นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจหาไวรัสโรตาในผู้ป่วยเด็กอุจจาระร่วง โดยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis

สลักจิต ชุติพงษ์วิเวท*
ทัศนัย วนรัตน์วิจิตร**

บทคัดย่อ

ผู้ศึกษาได้ทำการตรวจหาไวรัสโรตาโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อตรวจหา RNA segment ของไวรัสโรตาจากตัวอย่างอุจจาระของเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ จำนวน 164 รายตั้งแต่เดือนตุลาคม 2536 ถึงกันยายน 2537 ตรวจพบไวรัสโรตาจำนวน 56 ราย (34.0%) เป็นไวรัสโรตาชนิด long form 52 ราย (92.86%) และไวรัสโรตาชนิด short form 4 ราย (7.14%) นอกจากนี้ยังพบว่าความชุกของการเกิดโรคไวรัสโรตาอยู่ในช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ อายุของเด็กที่เป็นโรคไวรัสโรตาอยู่ระหว่าง 7-24 เดือน และโอกาสของการป่วยด้วยโรคไวรัสโรตาของเด็กที่มีภูมิลำเนาในเขตเทศบาลไม่แตกต่างจาก เด็กที่มีภูมิลำเนานอกเขตเทศบาล อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

คำหัส : ไวรัสโรตา, Polyacrylamide gel electrophoresis, RNA segment

---

*ฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่
**กลุ่มงานกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลนครพิงค์ เชียงใหม่

Abstract : Detection of Rotavirus in Children with Diarrhea by Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Chutipongvivat S*, Wanaratwijit T**

While employing the technique of polyacrylamide gel electrophoresis of viral genome RNA segments, we studied Rotavirus strains. From October 1995-September 1996, 164 stool specimens of pediatric patients with acute diarrhea were collected. Of these 56 were positive (34.0%). Of the positive specimens, 52 (92.86%) were long form and 4 (7.14%) were short form. The most common age group with positive results was between 7-24 months. Prevelance was greatest between December and February in the above mentioned period. There was no statistically significant difference in Rotavirus infection between the children dwelling in better sanitary conditions in cities or towns, to those residing in rural areas ($p>0.05$).

Key words : Rotavirus, Polyacrylamide gel electrophoresis, RNA segment

---

*Clinical Pathology Section, Regional Medical Sciences Center, Chiang Mai.
**Pediatric Section, Nakornping Hospital, Chiang Mai

บทนำ

โรคอุจจาระร่วงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย จากรายงานของกองระบาดวิทยา ปี พ.ศ. 2535 พบผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงจำนวนถึง 792,512 คน เป็นผู้ป่วยภาคเหนือ 154,000 คน[1] สาเหตุส่วนใหญ่มาจากการติดเชื้อและพบว่าไวรัสโรตา เป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งโดยเฉพาะในเด็กเล็ก[2,3] การตรวจวินิจฉัยและศึกษาวิจัยไวรัสโรตาสามารถทำได้หลายวิธีเช่น Electron microscopy, ELISA และ Dot hybridization technique[4] แต่วิธีดังกล่าวมีความยุ่งยาก และใช้ความชำนาญสูง ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจและเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย 2 วิธี คือ ELISA[5] และ Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of viral RNA segment หรือบางครั้งเรียกว่า RNA electrophenotyping ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง[6] แต่วิธี RNA electrophenotyping จะดีกว่าเนื่องจากสามารถแยก phenotype ของเชื้อไวรัสโรตาได้ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาทางระบาดวิทยา ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ขวบ ที่เข้าการรับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการของโรคอุจจาระร่วงตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2536-กันยายน 2537 ประมาณ 2 cc. บรรจุในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด (microcentrifuge tube) นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสโรตาด้วยวิธี RNA electrophenotyping ของสถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การสกัด อาร์ เอ็น เอ สายคู่ของไวรัสโรตา

นำตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่ต้องการทดสอบมาผสมกับ dilution buffer (1M Tris HCl, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 10% SDS) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วนำสารละลายอุจจาระมาสกัดแยก อาร์ เอ็น เอ ด้วย saturated phenol + chloroform (1:1) ปั่นแยกเก็บ

aqueous phase แล้วนำมาผสมกับ loading buffer (1:1) ก่อนนำมาวิเคราะห์

2. วิเคราะห์การเคลื่อนที่ของ อาร์ เอ็น เอ ใน PAGE

นำ aqueous phase ที่เตรียมได้มาวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของ อาร์ เอ็น เอ ด้วยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis โดยใช้ 3% Stacking gel และ 10% separating gel ใช้กระแสไฟฟ้า 40 mA นาน 1 ชั่วโมง

3. การย้อมเจลด้วยสารละลายเงิน

นำเจลที่ผ่านการแยกด้วยวิธี electrophoresis มาย้อมด้วย 11 mM silver nitrate หยุดปฏิกิริยาการย้อมด้วย 10% acetic acid

การอ่านผล

ในรายที่ให้ผลบวก จะพบแถบ RNA ซึ่งเคลื่อนที่ในเจล โดยมีรูปแบบเฉพาะตัวประกอบด้วย RNA 11 segment แบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ long pattern และ short pattern เปรียบเทียบผลของตัวอย่างที่วิเคราะห์กับตัวอย่าง control

ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า ตัวอย่างอุจจาระจำนวน 164 ราย ตรวจพบเชื้อไวรัสโรตา จำนวน 56 ราย (34.0%) เป็น long form 52 ราย (92.86%) และ short form 4 ราย (7.14%) อุบัติการณ์ของการตรวจพบเชื้อไวรัสโรตา พบสูงสุดในช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์จำนวน 33 ราย (58.93%) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตาจะสูงสุดในผู้ป่วยช่วงอายุ 7–24 เดือน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 การตรวจหาไวรัสโรตาในอุจจาระแยกเป็นรายเดือน

เดือน	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	ตรวจได้ผลบวก	ร้อยละ	long form	short form
ตุลาคม	10	3	30.0	3	0
พฤศจิกายน	14	5	35.71	5	0
ธันวาคม	16	13	81.25	13	0
มกราคม	18	15	83.33	15	0
กุมภาพันธ์	14	6	42.86	5	1
มีนาคม	16	3	18.75	2	1
เมษายน	18	2	11.11	2	0
พฤษภาคม	20	2	10	1	1
มิถุนายน	8	3	37.50	2	1
กรกฎาคม	14	0	0	0	0
สิงหาคม	10	1	10	1	0
กันยายน	10	3	30	3	0
	164	56	34	52	4

ตารางที่ 2 การตรวจหาไวรัสโรตาในอุจจาระของผู้ป่วยแยกตามอายุ

อายุ (เดือน)	จำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจ	ตรวจได้ผลบวก	ร้อยละ
0-6	30	8	26.67
7-12	42	23	54.76
13-18	33	12	36.36
19-24	31	9	29.03
25-30	12	2	16.67
31-36	8	1	12.5
37-42	4	1	25
43-48	2	0	0
49-54	1	0	0
55-60	1	0	0

ในจำนวนเด็กที่ป่วยและเข้ารับการรักษา จำนวน 164 ราย พบว่าเด็กในเขตเทศบาลจำนวน 44 รายป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตา จำนวน 11 ราย และเด็กนอกเขตเทศบาลจำนวน 120 ราย ป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตา จำนวน 40 ราย (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจอุจจาระกับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย

ผลการตรวจอุจจาระ	ในเขตเทศบาล	นอกเขตเทศบาล	รวม
ผลบวก	11	40	51
ผลลบ	23	80	113
รวม	44	120	164

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่าพบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตาในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบในจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งเป็นจังหวัดในเขตภาคเหนือมีประมาณร้อยละ 34 ในขณะที่การศึกษาในจังหวัดสงขลาที่เป็นจังหวัดในเขตภาคใต้ตรวจพบร้อยละ 31.5[7] และการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสโรตาจะพบมากในเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่ภาคเหนือตอนบนมีอากาศหนาวเย็น และอุณหภูมิโดยเฉลี่ยต่ำซึ่งสอดคล้องกับธรรมชาติของไวรัสโรตาที่ชอบอากาศแห้งและอุณหภูมิต่ำ[8] และกลุ่มอายุที่พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสโรตามากที่สุดคือ เด็กในกลุ่มอายุ 7-24 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่พบว่าเด็กในวัยนี้มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากเชื้อนี้มากที่สุด[9] นอกจากนี้ยังพบว่าโอกาสของการป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตาของเด็กในเขตเทศบาลไม่มีความแตกต่างกับเด็กนอกเขตเทศบาล ($p>0.05$) เนื่องจากการพัฒนาการสาธารณสุขในเขตชนบทโดยเฉพาะงานอนามัย

ครอบครัวและอนามัยชุมชนและสิ่งแวดล้อมได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณและประชาสัมพันธ์อย่างต่อเนื่อง ทำให้ประชาชนมีความระมัดระวังในการบริโภคอาหาร และดื่มน้ำที่สะอาดถูกหลักอนามัย จึงทำให้อัตราการติดเชื้อของเด็กในเขตเทศบาลไม่มีความแตกต่างจากเด็กนอกเขตเทศบาล นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าการระบาดของเชื้อไวรัสโรตาในภาคเหนือส่วนใหญ่เป็นชนิด long form ซึ่งเหมือนกับการศึกษาในภาคใต้ที่ตรวจพบไวรัสโรตาชนิด long form เหมือนกัน[7] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า ไวรัสโรตาชนิด long form น่าจะเป็นเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. รายงานการเฝ้าระวังโรค : กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข 1992; 22: 49-56.
2. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, *et al.* Virus particle in epithelial cell of duodinal mucosa from children with acute non bacterial gastroenterititis. Lancet 1973; 2: 1281-3.
3. Espejo RT, Caldron E, Gonzalez N, *et al.* Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City, 1977. J Infect Dis 1979; 139: 474-7.
4. Tantivanich S, Suwannasopone N, Chaicumpa, *et al.* Comparison of ELISA with EM and PAGE for the detection of human rotavirus in stools. J Med Assoc Thai 1988; 71: 436-42.
5. Yolken, RH, Wyatt RG, Zissis G, *et al.* Epidemiology of human rotavirus type I and II as study by ELISA. J Engl Med 1978; 299: 1156-61.
6. Rodger SM, Bishop RF, Birch C, *et al.* Molecular epidemiology of human rotavirus in Melbourne, Australia, from 1973-1979 as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. J Clin Microbiol 1981; 13: 272-8.
7. เยาวมาลย์ สุติวิจิตร, ชัยสิทธิ แสงทวีสิน, เนาวรัตน์ ทองเสน. การตรวจหาไวรัสในผู้ป่วยอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่รับไว้ในโรงพยาบาลสงขลา. วารสารวิชาการเขต 9 พ.ศ. 2533 ฉบับที่ 1; หน้า 19-33.
8. Konno T, Suzuki H, Katsushima N, *et al.* Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. J Infect Dis 1983; 147: 125-8.
9. Tranut AL, Chonmatreet GP. Incidence of rotavirus infection in different age groups of pediatric patients with gastroenteritis. J Clin Microbiol 1982; 16: 568-96.