่ 2 ปีที่ 53 เดือนเมษายน-มิถุนายน 2557 และวารสารคลินิกในบทความเรื่อง "ปอดบวมตะวันออกกลาง : เมิร์ส (MERS)" ปีที่ 30 ฉบับที่ 6 มิถุนายน 2557

1.14 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Genetic variation ในยีน ITPA ที่ตำแหน่ง rs1127354 กับการเกิดโลหิตจาง ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง ที่ได้รับการรักษาด้วยยา PEG-IFNα ร่วมกับ ยา RBV โดยใช้เทคนิคTaqMan probe real-time PCR

ผู้วิจัยหลัก

นางสาวอุมาพร ลิโมทัย

จากผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มผู้ป่วย 121 คน พบ SNPs ของยีน ITPA ที่ตำแหน่ง rs1127354 มี CC genotype 63% และ non-CC genotype 37% ในขณะที่กลุ่มคนปกติจำนวน100 คน มี CC genotype 60% และ non-CC genotype 40% เมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มผู้ป่วยร่วมกับข้อมูลทางคลินิก พบว่า อายุ, เพศ, Baseline HCV RNA, ระดับฮีโมโกลบินก่อนการรักษา ไม่แตกต่างกันในกลุ่ม CC และ non-CC genotype ในขณะที่ในสัปดาห์ที่ 4 ของการรักษา กลุ่มที่มี CC genotype มีเปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่มีระดับฮีโมโกลบินลดลงมากกว่า 3 g/dL ณ สัปดาห์ที่4 ของการรักษามากกว่ากลุ่ม non-CC genotype อย่างมีนัยสำคัญ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน HLA-DPA1(ตำแหน่ง rs3077), IL28B (ตำแหน่ง rs8099917), IFNL4(ตำแหน่ง ss469415590) โดยใช้เทคนิคTaqMan probe real-time PCR การทดลอง ณ ปัจจุบัน อยู่ในช่วงการสกัด DNA จาก PBMC ของผู้ป่วย โดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction และการทำ real-time PCR

งานที่วางแผนจะทำต่อไปในอนาคต

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน IP-10 (ตำแหน่ง rs1439490) กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม interferon ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบเรื้อรัง

1.15 การศึกษาการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของฮิวแมนโนโรไวรัสในประเทศไทย ช่วงปี ค.ศ. 2009-2014 (Recombination detection of human norovirus in Thailand during 2009-2014)

ผู้วิจัยหลัก

น.ส. ฑิฆัมพร พุ่มผลทรัพย์

ตัวอย่างที่ให้ผล positive จากการทดสอบหาเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสจากอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียตั้งแต่ปี 2009 จนถึงปัจจุบัน รวมทั้งหมด 138 ตัวอย่าง มาสกัดอาร์เอ็นเอไวรัส จากนั้น reverse transcription เปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA และนำมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Multiplex Nested – Polymerase Chain Reaction (PCR) โดย primer ที่ใช้จะครอบคลุมช่วงของยีน VP1 แล้วหาขนาด PCR Product ที่ต้องการด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และนำ PCR Product จาก gel ที่ตัดออกมาให้บริสุทธิ์ จากนั้นส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างทั้งหมด 138 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผล positive และสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 97 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด 97 ตัวอย่างมา blast ใน ncbi เพื่อดูว่าเชื้อของเรามีความคล้ายกับสายพันธุ์ใดในฐานข้อมูล จากนั้นทำการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์จาก forward และ reverse ให้เป็นเส้นเดียวกันด้วยโปรแกรม Seqman และทำการรวบรวม reference sequence ของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัสในแต่ละสายพันธุ์ที่สามารถพบได้บ่อยจากฐานข้อมูล ncbi ทั้ง GI และ GII รวมทั้งหมด 35 ตัวอย่าง จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเรา 97 ตัวอย่าง และ reference

sequence 35 ตัวอย่าง มา alignment ด้วยโปรแกรม Bioedit และตรวจสอบความเรียบร้อยของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดให้ถูกต้องเป็นระเบียบ เพื่อเตรียมนำนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA

งานที่จะทำต่อไปในอนาคต คือ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลโดยทำ phylogenetic tree เพื่อดูความใกล้เคียงของสายพันธุ์โดยเทียบกับฐานข้อมูลของสายพันธุ์ทั้งหมดของเชื้อฮิวแมนโนโรไวรัส และเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree ที่ได้จากยีน RdRP จากนั้นออกแบบ primer ที่ครอบคลุมช่วงของยีนตั้งแต่ยีน RdRp ถึง VP1 เพื่อทำการเพิ่มจำนวนและนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบดูการเกิด recombination และนอกจากนี้ก็จะวิเคราะห์ข้อมูลของสายพันธุ์ด้วย similarty plot เพื่อดูความใกล้เคียงของสายพันธุ์และตรวจหาบริเวณที่เกิด recombination

1.16 การสำรวจระบาดวิทยาโมเลกุล และศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของจีโนมในผู้ป่วยโรคมือ เท้า ปาก ในประเทศไทย

ผู้วิจัยหลัก

นายจอน เมาพีกุลไพโรจน์

โรคมือ เท้า ปาก (Hand-Foot-and-Mouth Disease) ที่มีสาเหตุเกิดจาก *Enterovirus* มักพบได้บ่อยในเด็กเล็ก โดยเฉพาะเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี เชื้อที่พบเป็นสาเหตุของโรคมือ เท้า ปากจะแตกต่างกันในพื้นที่ที่มีการระบาดที่ต่างกัน โครงการวิจัยนี้ศึกษาและค้นหาenterovirusสายพันต่างๆที่ เป็นเหตุของกาารเกิดโรคมือ เท้า ปากในคนไข้ งานวิจัยจะทำการสำรวจข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ ตัวอย่างของคนไข้จากปี 2008 ที่ตรวจหาเชื้อไวรัส HEV71 CV-A16 และ CV-A6 แล้วเป็นผลลบ จะถูกนำมาตรวจดรวจว่ามีการติดเชื้อของenterovirusเชื้ออื่นหรือไม่ จากนั้นจึงนำตัวอย่างบางตัวอย่างมาศึกษา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของไวรัส

งานวิจัยจะใช้วิธี CODEHOP ที่สามารถตรวจEnterovirusได้หลากหลายเชื้อโดยทำ Semi-nested PCR จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน VP1 มาวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อ enterovirus ตัวนั้นแล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของแต่ละสายพันธุ์และดูการระบาดของแต่ละสายพันธุ์ต่อไป

จากที่เริ่มตรวจจนถึงปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมือ เท้า ปาก นั้นมีหลายสายพันธุ์ซึ่งสายพันธุ์และจำนวนที่พบนั้นได้ระบุไว้ในตาราง โดยหลายสายพันธุ์ที่ตรวจพบนั้น ไม่มีการรายงานมาก่อน

การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของไวรัสHEV71มาวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree analysis) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างและการเปลี่ยนแปลงของไวรัสเชื้อHEV71ที่ตรวจพบในช่วงกลางปี2012และต้นปี2013

หลังจากนี้งานวิจัยจะนำตัวอย่างของเชื้อCV-A6 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรคมือ เท้า ปาก ในปี 2012 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของไวรัส

1.17 การศึกษา Porcine rotavirus group A

ผู้วิจัยหลัก

สุพรรษา ด่วนทัพ

งานที่ทำใน ช่วง 6 เดือนที่ผ่านมา:

Porcine rotavirus group A screening; กับตัวอย่างตั้งแต่ปี 2011-2014 รวม 170 samples โดยใช้

- VP7 gene primer (partial) ได้เป็น 3 G (G3/ G4/ G9)
- VP4 genes primer (almost full-length gene) ได้เป็น 3 P (P6/ P13/ P19)
- VP6 gene primer (กับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ VP7 และ VP4) กับ 12 samples โดย 11 samples ให้ผลเป็น I5 type ที่พบในสุกรเท่านั้น และ 1 sample ให้ผลเป็น I1 type ที่รายงานว่าพบในมนุษย์

ออกแบบ primer สำหรับ non-structural genes ได้แก่ NSP1/ NSP2/ NSP3/ NSP4/ NSP5 gene primers (partial) โดยขณะนี้ได้ condition สำหรับ NSP1 (A type) and NSP2 gene (N type) เป็นที่เรียบร้อย รอนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาเพิ่มจำนวนเพื่อเช็ค genotype ของ NSP1 (18 A types) และ NSP2 (10 N types) PEDV co-infection (porcine epidemic diarrhea virus; alpha coronavirus) screening based on Spike gene.

Work planning for the next 2 years:

Rotavirus A; Design primer สำหรับ structural gene อีก 3 genes ได้แก่ VP1/ VP2/ VP3 เพื่อตรวจเช็ค genotype (R/ C/ M type) ของ porcine rotavirus A samples, Rotavirus B and C; Design primer สำหรับ screening rotavirus group อื่นๆ ได้แก่ group B and C โดยใช้ VP7 gene เพื่อรายงานผลการเกิด co-infection กับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ porcine rotavirus group A, PEDV; รวบรวมผลการทำ molecular sequencing based on Spike, Nucleocapsid and ORF3 genes กับตัวอย่างที่เก็บมาระหว่างปี 2011- มกราคม 2014 เพื่อเขียนรายงานส่งตีพิมพ์เกี่ยวกับอุบัติการณ์การเกิดโรค PEDV outbreak, %identity and similarity ระหว่างตัวอย่างที่เก็บในประเทศไทย และ ระหว่าง reference strains ที่มีรายงานใน NCBI database

1.18 ความสัมพันธ์ระหว่าง TNF-α gene polymorphism กับมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงไทย

ผู้วิจัยหลัก

นางสาวกฤตภัค หอมจันทร์

ศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs (Single nucleotide polymorphism) ในตำแหน่ง promoter

ได้แก่ -238 และ -308 ของยีน TNF-α ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) ในกลุ่ม High-risk ด้วยวิธี PCR และ direct sequencing ใน cervical specimen ของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยปัจจุบันได้ผล genotype ของ SNPs ทั้งสองตำแหน่งในกลุ่ม case คือผู้ที่ติดเชื้อ HPV กลุ่ม High-risk แล้วทั้งหมด 130 ตัวอย่าง และในกลุ่ม control คือผู้ที่ติดเชื้อ HPV กลุ่ม Low-risk หรือไม่พบการติดเชื้อ 110 ตัวอย่าง และกำลังรอผลจากการ sequencing อีก 10 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยการคำนวณค่านัยสำคัญทางสถิติต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่าง ITGB2 gene polymorphism กับ Biliary Atresia หรือโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs ในตำแหน่ง 3'-UTR+145 ของยีน ITGB2 ในผู้ป่วยท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญในประชากรจีน โดยงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ประกอบด้วยกลุ่ม case คือ ผู้ป่วยท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 93 ราย และกลุ่ม control มาจากการสุ่มเด็กที่มีสุขภาพดีจำนวน 93 ราย โดยใช้เทคนิค PCR และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) จากผลที่ได้พบว่า ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ allele และ genotype ในระหว่างกลุ่ม case และ control ที่ตำแหน่ง 3'-UTR+145 ของยีน ITGB2 ในผู้ป่วยท่อน้ำดีตีบตันในประชากรไทย

Candida spp. ใน Oral Mucosal Lesions ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่ได้รับการรักษาด้วยยา HAART

ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ Candida ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่เข้ารับการรักษาโรคในช่องปาก ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วย HIV ที่ได้รับการรักษาด้วย HAART มากกว่า 5 ปี กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วย HIV ที่ไม่ได้รับ HAART กลุ่มที่ 3 คือ ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจากแม่และรับการรักษาด้วย HAART อย่างต่อเนื่อง และกลุ่มที่ 4 คือ ผู้ที่ไม่พบติดเชื้อ HIV โดยใช้วิธี sequence analysis ของ rRNA gene ในส่วน internal transcribed spacer 1 (ITS1) และ ITS2 จากตัวอย่างที่ได้จากลิ้น ร่องเหงือก และ mucosal lesions ของผู้ป่วย โดยผลที่คาดว่าจะได้รับคือ ความชุกของเชื้อ Candida สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ป่วย HIV ที่ได้รับการรักษาด้วย HAART/ไม่ได้รับ HAART และในกลุ่มผู้ที่ไม่ติดเชื้อ และได้วิธีใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อมากกว่าวิธีดั้งเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

1.19 ความสัมพันธ์ชนิดของโพลีมอร์ฟิซึมของยีนที่เกี่ยวเนื่องกับเมตาบอลิซึมของวิตามินดี และยีน IP-10 กับการหายของโรคตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสซีที่ได้รับการรักษาด้วยยาเพ็กกีเลตเด็ดอินเตอร์ เฟียรอน และไรบาวิริน

ผู้วิจัยหลัก

นส.สิรินพร สุขสวัสนดิ์อำนวย

ผลงานช่วง 1-2 ปีที่ผ่านมา

ศึกษาชนิดของโพลีมอร์ฟิซึมของยีนที่เกี่ยวเนื่องกับเมตาบอลิซึมของวิตามินดี และยีน IP-10 กับการหายของโรคตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสซีที่ได้รับการรักษาด้วยยาเพ็กกีเลตเต็ดอินเตอร์เฟียรอนและไรบาวิริน ในผู้ป่วยจำนวน 600 รายระหว่างเดือน มิถุนายน 2555 ถึง เดือน พฤศจิกายน 2556 ของโรงพยาบาลจุฬาลกรณ์ และโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น จากการศึกษา SNP ทั้งหมด 15 ตำแหน่งที่อยู่ในเมตาบอลิซึมของวิตามินดี และยีน IP-10 ด้วยวิธี PCR-RFLP

1.20 การศึกษา clinical การรักษาในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบ บี และ ซี

ผู้วิจัยหลัก

นพ.กิตติยศ ภู่วรวรรณ

ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไวรัสตับอักเสบในประเทศไทยในแง่มุมต่างๆ ในแง่ของกลไกการเกิดเกิดโรค ระบาดวิทยา และการป้องกัน