การตรวจหาเชื้อไวรัส HPV และ EBV จากแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำประปา จังหวัดพะเยา เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อ HPV และ EBV ในเลือด

สุธิดา พงษ์ภักดีสกุล

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การตรวจหาเชื้อไวรัส HPV และ EBV จากแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำประปา จังหวัดพะเยา เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อ HPV และ EBV ในเลือด

สุธิดา พงษ์ภักดีสกุล

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

SCREENING FOR HPV AND EBV FROM NATURAL WATER SOURCES AND TAP WATER, PHAYAO PROVINCE TO STUDY THE PREVALENCE OF HPV AND EBV INFECTION IN THE BLOOD.

SUTIDA PONGPAKDEESAKUL

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Biotechnology

May 2023

Copyright 2023 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อไวรัส HPV และ EBV จากแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำประปา จังหวัดพะเยา เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อ HPV และ EBV ในเลือด

ของ สุธิดา พงษ์ภักดีสกุล

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีวัลย์ บำรุงไทย)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร. รวิสรา รื่นไวย์)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก)

เรื่อง: การตรวจหาเชื้อไวรัส HPV และ EBV จากแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำประปา จังหวัดพะเยา เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อ HPV และ EBV ในเลือด

ผู้วิจัย: สุธิดา พงษ์ภักดีสกุล, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.รวิสรา รื่นไวย์

คำสำคัญ: เอ็บสไตบาร์ไวรัส, แพปพิลโลมาไวรัส, เลือด, น้ำธรรมชาติ, น้ำประปา

บทคัดย่อ

เอ็บสไตบาร์ไวรัส (อีบีวี) หรือเฮอร์ปีไทป์ 4 ไวรัส (เอชเอชวี4) เป็นไวรัสที่พบทั่วโลกก่อให้เกิดโรคโมโนนิวคลิโอซิส เป็นต้น แพปพิลโลมาไวรัสหรือเอชพีวี ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก และหูดหงอนไก่ โดยเชื้อทั้งสองชนิดอาจมีส่วนในการทำให้เกิดมะเร็งคอหอยส่วนปาก ซึ่งคาดว่าติดต่อผ่านสารคัดหลั่งและการมีเพศสัมพันธ์ โดยการมีอยู่ของไวรัสทั้งสองชนิดในเลือดอาจเกิดความเสี่ยงในการบริจาคเลือดได้ อย่างไรก็ตามอีบีวี มีการติดต่อในประชากรหมู่มากซึ่งมีความเป็นไปได้ที่อีบีวี อาจติดต่อผ่านน้ำโดยผ่านทางการอุปโภคและบริโภค ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการพบอีบีวีในแหล่งน้ำ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการมีอยู่ของเชื้ออีบีวีและเอชพีวี จากแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำประปาและเลือดของประชากรสุขภาพดี ในเขตพื้นที่ตำบลแม่กาและตำบลเวียงอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา โดยใช้วิธี shotgun metagenomic sequencing และตรวจการมีอยู่ของอีบีวีและเอชพีวีจากดีเอ็นเอเลือดของประชากรสุขภาพดีในจังหวัดพะเยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์และเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ ซึ่งผลการทดลองตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้ออีบีวีจากทั้งตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากห้วยนาปอย น้ำประปาจากตำบลแม่กา น้ำธรรมชาติจากกว๊านพะเยาและน้ำประปาจากตำบลเวียง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ในการตรวจหาความชุกของเชื้ออีบีวีและเอชพีวีในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครจำนวน 813 ราย อายุ 3–90 ปี พบดีเอ็นเอของเชื้ออีบีวีจำนวน 59 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.26 โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์และตรวจพบไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวี ดังนั้นการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า พบอีบีวีดีเอ็นเอในแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำประปาในเขตอำเภอเมืองจังหวัดพะเยาและอีบีวีดีเอ็นเอในตัวอย่างเลือด

Title: SCREENING FOR HPV AND EBV FROM NATURAL WATER SOURCES AND TAP WATER, PHAYAO PROVINCE TO STUDY THE PREVALENCE OF HPV AND EBV INFECTION IN THE BLOOD.

Author: Sutida Pongpakdeesakul, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2022

Advisor: Assistant Professor Supaporn Passorn Co-advisor Dr.RAWISARA RUENWAI

Keywords: Epstein-Barr virus (EBV) human papilloma virus (HPV), Human blood natural water tap water.

ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) or human herpesvirus 4 (HHV4) is a virus that spreads all over the world causes of infectious mononucleosis. Human papillomavirus (HPV) can cause cervical cancer and genital warts. Both infections can cause of oral cancer. Viruses will be transmitted through secretion and sexual transmission. This virus might infections in human blood and risk of blood donation. However, the question is can virus might be transmitted through water. EBV DNA has never been reported in water sources. Therefore, this study aimed to investigate the presence of EBV and HPV in water and human blood sample in healthy populations in Muang District, Phayao Province using shotgun metagenomic sequencing, Polymerase Chain Reaction (PCR) and also Realtime PCR. Viral EBV DNA were found from human blood sample, natural water of Huay Na Poi, natural water of Kwan Phayao, tap water of Mae Ka, and tap water of Amphoe Mueang Phayao which is the same species in human blood sample. The prevalence of EBV DNA was detected in the blood 59 of 813 volunteers (7.26%) age 3-90 years by using PCR and real time PCR methods. HPV was not found in this study. Therefore, this experiment can conclude that EBV DNA was found in natural water and tap water in Muang District, Phayao Province. EBV DNA in the blood sample

กิตติกรรมประกาศ

วิทยาพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย อาจารย์ผู้เป็นกรรมการสอบ อาจารย์ผู้สอนและผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน

ขอบคุณอาจารย์ ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.สุรีวัลย์ บำรุงไทย ที่ให้ความกรุณาวางแผนงาน ควบคุม กำกับดูแลงานวิจัยให้สมบูณ์ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร และ ดร.วริศรา รื่นไวย์ ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบและให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ธาลัสซีเมีย ศูนย์การแพทย์มหาลัยพะเยา คณะวิทยาศาสตรการแพทย์ สาขาจุลชีววิทยา และคณะเกษตรและทรัพยากรณ์ธรรมชาติ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อำนวยความสะดวกและคอยแนะนำให้คำปรึกษาต่าง ๆ การใช้เครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์คณะเกษตรและทรัพยกรธรรมชาติ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ค่อยให้คำปรึกษา รวมถึงนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ส่วนเกี่ยวข้องให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์

เหนือสิ่งอื่นใด ขอขอบคุณ คุณพ่อและคุณแม่ คนในครอบครัวรวมถึงกัลยาณมิตรทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

คุณค่าอันพึงมาจากงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แด่ผู้มีพระคุณทุกท่านและหวังว่าจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้สนใจสืบไป จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

สุธิดา พงษ์ภักดีสกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูปภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ 3

สมมติฐานของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

เอ็บสไตบาร์ไวรัสหรืออีบีวี (*Epstein–Barr virus*, EBV) 4

โครงสร้างของอีบีวี 4

จีโนมของอีบีวี 5

กลไกลการติดเชื้ออีบีวี 5

การแพร่กระจายของเชื้ออีบีวี 7

การวินิจฉัยการติดเชื้ออีบีวี 7

การตรวจหาเชื้ออีบีวีทางหองปฏิบัติการ 7

เชื้ออีบีวีที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็ง 8

ความชุกของอีบีวี....8
ฮิวแมนแพพพิลโลมาไวรัสหรือไวรัสเอชพีวี (*Human papillomavirus*, HPV)....9
โครงสร้างเอชพีวี....9
กลไกลการติดเชื้อเอชพีวี....12
การแพร่กระจายของเชื้อ....13
การตรวจหาเชื้อเอชพีวี....13
เอชพีวีที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งอื่นๆ....14
ไวรัสในน้ำ (Virus in water)....16
การปนเปื้อนของไวรัสน้ำ....16
การอยู่รอดของไวรัสในน้ำ....16
น้ำที่ปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลมีไวรัส....17
เมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)....21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย....26
วัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้ว....26
เครื่องมือ....26
อุปกรณ์....27
สารเคมี....27
ออกแบบการทดลอง....28
วิธีการทดลอง....29
กลุ่มเป้าหมาย....29
การคำนวณขนาดตัวอย่าง....29
จริยธรรมในการเก็บตัวอย่าง....30
แบบสอบถาม....30
วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 813 ราย....30

ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างเลือด 31
ขั้นตอนการทำ run gel electrophoresis 32
วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำธรรมชาติ 33
วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำประปา 34
ขั้นตอนการกรองน้ำ 34
ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างน้ำ 34
ขั้นตอนการทำ Metagenomic 35
ขั้นตอนทำ Polymerase chain reaction (PCR) 36
วิธีการทำ Real time PCR 39
บทที่ 4 ผลการทดลอง 41
ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ 41
ผลการทำพีซีอาร์ของการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด 44
การทำพีซีอาร์ของ *Human Papillomavirus* (HPV) $GP5^{+}$ Forward และ $GP6^{+}$ Reverse 45
การทำ PCR ของ Epstein–Barr virus (EBV) *EBNA2* gene 46
Real time polymerase chain reaction 50
บทที่ 5 บทสรุป 62
อธิบายการทดลอง 62
สรุปผลการทดลอง 63
ข้อเสนอแนะ 63
บรรณานุกรม 64
ภาคผนวก 68
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี 69
ภาคผนวก ข เครื่องมือและอุปกรณ์ 73
ภาคผนวก ค แบบสอบถาม 88

ประวัติผู้วิจัย 94

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 Sequence primer 29

ตาราง 2 การเตรียมสารในการทำ PCR Master Mix โดยใช้ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia และใช้ gene human beta globin, Primer PCO_4 /GH_2O 268 bp.....36

ตาราง 3 การตั้งค่าโปรแกรมทำงาน PCR human bata globin gene ขนาด 268 bp.....36

ตาราง 4 การเตรียมสารในการทำ PCR HPV DNA โดยใช้ PCR Master Mix ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia และใช้ primer $GP5^+$/$GP6^+$ ขนาด 154 bp.....37

ตาราง 5 การตั้งค่าโปรแกรมทำงาน PCR HPV DNA โดยใช้ primer $GP5^+$/$GP6^+$ ขนาด 154 bp.....37

ตาราง 6 การเตรียมสารในการทำ PCR EBV (EBNA 2 gene) โดยใช้ PCR Master Mix ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia ขนาด 219 bp 38

ตาราง 7 การตั้งค่าโปรแกรมทำงาน PCR EBNA 2 ขนาด 219 bp.....38

ตาราง 8 การเตรียมสารในการทำ Real time PCR EBV EBNA1 gene DNA โดยใช้ ยี่ห้อ (Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia และใช้ PQ_3 และ PQ_4 primer.....39

ตาราง 9 การตั้งค่าอุณหภูมิของ Real time PCRหลังจากเครื่องทำงานเสร็จ โปรแกรมจะแสดงกราฟและค่า melting curve.....39

ตาราง 10 การเตรียมสารในการทำ Real time PCR EBV DNA (EBNA2 gene) โดยใช้.....40

ตาราง 11 การตั้งค่าอุณหภูมิของ Real time PCRหลังจากเครื่องทำงานเสร็จ โปรแกรม 40

ตาราง 12 ผลตรวจวิเคราะห์คุณภาพ turbidity, color, pH, และ trace elements ของน้ำประปา 42

ตาราง 13 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลการทำ PCR EBNA2 ขนาด 219 bp.....47

ตาราง 14 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด.....49

ตาราง 15 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Real time PCR EBNA1 ขนาด 213 bp.....52

ตาราง 16 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด.....54

ตาราง 17 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Real time PCR EBNA2 ขนาด 219 bp 55

ตาราง 18 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด.....57

ตาราง 19 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ PCR EBNA2 EBNA1 Real time PCR, และ EBNA2 Real time PCR 58

ตาราง 20 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด 60

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพ 1 จีโนมของอีบีวี 4

ภาพ 2 กลไกลการติดเชื้ออีบีวี 6

ภาพ 3 โครงสร้างไวรัสเอชพีวี 10

ภาพ 4 โครงสร้างจีโนมของไวรัสฮิวแมนแพพพิลโลมา 11

ภาพ 5 หน้าที่และการทำงานของยีน 12

ภาพ 6 น้ำที่ปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลมีไวรัส 18

ภาพ 7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Metagenomic 21

ภาพ 8 Base position 16srNA gene 22

ภาพ 9 Shotgun Metagenomics 23

ภาพ 10 แผนผังการทดลอง 28

ภาพ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ Metagenomics ของ Herpesvirales ใน human blood และตัวอย่างน้ำทั้งหมดแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ (%): (HB) ตัวอย่างเลือด, (KNW) น้ำกว๊านพะเยา, (PTW) น้ำประปาพะเยา, ... 43

ภาพ 12 การ run gel electrophoresis PCR GH_2O Forward primer และ PCO_4 Reverse primer ขนาด PCR product 268 bp ตัวอย่างเลือด (ดีเอ็นเอ 3 µl) 44

ภาพ 13 ผลการ run Gel electrophoresis PCR Primer $GP5^+/GP6^+$ ขนาด PCR Product 154 bp (DNA 3 µl) ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ E1–22 45

ภาพ 14 ผลการ run Gel electrophoresis PCR primer EBNA 2 ขนาด PCR product 219 bp (DNA 3 µl) ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ G168–189 46

ภาพ 15 กราฟแสดงค่า amplification และพิจารณาค่า Ct ของ Positive = 23.58 และค่า ของ Negative = 19.85 50

ภาพ 16 กราฟแสดงค่า Melt Curve และพิจารณาค่า (Tm) ของ Positive = 82.50 และ Melt Curve (Tm) ของ Negative = None หรือ 75.50 50

ภาพ 17 กราฟแสดงค่า Melt Curve และพิจารณาค่า (Tm) ของ sample มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 82.50..... 51

ภาพ 18 แผนที่แสดงการพบเชื้อ EBV ตำบลในเขตอำเภอเมืองในจังหวัดพะเยา..... 61

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอ็บสไตบาร์ไวรัสหรืออีบีวี (*Epstein–Barr virus*, EBV) หรือเฮอร์ปีไวรัสไทป์ 4 หรือเอชเอชวี 4 (human herpesvirus 4, HHV 4) เป็นไวรัสที่พบมากทั่วโลก ก่อให้เกิดโรคโมโนนิวคลิโอซิส (Infectious mononucleosis, kissing disease) โรคมะเร็ง และโรคอื่นๆ อีบีวีติดเชื้อในเซลล์เยื่อบุบริเวณปาก ช่องคอและช่องจมูก แพปพิลโลมาไวรัสหรือเอชพีวี (*Human papillomavirus*, HPV) ก่อให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกและหูดหงอนไก่ โดยส่วนใหญ่เอชพีวีมีการติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางการมีเพศสัมพันธ์ ซึ่งปัจจุบันมีวัคซีนป้องกันจึงคลายความกังวลถึงการก่อโรคมะเร็งปากมดลูก แต่อีบีวีที่ติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางน้ำลายและสารคัดหลั่งในปัจจุบันไม่มีวัคซีนป้องกัน แม้ไวรัสกลุ่มนี้จะไม่ก่อโรคในทุกรายที่ติดเชื้อแต่มีรายงานว่าอีบีวี มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งคอหอยส่วนปาก จึงมีข้อสงสัยในการแพร่ระบาดของอีบีวีนั้นติดต่อมาจากแหล่งใด เหตุใดจึงมีการระบาดเป็น วงกว้างทุกช่วงอายุ นอกจากนี้โดยระยะหลังมีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอของ อีบีวี และเอชพีวี ในกระแสเลือดของคนต่างประเทศ และอาจส่งผลต่อการแพร่กระจายของไวรัส ซึ่งการบริจาคโลหิตในปัจจุบันยังไม่มีการตระหนักเรื่องนี้ในประเทศไทย นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการพัฒนามากขึ้นในการตรวจหาเชื้อโรคต่างๆ ในอดีตที่ไม่ทราบสาเหตุ พบว่าปัจจุบันอาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ เช่น โรคทางสมอง หรือ โรครูมาตอยด์ เป็นต้น นอกจากนี้ในเด็กเล็กพบการติดอีบีวีจากการสัมผัสใกล้ชิดผ่านสารคัดหลั่งในช่องปาก สิ่งของที่ใช้ร่วมกัน เช่น ของเล่น และของใช้ (Gupta I, 2022) ซึ่งจากรายงานวิจัยพบยีน *EBNA1* ดีเอ็นเอร้อยละ 72.5 จากตัวอย่างเลือดทั้งหมดของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก (NPC) ในประเทศอินโดนิเซียโดยใช้เทคนิคคิวพีซีอาร์ (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) และรายงานจากประเทศกาต้าร์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ในการตรวจหาอีบีวีพบตัวอย่างจำนวน 385 ราย คิดเป็นร้อยละ 40.4 (Yoshii, 2012) และการตรวจหาเอชพีวีจากตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิตชาวชิลีที่มีสุขภาพดีจำนวน 207 ราย โดยเรียลไทม์พีซีอาร์ของยีน L1 พบเอชพีวีดีเอ็นเอจำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.8 โดยยังไม่มีผู้ใดรายงายว่าการติด

เชื้ออีบีวีและไวรัสอื่นๆ อาจมีน้ำเป็นตัวกลางในการแพร่กระจาย เช่น แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือน้ำบาดาล ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีข้อมูลที่พบว่าน้ำประปาของประชากรในเขตประเทศไทยหลายแหล่งในเขตนอกเมืองที่ใช้อุปโภค บริโภค มีความขุ่นและมีกลิ่นไม่พึงประสงค์โดยเฉพาะน้ำประปาหมู่บ้าน คุณภาพน้ำประปาในปัจจุบันที่ไม่มีการตระหนักถึงการมีปนเปื้อนของเชื้อไวรัส มีเพียงอาร์เอ็นเอไวรัสบางชนิดที่มีข้อกำหนดและมีการตรวจเฉพาะเขตเมืองหลวงเท่านั้น (Germini, 2020) โดยประชาชนบริเวณนอกเมืองและชนบทมีความเสี่ยงในการเกิดโรคติดเชื้อและโรคอื่นๆ มากกว่าคนที่อาศัยอยู่ในเมือง โดยคาดว่าเกิดจากหลายสาเหตุและแหล่งน้ำอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุของการติดเชื้อ แหล่งน้ำเป็นปัจจัยหลักของการแพร่กระจายไวรัสจากสิ่งแวดล้อมสู่คน เช่น การใช้น้ำอุปโภค บริโภค การเกษตร หรือชลประทาน เป็นต้น รวมถึงการใช้น้ำในกิจกรรมต่างๆ นอกจากนั้นแหล่งที่มาของไวรัสที่เป็นไปได้มากที่สุดคือการรั่วไหลของสิ่งปฏิกูลที่ไม่ผ่านการบำบัดจากท่อระบายน้ำสุขาภิบาล วิธีการทั่วไปในการตรวจหาไวรัสในน้ำเช่น เรียลไทม์พีซีอาร์ และ พีซีอาร์ โดยน้ำที่ใช้อุปโภคและบริโภคในเขตอำเภอเมืองจังหวัดพะเยา พบว่าประชากร ตำบลแม่กาใช้น้ำประปาที่ผ่านการบำบัดโดยประปาหมู่บ้านจากลำธารห้วยนาปอย หากสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่ามีความขุ่น และมีกลิ่นเหม็นเล็กน้อยเป็นประจำ น้ำจากตำบลเวียงใช้น้ำประปาที่ผ่านการบำบัดโดยประปาภูมิภาคจากกว๊านพะเยา หากสังเกตด้วยตาเปล่ามีความใสสะอาดไม่มีกลิ่น นอกจากนี้น้ำจากกว๊านพะเยาอยู่กลางอำเภอเมืองพะเยามีการใช้น้ำทำการเกษตรทำให้มีการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจากชุมชน ปศุสัตว์ และโรงพยาบาล ดังนั้นวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำประปาและศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือด โดยการตรวจไวรัสจากตัวอย่างเลือดของผู้อาสาสมัครของประชากรจากอำเภอเมืองพะเยา ทำการเก็บน้ำประปา (ตำบลแม่กาและเวียง) และน้ำธรรมชาติ (ลำธารห้วยนาปอยและกว๊านพะเยา) ด้วยวิธีพีซีอาร์ เรียลไทม์พีซีอาร์ เมตาจีโนมิกส์ และประเมินคุณภาพของน้ำประปาและปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสอีบีวีและเอชพีวี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้ออีบีวีและเอชพีวีในแหล่งน้ำ ตำบลแม่กา และตำบลเวียง อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา

2. เพื่อศึกษาดีเอ็นเอของเชื้อของการติดเชื้ออีบีวีและเอชพีวีในกระแสเลือดของคนใน อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา

สมมติฐานของการวิจัย

น้ำในแต่ละพื้นที่ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสอีบีวีและเอชพีวี ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พบในตัวอย่างเลือดจากประชากรจังหวัดพะเยา

ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บน้ำจากกว๊านพะเยา ห้วยนาปอยและน้ำประปานำมาตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อบีวี เอชพีวี และตรวจคุณภาพน้ำของพื้นที่ตำบลแม่กาและตำบลเวียงอำเภอเมืองพะเยาจังหวัดพะเยา

2. เก็บตัวอย่างเลือดอาสามัครจำนวน 813 คน อายุ 3-90 ปี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ทราบถึงคุณภาพน้ำแต่ละพื้นที่ในอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา
2. ได้ทราบความชุกของเชื้ออีบีวีและเอชพีวี ที่ในตัวอย่างเลือด
3. ทราบการมีอยู่ของอีเอ็นเอของเชื้ออีบีวีและเอชพีวี

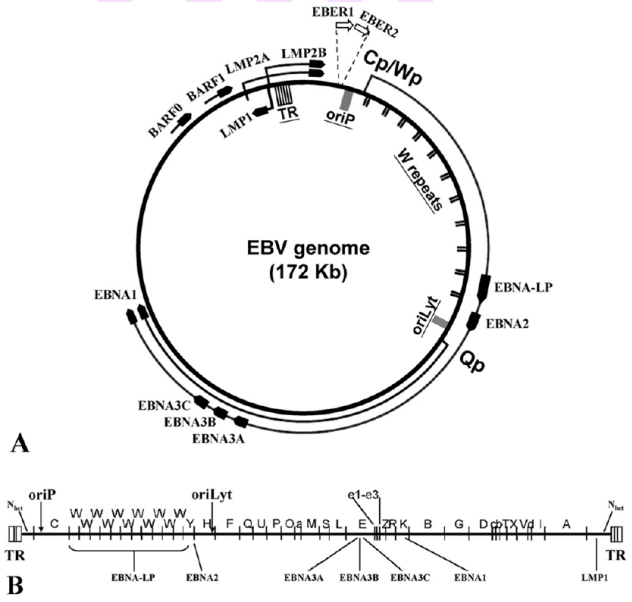
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอ็บสไตบาร์ไวรัสหรืออีบีวี (*Epstein–Barr virus*, EBV)

โครงสร้างของอีบีวี

เอ็บสไตบาร์ไวรัส (อีบีวี) หรือฮิวเมินเฮอร์ปีไวรัสไทป์ 4 (เอชเอชวี 4) (EBV) หรือ *human herpes virus 4* (HHV4) อยู่ใน subfamily *Gamma Herpesviruses* เป็นหนึ่งในไวรัสที่พบมากที่สุดของมนุษย์ พบเชื้ออีบีวีทั่วทุกมุมโลก การติดเชื้ออีบีวีโดยทั่วไปทางการแพร่กระจายผ่านของเหลวในร่างกายส่วนใหญ่เป็นน้ำลาย เชื้ออีบีวีสามารถก่อให้เกิดการติดโรคโมโนนิวคลีโอซิส และโรคอื่นๆ ได้ ไวรัสชนิดนี้ ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 สาย (linear double stranded DNA) ที่พันรอบโปรตีนและหุ้มด้วยกลุ่ม nucleocapsid protein envelope มี glycoprotein จับกับ complement C3d receptor จำนวนมากบนผนังของเซลล์เจ้าบ้าน ไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 180–200 นาโนเมตร (ภาพ 1) (Gupta I, 2022) ดังนี้



ภาพ 1 จีโนมของอีบีวี

ที่มา: (Gupta I, 2022)

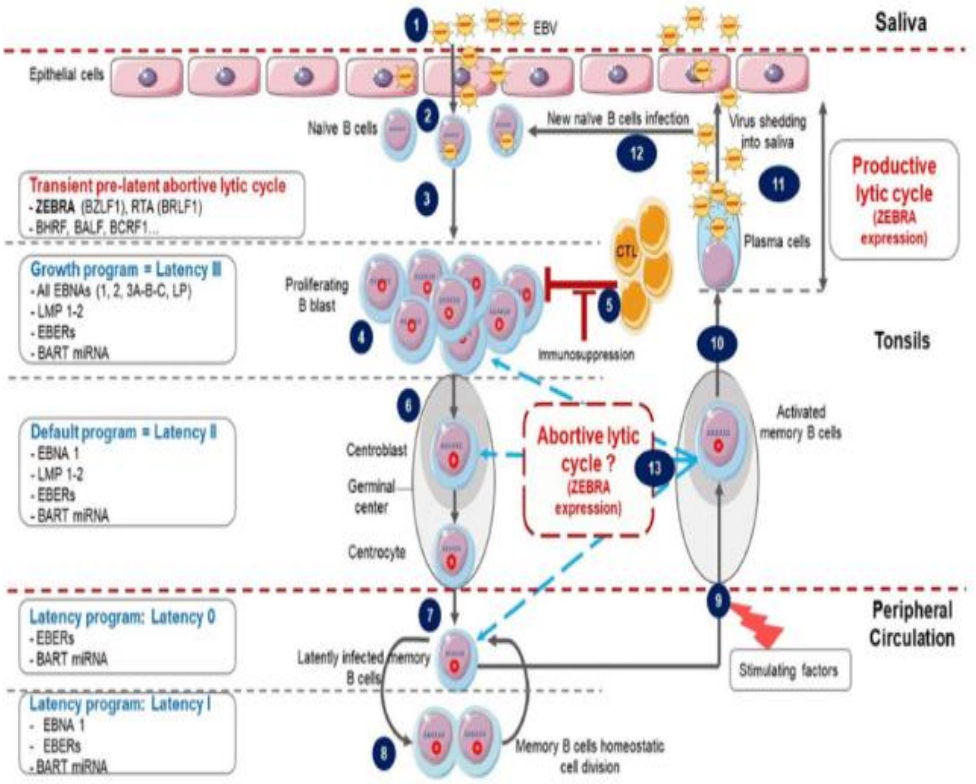
จีโนมของอีบีวี

จีโนมของอีบีวีประกอบไปด้วยสารพันธุกรรมที่อยู่ในรูปเกลียวคู่ยาวประมาณ 172 กิโลเบส อีบีวีมีลำดับโดเมนที่มีความสั้นความยาวที่ไม่ซ้ำกัน ยีนที่สามารถสร้างโปรตีนได้มากกว่า 100 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ อีบีวี 1 และ อีบีวี 2 ซึ่งจะขึ้นอยู่กับแอลลีนที่ *EBNA2* และ *EBNA3A 3B* และ *3C* ที่แตกต่างกันระหว่าง อีบีวี 1 และ อีบีวี 2 อีบีวี 1 ทำให้เกิดการขยายตัวของการติดเชื้อเซลล์ในระบบเลือดและน้ำเหลือง การกระตุ้นการติดเชื้อจะทำให้เจริญเติบโตและสามารถแปลงเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มลิมโฟไซต์เข้าสู่เซลล์ลิมโฟบลาสตอยด์ (lymphoblastoid cell, LCL) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่การติดเชื้ออีบีวี ทำให้จะมีการตอบสนองของ บีเซลล์ และ ทีเซลล์ มากกว่าและยังมีความรุนแรงในการก่อโรคมากกว่าอีบีวี 2 ซึ่งบีเซลล์จะทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีต่อจีโนมไวรัส โดยกำจัดและกระตุ้นอีบีวีที่ติดเชื้อเข้าสู่ บีบลาส จะทำลายอีบีวีในเซลล์ (Yoshii, 2012)

กลไกลการติดเชื้ออีบีวี

กลไกลการติดเชื้อ EBV 1. การติดเชื้อจะเกิดขึ้นหลังจากการสัมผัสกับน้ำลายที่มีเชื้ออีบีวี 2. หลังจากการติดเชื้อครั้งแรกที่บริเวณเซลล์เยื่อบุผิว oropharyngeal ไวรัสจะผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านล่างและแพร่เชื้อไปยัง naive B cells 3. จากนั้น naive B cells จะกระตุ้น lytic cycle และจะแอบแฝงและมีการแสดงออกชั่วคราวของยีน ZEBRA และ lytic genes อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ และหลีกเลี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกัน 4. Infected naive B cells ที่ติดเชื้อจะแพร่กระจาย B blasts proliferating ผ่าน growth program (latency III) ซึ่งโปรตีนจะแสดงออกทั้งหมด 5. มีกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัด B cells ที่ติดเชื้อไวรัส 6. ในการแพร่กระจายของ B blasts migrate ที่แพร่กระจายไปยัง Germinal center (GC) และ activate default transcription program (latency II) โดยการแสดงออกของโปรตีนเพียง *EBNA1, LMP1 and LMP2* ซึ่งมีความแตกต่าง Centro blasts และ centrocytes 7. หลังจากนั้น Centrocytes ออกจาก GC และ differentiate และแยกความจาก Latency infected memory B cells (Latency) ไปเป็นmemory B cells hemostatic cell division (latency) ทั้งหมด (latency 0) 8. ในบางครั้ง circulating EBV–positive memory B cells จะแสดง *EBNA1* ระหว่างแบ่งเซลล์แบบ homeostatic เพื่อให้แน่ใจว่ามีการจำลองและจีโนมของไวรัสออกเป็น daughter cells 9. หลังจากที่การกระตุ้น memory B cells ที่ติดเชื้อไวรัสสามารถเข้าสู่ GC ได้

10. Activated EBV positive และ memory B cells จะสามารถแยกความแตกต่างออกเป็น plasma cells เพื่อกระตุ้น virus และเข้า lytic cycle ส่งผลให้ 11. เชื้อไวรัสที่อยู่ในน้ำลาย 12. เกิดการติดเชื้อ naive B cells infection ใหม่ 13. memory B cells และ Activated EBV–positive memory เปิดใช้งาน memory B cells อีกครั้ง ในร่างกายจะทำการกระตุ้น EBV–positive memory B cells (ภาพ 3) ดังนี้ (Germini, 2020)



ภาพ 2 กลไกลการติดเชื้ออีบีวี

ที่มา: Diego, Germini. (2020)

อีบีวีมีความสามารถในการควบคุม Toll–like receptors (TLRs) ที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับระยะของวงจรชีวิตและระยะของการแพร่กระจายของไวรัส ในขั้นตอนทำให้เซลล์แตก (lytic) มีการตอบสนองไวรัสต่อโฮสต์อย่างมีประสิทธิภาพ ระหว่างการติดเชื้ออีบีวีจะลดการแสดงออกของ TLR7, TLR8 และ TLR9 การเพิ่มจำนวนของไวรัสในบีเซลล์ที่ติดเชื้อ lytic protein หลายชนิดถูกใช้เพื่อทำให้การส่งสัญญาณไปยัง TLR9 mRNA การทำให้บีเซลล์เสื่อมสภาพจาก

การติดเชื้อและ BGLF5 protein ส่ง TLR9 เพื่อลดการแสดงออกในเซลล์ (Jangra S, 2019) การติดเชื้ออีบีวีส่งผลให้ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นผิดปกติจนเกิดการกระตุ้นดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นโปรตีนเมมเบรนที่เข้ารหัสอีบีวี1 (อีบีวี *LMP1*) ยังช่วยเพิ่ม Methylation การถอดรหัสและแสดงออกของ DNMT1 อีบีวี *LMP1* ควบคุมการแสดงออกของ DNMT1 (Cao Y, 2021)

การแพร่กระจายของเชื้ออีบีวี

การแพร่กระจายของอีบีวีจะแพร่กระจายโดยทั่วไปผ่านของเหลวในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำลาย อีบีวียังสามารถแพร่กระจายผ่านทางเลือดและน้ำอสุจิในระหว่างการมีเพศสัมพันธ์การถ่ายเลือดและการปลูกถ่ายอวัยวะ นอกจากนั้นอีบีวีสามารถแพร่กระจายผ่านทางการแปรงสีฟันหรือแก้วน้ำที่ผู้ติดเชื้อใช้ ไวรัสอาจมีชีวิตรอดบนวัตถุที่มีความชื้นอยู่ครั้งแรกที่เกิดการติดเชื้ออีบีวีสามารถแพร่เชื้อได้หลายสัปดาห์และก่อนที่จะเกิดมีอาการเมื่อไวรัสอยู่ในร่างกายจะคงอยู่ในสถานะแฝงการแพร่กระจายอีบีวีไปยังผู้อื่นนับตั้งแต่การติดเชื้อครั้งแรก (พิไลพันธ พุธวัฒนะ, 2559)

การวินิจฉัยการติดเชื้ออีบีวี

การวินิจฉัย อีบีวีเนื่องจากอาการของการติดเชื้ออีบีวีคล้ายคลึงกับอาการของโรคอื่น ๆ อย่างไข้หวัดหรือไข้หวัดใหญ่ จึงยากที่แพทย์จะทำการวินิจฉัยการติดเชื้อนี้ได้ อย่างไรก็ตามแพทย์อาจตรวจร่างกายหาสัญญาณอาการของ โมโนนิวคลีโอซิส เช่น ม้ามหรือตับโต มีแผ่นบางหรือจุดสีขาวบนต่อมทอนซิล เป็นต้น นอกจากนี้ ยังอาจให้ผู้ป่วยเข้ารับการตรวจเลือดหรือตรวจด้วยวิธีอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น ตรวจหาสารภูมิคุ้มกันในเลือดโดยแพทย์จะตรวจหาสารภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ตรวจพบสารภูมิคุ้มกันมักกำลังติดเชื้อนี้อยู่หรือเคยติดเชื้อนี้มาก่อน ตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิดแพทย์อาจตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ร่างกายผลิตขึ้นมาเพื่อต่อสู้กับการติดเชื้อ EBV ซึ่งอาจวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสจริงหรือไม่

การตรวจหาเชื้ออีบีวีทางหองปฏิบัติการ

การตรวจทางหองปฏิบัติการที่ช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้ออีบีวีการตรวจยืนยันด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงไวรัสการตรวจวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ วิธีพีซีอาร์ อีบีวีอาร์เอ็นเอที่เข้ารหัส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส อิมมูโนฮิสโตเคมีและ viral load ในซีรัม พลาสมาหรือ PBMC เป็นต้น

เชื้ออีบีวีที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็ง

โรคมะเร็งที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ อีบีวี ประกอบด้วย Burritt lymphoma (มะเร็งในระบบน้ำเหลือง) nasopharyngeal carcinoma (มะเร็งโพรงจมูก) Hodgkin lymphoma และ non–Hodgkin lymphoma (มะเร็งต่อมน้ำเหลือง) มะเร็งเนื้อเยื่อและมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T–cell นอกจากนั้นยังพบว่ามะเร็งโพรงจมูกที่ถูกพบบ่อยในเอเชียตะวันออกโดยเฉพาะทางจีนตอนใต้รวมทั้งประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคนี้รวมทั้งประเทศไทยมากที่สุด

ความชุกของอีบีวี

การติดเชื้ออีบีวีในประชากรไนจีเรีย ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ FFPE จำนวน 152 ชิ้นที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองตั้งแต่ปี 2551 ถึง พ.ศ. 2561 จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดพบว่า ผู้ป่วย 66/162 ราย (64.7%) ที่เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองโดยมีอัตราส่วนชายต่อหญิง 2:1 และอายุเฉลี่ย 44.4 ปี มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (leprotic, CLL) พบมากที่สุด (34.8%) พบมะเร็งต่อมน้ำเหลือง B cell จำนวน 10 ราย (15.2%) เป็นบวกไวรัส EBV ซึ่งส่วนใหญ่เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ชนิด (Hodgkin, HL) CLL (Behrman EJ, 2018)

อีบีวีได้รับการวิเคราะห์โดยใช้อาร์เอ็นเอ (EBER) (ISH) และการวิเคราะห์อีบีวีดีเอ็นเอในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองการวินิจฉัยและการเฝ้าติดตามผู้ป่วยจำนวน 329 รายได้รับการตรวจโดยมีผู้ป่วยจำนวน 232 รายสำหรับการวิเคราะห์ EBER ISH ผู้ป่วยจำนวน 189 ราย สำหรับการวิเคราะห์อีบีวี ดีเอ็นเอและผู้ป่วยจำนวน 138 ราย สำหรับการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ EBER เป็นบวกในผู้ป่วยจำนวน 24 /232 ราย (10.3%) และอีบีวีดีเอ็นเอเป็นบวกในผู้ป่วยจำนวน 18/189 ราย (9.5%) การวิเคราะห์ทั้งสองมีความสอดคล้องกัน 92.8% แสดงให้เห็นว่าการรักษาด้วย EBER มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าผู้ที่ไม่มี EBER positivity (0.03) อีบีวีดีเอ็นเอ ($p < 0.01$) เมื่อรวม EBER และอีบีวีดีเอ็นเอ ($p < 0.01$) ในการวิเคราะห์หลายตัวแปร (Dolan A, 2006)

เชื้ออีบีวีจะเริ่มมีการติดเชื้อที่อายุน้อยพบว่าเด็กไทยติดเชื้ออีบีวีตั้งแต่อายุน้อยซึ่งโดยมากไม่แสดงอาการ จากการศึกษาความชุกของการติดเชื้ออีบีวีในประเทศไทยพบว่าเด็กไทยอายุ 0–15 ปี เคยติดเชื้ออีบีวีมาก่อนเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 68.4–72.74 และเด็กอายุตั้งแต่ 4–6 ปี เคยติดเชื้ออีบีวีมาก่อนเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 55.6–99.54 ซึ่งไม่แตกต่างจากการศึกษาในอดีต ความชุกของการติดเชื้ออีบีวีในอายุ 30 ปี ขึ้นไปร้อยละ 10–20 และเด็กกลุ่มอายุ 0–6 เดือน 6–12 เดือน 1–5 ปี 5–15 ปี และ 15 ปี ขึ้นไป คิดเป็นร้อยละ 48, 30, 83, 90

และ 93 ตามลำดับ อีบีวีสามารถติดต่อได้จากแม่สู่ลูกรวมทั้งการให้เลือดที่มีเชื้อไปสู่ผู้ไม่มีภูมิคุ้มกันอีบีวีก่อให้เกิดโรคหลายชนิด ความรุนแรงของโรคที่ไม่มีความรุนแรงและหายได้เองไปจนก่อให้เกิดโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งกระเพาะอาหารบางชนิด มะเร็งหลังโพรงจมูก คนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องอาจติดเชื้ออีบีวีเป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงถึงแก่ชีวิตได้ การติดเชื้อขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ เชื้อชาติ การรับประทานอาหารและเอสไอวี จากการรายงานในประเทศไทยอีบีวีพบมากในเด็กสามารถติดต่อได้จากการกิน ผ่านน้ำลาย ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันอีบีวีและเชื้อไวรัสชนิดนี้แพร่กระจายได้ง่าย อาจติดต่อกันได้จากผู้ที่มีเชื้ออีบีวีอยู่ในร่างกายแต่ไม่มีอาการ จึงทำให้การป้องกันเป็นไปได้ยากแต่อาจลดความเสี่ยงในการติดเชื้อได้หากปฏิบัติตามคำแนะนำดังต่อไปนี้ คือ ล้างมือให้สะอาดอยู่เสมอ หลีกเลี่ยงการดื่มน้ำหรือรับประทานอาหารโดยใช้แก้วน้ำหรือช้อนส้อมร่วมกับผู้ป่วยรวมถึงการจูบหรือมีเพศสัมพันธ์กับผู้ป่วย การใช้สิ่งของส่วนตัวอย่างแปรงสีฟันร่วมกับผู้ป่วย (Uzoma, 2016)

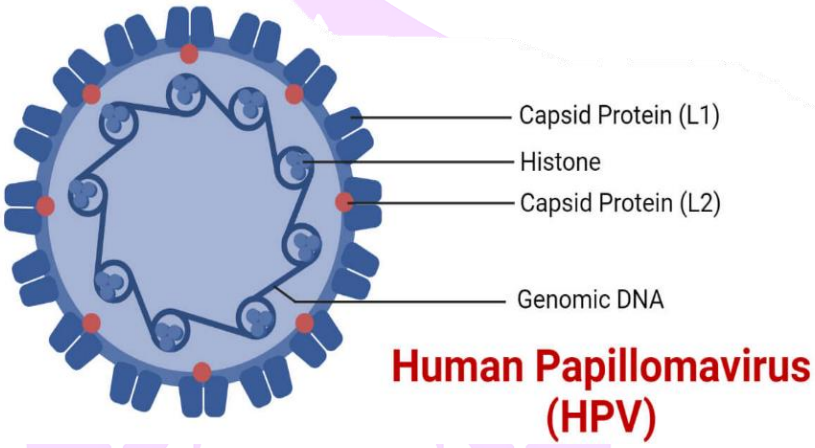
ปริมาณดีเอ็นเอของอีบีวีและ mRNA ของไวรัสที่จำเพาะต่อมะเร็งกับเอ็นติบอดี้ต้านอีบีวีอิมมูโนโกลบูลิน A (IgA) และ IgG ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งโพรงจมูกจากประเทศอินโดนีเซีย มะเร็งโพรงจมูก (NPC) เป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และมีความเกี่ยวข้องกับไวรัสอีบีวี แอนติเจนอีบีวีอิมมูโนโกลบูลิน G (IgG) และ IgA ในผู้ป่วย NPC ของประชากรอินโดนีเซีย และตรวจด้วยเทคนิคเรียวไทม์พีซีอาร์ อีบีวีขนาด 213 bp พบว่าผู้ป่วย 72.5% มีเชื้ออีบีวีดีเอ็นเอในเลือด 29% มีเชื้อจำนวน 2,000 Copy/ml ซึ่งคนที่มีสุขภาพดีพบผู้ป่วย 60.4–85.9% (P <0.0001) (Takada, 2011)

ฮิวแมนแพพพิลโลมาไวรัสหรือไวรัสเอชพีวี (*Human papillomavirus,* HPV)

โครงสร้างเอชพีวี

เชื้อเอชพีวีเป็นไวรัสชนิดหนึ่ง มีชื่อเต็มว่าฮิวแมนแพพพิลโลมาไวรัส (*Human papillomavirus)* ซึ่งปัจจุบันสามารถ ค้นพบเชื้อ เอชพีวี ว่ามีมากกว่า 170 สายพันธุ์ โดยมีการตั้งชื่อสายพันธุ์ตามลำดับของการค้นพบ เช่น เอชพีวี 6, เอชพีวี 11, เอชพีวี 16 เป็นต้น เชื้อเอชพีวี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือเชื้อเอชพีวี กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคหูดต่าง ๆ ได้แก่เอชพีวี 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 ,10, 11 ทำให้เป็น หูดที่มือ หูดที่เท้า หูดหงอนไก่ เชื้อกลุ่มนี้ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกต่ำ (Low risk HPV) เชื้อเอชพีวีกลุ่มที่ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกสูง (High risk HPV) ได้แก่เอชพีวี 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56 เอชพีวีมีขนาดเล็กมีเอนโวลโลป (envelope) และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 52–55 นาโนเมตร มีรูปร่างสมมาตรแบบ

icosahedral ประกอบด้วย double-stranded ดีเอ็นเอที่ล้อมรอบด้วย capsid protein ที่ประกอบด้วย 72 pentamer capsid ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 2 ชนิด ซึ่งรวมถึงโปรตีนจากไวรัส L1 (Late 1) และ L2 (Late 2) L1 มีขนาด 55kDa และคิดเป็น 80% ของโปรตีนจากไวรัส L2 มีขนาด 70 kDa (Loonibha,2022) ดังภาพที่ 4

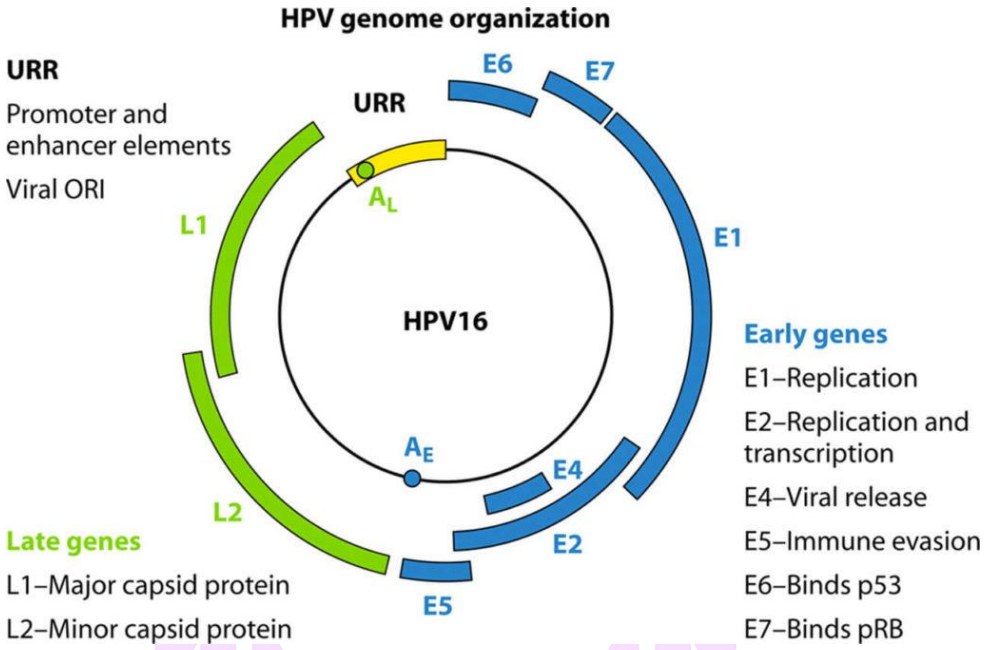


ภาพ 3 โครงสร้างไวรัสเอชพีวี

ที่มา: Loonibha Shrestha (2022)

จีโนมของไวรัสเอชพีวีเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ที่ลักษณะเป็นวงกลมขนาดประมาณ 7,900 คู่เบส (base pairs, bp) หรือประมาณ 8 กิโลเบส (kb) ทำหน้าที่เป็นจีโนม หรือถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม จีโนมของเอชพีวีมี Open reading frame (ORF) หรือสายดีเอ็นเอที่มีการถอดรหัสเป็น mRNA แล้วแปลรหัสเป็นโปรตีนจำนวน 8–10 ORF ขึ้นกับ type ของเอชพีวี โดย mRNA จะถูก decoded จาก single strand ของ DNA โครงสร้างของจีโนมประกอบด้วย Long control region (LCR) มีประมาณร้อยละ 10 ของจีโนม ภายใน LCR ประกอบด้วย origin of replication (ori) หรือจุดเริ่มต้นการถ่ายแบบดีเอ็น (DNA replication) และตำแหน่งที่จับของโปรตีนที่ควบคุมการถอดรหัส LCR เป็นส่วนที่ไม่มีรหัสการสร้างโปรตีน Early (E) gene region มีขนาดประมาณร้อยละ 50 ของจีโนม ทำหน้าที่เข้ารหัส (encode) โปรตีนที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส ได้แก่ โปรตีน E1 โปรตีน E2 โปรตีน E4 โปรตีน E5 โปรตีน E6 และโปรตีน E7 โดยอาจพบโปรตีน E3 และ โปรตีน E8 ใน เอชพีวีบางไทป์ Late (L) บริเวณยีนมีขนาดประมาณร้อยละ 40 ของจีโนม ท้าหน้าที่ เข้ารหัสสำหรับสร้างโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหรือ แคปซิด ได้แก่ โปรตีน L1 และโปรตีน L2 (Margaret, 2012) ดังภาพที่ 5 และ ภาพที่ 6

โครงสร้างจีโนมของ HPV



ภาพ 4 โครงสร้างจีโนมของไวรัสฮิวแมนแพพพิลโลมา

ที่มา: Margaret A. Stanley (2012)

จีโนมของเอชพีวีทุกประเภทมี ORF 8 ตัวที่ คัดลอกมาเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอเกลียวคู่เพียงตัวเดียวซึ่งมีขนาดจีโนมประมาณ 800 bp ORF สามารถแบ่งออกเป็นบริเวณที่ใช้งานได้ 3 ส่วน ซึ่งสำหรับโปรตีนโครงสร้าง (L2–L2) ที่สำคัญสำหรับการประกอบไวรัส และ LCR มีองค์ประกอบแคปซิดที่จำเป็นสำหรับการจำลองแบบและการถอดรหัสดีเอ็นเอของไวรัสแม้ว่าแปปิโลมาไวรัส มีขนาดและจำนวนของ ORF ต่างกัน แต่พบยีนหลักที่เกี่ยวข้องกับ replication (*E1* และ *E2*) ยีน (*L1* และ *L2*) ที่มีความหลากหลายสูง ส่วน (*E6, E7 , E5* และ *E4*) จะช่วยในการเข้าเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันของไวรัส ดังภาพ 6 (Takada, 2011)

Viral Protein Functions and Features

E1	It forms a heterodimer complex with E2 and controls viral replication
E2	It regulates early gene promoter and together with E1 viral DNA replication
E4	It may mediate the viral particle realease by destabilizing cytokeratin network
E5	It stimulates mitogenic signals of growth factors
E6	It inactivates many cellular proteins and is one of the major viral oncoproteins
E7	It inactivates many cellular proteins and is one of the major viral oncoproteins
L1	It is the major capsid protein and is the component of the HPV prophylactic vaccine
L2	It is the minor capsid protein

ภาพ 5 หน้าที่และการทำงานของยีน

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Nagayasu, Egawa (2015) (Takada, 2011)

กลไกลการติดเชื้อเอชพีวี

เอชพีวีก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งชนิดอื่นๆ สามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง squamous cell และใช้ capsid protein เอชพีวี L1 จับกับตัวรับเซลล์ เช่น proteoglycan heparin sulfate (HSPGs) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในหรือพื้นผิวของเซลล์เอชพีวีเข้าสู่เซลล์ผ่านเอนโดไซโทซิส ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดกับ micropinocytosis โดยผ่านทางไซโตพลาสซึมที่จับกับเมมเบรน (Membrane–bound cytoplasm) และ ทรานกอลจิคอมเพล็กซ์ (trans Golgi apparatus) จีโนมอีพิโซมของไวรัสจะถูกส่งไปยังนิวเคลียสผ่านรูพรุนของนิวเคลียสหรือเมื่อการสลายตัวของเยื่อหุ้มนิวเคียสระหว่างไมโทซิสขั้นตอนการจำลองแบบ (Hjalgrim, 2017)

ชุดไพรเมอที่ใช้ตรวจหาเอชพีวี*L1* คือ *PGMY11/09PGMY* ถูกใช้รอบที่1 เพื่อแอมพิฟาย (ampify) 464 bp จากนั้นใช้ไพรเมอร์ *GP5+ GP6+* รวมกันในรอบ 2 ที่ 154 bp (Vergara N, 2019)(Lin CL, 2021)

การแพร่กระจายของเชื้อ

โรคติดเชื้อเอชพีวีมักติดต่อผ่านการมีเพศสัมพันธ์ไม่ว่าจะเป็นเพศสัมพันธ์ทางช่องคลอด ทวารหนัก ปาก หรือการใช้อุปกรณ์เพื่อสนองความต้องการทางเพศร่วมกัน และสามารถแพร่ผ่านรอยแผลหรือรอยขีดข่วนตามผิวหนัง หากมีการสัมผัสผิวหนังหรือสิ่งของที่ปนเปื้อนเชื้อจากผู้ป่วย แม้กระทั่งในช่วงที่ผู้ติดเชื้อยังไม่แสดงอาการ ส่วนหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้ออาจแพร่เชื้อสู่บุตรระหว่างการคลอดได้ แต่เกิดขึ้นได้ค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ปัจจัยบางอย่างอาจส่งผลให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อเอชพีวียิ่งขึ้น ได้แก่ เด็กและวัยรุ่น โดยหูดทั่วไปมักพบได้มากในวัยเด็ก ส่วนหูดหงอนไก่มักพบในเด็กวัยเจริญพันธุ์มากกว่าคนช่วงอายุอื่น หญิงและชายที่เปลี่ยนคู่นอนบ่อย มีแผลหรือรอยขีดข่วนตามผิวหนัง มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น ผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV) ผู้ป่วยที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ที่เพิ่งเข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นต้น สัมผัสหูดหรือสิ่งของที่ปนเปื้อนเชื้อโดยไม่สวมถุงมือเพื่อป้องกัน อยู่ในสถานที่ที่มีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย เช่น ห้องอาบน้ำสาธารณะ สระว่ายน้ำ เป็นต้น

การตรวจหาเชื้อเอชพีวี

เป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสเอชพีวีกลุ่มเสี่ยงที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกโดยระบุสายพันธุ์ชนิด 16 และ 18 ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดมะเร็งปากมดลูก วิธีการตรวจเหมือนการตรวจมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากการตรวจ แพปสเมียร์ (pap smear) มีข้อจำกัดหลายอย่าง ตั้งแต่การเก็บสิ่งส่งตรวจ การอ่าน สเมียร์การแปลผล เป็นต้น ความไวในการตรวจ หาเซลล์ที่ผิดปกติ ที่สามารถระบุเป็นมะเร็งปากมกลูกคือ 50–70%ผลที่ได้จากกตรวจโดยวิธีนี้เพียงอย่างเดียวทำให้มีโอกาสพลาดในการวินิจฉัย ปัจจุบันการตรวจเชื้อไวรัสเอชพีวี ใช้วิธีพีซีอาร์ (polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจทางด้านชีวโมเลกุลที่มีความไวในการตรวจสูงถึง 95–100% และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเอชพีวี ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อเมื่อเทียบกับการตรวจโดยวิธีดั้งเดิม วิธีการตรวจมะเร็งปากมดลูกแบบวิธีการตรวจตินแพร็พแป๊บ (Thin prep) แพทย์จะเก็บเซลล์จากบริเวณปากมดลูกด้วยอุปกรณ์เฉพาะ จากนั้นจะใส่ลงในขวดน้ำยาตินแพร็พแป๊บนำส่งแลป ย้อมสีและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งแตกต่างจากแปบเสมียร์ธรรมดา ที่เก็บเซลล์ด้วยไม้พาย และป้ายลงบนกระจกแก้ว เพื่อย้อมสีและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอชพีวีที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งอื่นๆ

นอกจากนี้เอชพีวียังสัมพันธ์กับมะเร็งต้นกำเนิด มะเร็งช่องปาก หูดที่อวัยวะเพศ และโรคผิวหนังอื่นๆ เอชพีวีติดเชื้อในเซลล์เยื่อบุผิว มีรายงานการมีอยู่ของเอชพีวีดีเอ็นเอในเซลล์โมโนนิวเคลียร์ในเลือด(PBMC) ในผู้ป่วยบางรายที่เป็นมะเร็งศีรษะและลำคอ มะเร็งปากมดลูกและโรคเกี่ยวกับอวัยวะเพศอื่นๆ พบเอชพีวีดีเอ็นเอในเลือดในอาสาสมัครที่ไม่มีอาการใน PBMC จากผู้บริจาคโลหิตที่ไม่มีอาการจากผู้บริจาคโลหิตชาวชิลีที่มีสุขภาพดี 207 ราย โดยการสอบวิเคราะห์ real time polymerase chain reaction assays primers GP5+/6+ ตรวจพบเอชพีวีดีเอ็นเอ ใน 6.8% (14/207) ของผู้บริจาคโลหิต ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอ ของเอชพีวีมีอยู่ใน PBMC จากผู้บริจาคเลือดที่มีสุขภาพดี และแสดงให้เห็นว่าเลือดอาจเป็นช่องทางใหม่ในการแพร่กระจายของเอชพีวี (Malki, 2020)

เอชพีวี 16/18 ในเลือดอาจเป็นความเสี่ยงของมะเร็งปอดในไต้หวันมะเร็งปอดเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งในไต้หวันและตัวบ่งชี้ความเสี่ยงของ การมะเร็งปอดในระยะเริ่มต้น ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ เอชพีวี16/18 มะเร็งปอดในสตรีชาวไต้หวันที่ไม่สูบบุหรี่ถูกเปิดเผยในการศึกษาก่อนหน้านี้โดยใช้ Nested PCR เพื่อตรวจหาเอชพีวี16/18 ดีเอ็นเอ ในการโลหิตของผู้ป่วย มะเร็งปอด 149 รายและกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็ง 174 ราย นอกจากนี้ เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความชุกของ เอชพีวีดีเอ็นเอ ในเลือดกับเนื้องอกในปอดจากเนื้อเยื่อเนื้องอก จาก 70 ชุด และ peripheral blood samples ผลการศึกษาพบว่าอัตราความชุกของ เอชพีวี 16/18 ในโลหิตของผู้ป่วยมะเร็งปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ (47.7% เทียบกับ 12.6% สำหรับเอชพีวี 16, $P < 0.0001$; 30.9% เทียบกับ 5.2% สำหรับ เอชพีวี 18, $P < 0.0001$) ตรวจพบความชุกของ เอชพีวี 16 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดหญิงมากกว่าผู้ชาย (57.6% เทียบกับ 41.1%, $P = 0.048$) รวมทั้งในกรณีที่เป็นเนื้องอก Stages III/IV มากกว่ากลุ่มที่มีเนื้องอก Stages I/II (54.6% เทียบกับ 29.3%, $P = 0.006$) หลังจากปรับผลกระทบของอายุ เพศ และสถานะการสูบบุหรี่ ความเสี่ยงต่อมะเร็งปอดเพิ่มขึ้น 6.5 เท่าสำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ เอชพีวี 16 ผลบวก(95% CI 3.7–11.3, $P < 0.0001$) เพิ่มขึ้น 9.2 เท่าสำหรับเอชพีวีไทป์ 18 ผลบวก (95% CI 4.2–20.2, $P < 0.0001$) และความเสี่ยงสูงสุด 75.7 เท่าสำหรับผู้ที่มี เอชพีวี 16 และ 18 ผลบวก ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการมีเอชพีวี DNA ในเลือดอาจเป็นตัวบ่งชี้ความเสี่ยงที่เป็นไปได้ของมะเร็งปอด (Pinon A, 2018)

แม้ว่าโดยทั่วไปแล้วเอชพีวีจะติดต่อทางเพศสัมพันธ์หรือโดยการสัมผัสทางผิวหนัง แต่ EBV มักติดต่อผ่านทางสารคัดหลั่งทางปาก การถ่ายเลือด และการปลูกถ่ายอวัยวะ มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบความชุกและgenotype เอชพีวี และ อีบีวี ในผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีในกาตาร์ โดยสำรวจความชุกของ เอชพีวีและ อีบีวีในผู้ชาย 378 คนและผู้หญิง 7 คน ที่มีสัญชาติต่างกัน (ส่วนใหญ่มาจากกาตาร์ อียิปต์ ซีเรีย จอร์แดน ปากีสถาน และอินเดีย) ที่อาศัยอยู่ในกาตาร์โดยใช้ซีอาร์โดยสกัดจากดีเอ็นเอบัฟเฟอร์โค๊ต (buffy Coat) โดยใช้พีซีอาร์ และ nested-PCR ตราวจหา E6 และ E7 รวมทั้ง *LMP1* ของ เอชพีวี และ อีบีวี ตามลำดับพบว่า จากจำนวนผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีทั้งหมด 385 รายที่ศึกษา 54.8% และ 61% ของกลุ่มตัวอย่างเป็น เอชพีวี และ อีบีวี บวกตามลำดับ นอกจากนี้ ข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการมีอยู่ร่วมกันของ เอชพีวี และ อีบีวีที่มีความเสี่ยงสูงคือ 40.4% ของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ที่สำคัญยิ่งกว่านั้น การศึกษานี้ชี้ให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าชนิด เอชพีวี ที่มีความเสี่ยงสูงที่พบบ่อยที่สุดในกาตาร์คือ 59 (54.8%), 31 (53.7%), 52 (49.1%), 51 (48.6%), 58 (47) %) และ 35 (45.5%) ในขณะที่ชนิด เอชพีวี ที่มีความเสี่ยงต่ำที่แสดงบ่อยที่สุดคือ 53 (50.6%), 11 (45.5), 73 (41.7%) และ 6 (41.3%) การติดเชื้อแสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า เอชพีวี และ อีบีวี มักมีอยู่ร่วมกันในผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีในกาตาร์ (Mandelbaum RT, 1997)

การติดเชื้อเอชพีวีเป็นสาเหตุที่มากที่สุดของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ทั้งในชายและหญิง นอกจากนั้นสามารถติดต่อผ่านทางการมีเพศสัมพันธ์ทางปากและทวารหนักได้ ส่วนในเด็กแรกเกิดพบว่าสามารถติดเชื้อขณะคลอดผ่านช่องคลอดของมารดาที่มีเชื้อนี้อยู่ทำให้ทารกอาจติดเชื้อเอชพีวีที่กล่องเสียงได้ สตรีที่ติดเชื้อ เอชพีวี ส่วนมากมักไม่มีอาการ เชื้อส่วนใหญ่จะหายไปเองภายใน 2 ปี ปัจจุบันยังไม่มียาที่ใช้รักษาการติดเชื้อเอชพีวีการติดเชื้อจะหายไปเองได้ประมาณ 70% ในปีแรก และหายไปเกือบ 90% ในปีที่ 2 มีเพียงผู้ติดเชื้อส่วนน้อย (ประมาณ 5-10%) ที่เชื้อจะคงอยู่ในร่างกายแล้วพัฒนาทำให้เกิดเป็นโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็งปากมดลูก ซึ่งต้องใช้ระยะเวลา ในการที่เซลล์ติดเชื้อจะเปลี่ยนเป็นมะเร็งประมาณ 2-20 ปี หูดชนิดทั่วไปมีลักษณะเป็นตุ่มเล็ก ๆ ที่สัมผัสแล้วรู้สึกขรุขระ อาจมีสีเนื้อ สีขาว สีชมพู หรือสีน้ำตาลอ่อน มักขึ้นตามมือ นิ้วมือ หรือข้อศอก ส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย แต่อาจสร้างความเจ็บปวดได้ในบางครั้ง และผิวหนังบริเวณที่เกิดหูดอาจบาดเจ็บหรือมีเลือดออกได้ง่ายกว่าปกติ การติดเชื้อเอชพีวีที่บริเวณปากมดลูกจากการมีเพศสัมพันธ์ถือเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ผู้ป่วยมักเริ่มมีอาการปรากฏเมื่อเซลล์มะเร็งลุกลามไปแล้ว ทางที่ดีจึงควรตรวจคัดกรองมะเร็ง

ปากมดลูกเป็นประจำ เพื่อให้สามารถพบความผิดปกติได้ตั้งแต่เนิ่น ๆ นอกจากนั้นการติดเชื้อเอชพีวียังอาจก่อให้เกิดมะเร็งชนิดอื่น ๆ ได้เช่นกัน ได้แก่ มะเร็งปากช่องคลอด มะเร็งอวัยวะเพศชาย มะเร็งทวารหนัก หรือมะเร็งช่องปากและลำคอส่วนบน ซึ่งล้วนไม่มีอาการบ่งบอกจนกว่าจะเข้าสู่ระยะลุกลาม

ไวรัสในน้ำ (Virus in water)

การปนเปื้อนของไวรัสน้ำ

น้ำเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของไวรัส เช่น น้ำผิวดิน ทะเลสาบและแม่น้ำ น้ำบาดาล ปากน้ำ และน้ำทะเล หรือแม้แต่น้ำแข็ง ในสหรัฐอเมริกา พบว่า 72% ของแหล่งน้ำบาดาลมีไวรัสชนิดเดียวกับไวรัสในลำไส้ การปนเปื้อนเกิดขึ้นด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เชื่อมโยงกับกิจกรรมของมนุษย์ รวมทั้งการกำจัดสิ่งปฏิกูลที่ไม่ผ่านการบำบัด การนำของเสียที่บำบัดแล้วกลับมาใช้ใหม่ การใช้ของเสียจากสัตว์เป็นปุ๋ย เป็นต้น การสัมผัสกับน้ำที่ปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นได้หลายวิธีในภายหลังเชื่อมโยงกับการใช้น้ำอย่างนับไม่ถ้วน เช่น การดื่ม การชลประทาน การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ กิจกรรมนันทนาการ ฯลฯ

การอยู่รอดของไวรัสในน้ำ

ไวรัสในน้ำอยู่รอดหรือตายได้ การติดเชื้อไวรัสบางชนิดมีปริมาณน้อย ประมาณ 1–10 ของอนุภาคสำหรับไวรัสบางชนิด ความสามารถของไวรัสในการอยู่รอดในน้ำมีความสำคัญมาก โนโรไวรัสและไวรัสที่เกี่ยวข้องถือเป็นสาเหตุหลักของโรคที่เกิดจากน้ำทั่วโลก ร่วมกับไวรัสในลำไส้อื่น ๆ เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของอาการท้องร่วง ซึ่งได้รับการจัดอันดับให้เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของโลก เด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายทางน้ำ ได้แก่ อะดีโนไวรัส โรตาร์ไวรัส จากการเสียชีวิตของเด็กอายุ ต่ำกว่า 5 ปี ในปี 2547 จำนวน 527,000 ราย และไวรัสตับอักเสบเอ รวมทั้งไวรัสในลำไส้อื่นๆ เช่น คอกแซกกี้ไวรัส อีโคไวรัส รีโอไวรัส แอสโตรไวรัส หรือไวรัสอื่น ๆ ที่เชื่อมโยงกับสัตว์น้ำหรือพืชถูกส่งผ่านทางน้ำเช่นกัน ไวรัสต้องการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ (Mandelbaum RT, 1997) มีหลายองค์ประกอบที่ควบคุมการอยู่รอดของไวรัสในน้ำ เช่น อุณหภูมิ แสง pH ความเค็ม สารอินทรีย์ สารแขวนลอยหรือตะกอน และส่วนต่อประสานระหว่างอากาศกับน้ำ

น้ำที่ปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลมีไวรัส

น้ำที่ปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลมีไวรัสมากมายมากกว่า 100 ชนิด และสามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ เช่น โรคตับอักเสบ กระเพาะ ลำไส้อักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบและเยื่อบุตาอักเสบ สามารถแพร่กระจายผ่านน้ำที่ปนเปื้อน มีการค้นพบไวรัสในน้ำมากขึ้นเนื่องจากวิธีการตรวจหาและจำแนกลักษณะใหม่ แม้ว่าจะมีเพียงไวรัสบางตัวเท่านั้นที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ (ภาพ 8) ดังนี้

Family	Genus	Species	Common Name	Disease Caused
Adenovirus	Mastadenovirus	Human Mastadenovirus A through G	adenovirus	Adenovirus infection, pharyngitis, conjunctivitis, fever
Astrovirus	Mamastrovirus	Human astrovirus	Astrovirus	Gastroenteritis, diarrhea
Calicivirus	Noro virus	norovirus, winter	vomiting bug	Gastroenteritis, fever
Coronaviridae	Coronaviridae	SARS coronavirus	SARS, COV (Covcitation needed)	SARS, gastroenteritis, respiratory disease
Herpesviridae	Orthohepevirus	Orthohepevirus A	Hepatitis E virus, HEV	Hepatitis E
Picornavirus	Enterovirus	Enterovirus A	Coxsackie A virus	Hand, foot, and mouth disease, paralysis, meningitis, fever, respiratory disease, myocarditis, heart anomalies

Family	Genus	Species	Common Name	Disease Caused
Picornavirus	Enterovirus	Enterovirus B	echovirus	Meningitis, fever, respiratory disease, rush, gastroenteritis
Picornavirus	Enterovirus	Enterovirus C	poliovirus	Polio
Picornavirus	Hepatovirus	Hepatovirus A	hepatitis A virus, HAV	Hepatitis A
Polyomaviridae	Polyomavirus	JC virus	JC virus	Progressive multifocal leukoencephalopathy
Reovirus	Rotavirus	Rotavirus A, B, C	rotavirus	Gastroenteritis

ภาพ 6 น้ำที่ปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลมีไวรัส

ที่มา: ดัดแปลงจาก www.wikipedia/Human viruses in water.

อุณหภูมิที่ลดลงเป็นสิ่งสำคัญในการอยู่รอดของไวรัสได้นานขึ้น ตัวอย่างเช่น โปลิโอไวรัสและอีโคไวรัสรวมถึงไวรัสบางชนิดต้องใช้เวลาหนึ่งปีกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศา ในการมีชีวิตอยู่ในขณะที่อุณหภูมิ 37 องศา อัตราของโปรตีน การเปลี่ยนสภาพของ กรดนิวคลีอิคและปฏิกิริยาเคมีที่ทำลายแคปซิดของไวรัสจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นไวรัสจะอยู่รอดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิต่ำไวรัสตับอักเสบเอและพาร์โวไวรัสมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดในอุณหภูมิต่ำ ท่ามกลางไวรัสในลำไส้ตัวอื่น

แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ในแสงแดดสามารถยับยั้งไวรัสโดยทำให้นิวคลีโอไทด์ในจีโนมของไวรัสหลายชนิดในน้ำถูกทำลายในที่ที่มีแสงแดดส่องถึง อุณหภูมิที่สูงขึ้นและรังสียูวีที่มากขึ้นในช่วงฤดูร้อนสอดคล้องกับการอยู่รอดของไวรัสในฤดูร้อนที่สั้นลงเมื่อเทียบกับฤดูหนาว ดีเอ็นเอไวรัสเกลียวคู่ เช่น อะดีโนไวรัสสามารถต้านทานการยับยั้งแสงยูวีได้ดีกว่าเอนเทอโรไวรัส เนื่องจากไวรัสเหล่านี้สามารถซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์โฮสต์ที่เกิดจากแสงยูวีได้ แสงที่มองเห็นอาจส่งผลต่อการอยู่รอดของไวรัสโดยกระบวนการที่เรียกว่า photodynamic inactivation ค่า pH 5–9 ของน้ำธรรมชาติส่วนใหญ่ ไวรัสในลำไส้หลายชนิดมี

ความเสถียรที่ pH 3–5 มากกว่าที่ pH 9 และ 12 เอนเทอโรไวรัส สามารถอยู่รอดได้ที่ pH 11–11.5 และ 1–2 แต่ในช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น อะดีโนไวรัสและโรตาร์ไวรัส ที่ pH 10 หรือมากกว่า เกลือและโลหะ ไวรัสไม่สามารถอยู่รอดได้ในบริเวณที่มีเกลือเข้มข้น ดังนั้นไวรัสจึงสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดได้นานกว่าแหล่งน้ำที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (Hunt RJ, 2010)

น้ำจึงเป็นตัวกลางในการแพร่เชื้อไวรัส แต่ปัจจัยแวดล้อมหลายอย่างจะส่งผลเสียต่อประชากรไวรัสอุณหภูมิที่สูงขึ้นหมายถึงการลดลงของประชากรไวรัสเร็วขึ้น เช่นเดียวกับแสงแดดที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่สูงขึ้น หรือระดับออกซิเจนที่สูงขึ้น อัตราการตายของไวรัสจะสูงขึ้นในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมหยุดการทำงานของไวรัสโดยการกระทำโดยตรงหรือโดยแคปซิดจีโนมของประปากรไวรัสยังมีกลไกการต่อต้านโดยทั่วไปเกี่ยวข้องกับการป้องกันทางกายภาพจากผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์ พฤติกรรมการป้องกันดังกล่าว ได้แก่ การรวมตัว การยึดเกาะ อาจส่งผลต่อการอยู่รอด การศึกษาในห้องปฏิบัติการต้องรวมสภาวะมาตรฐานของน้ำ และวิเคราะห์ผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ การศึกษาในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ ก็มีความจำเป็นมากเช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องพิจารณาปัจจัยทั้งหมดที่อาจส่งผลต่อการอยู่รอด (S.R, 2003)

การปนเปื้อนของสภาพแวดล้อมทางน้ำที่เกี่ยวข้องกับแม่น้ำ ทะเลสาบ แหล่งน้ำดื่ม ฯลฯ โดยไวรัสได้รับการให้ความสนใจ พฤติกรรมของไวรัสที่พบในสภาพแวดล้อมทางน้ำโดยทั่วไปว่าไวรัสจะถูกดูดซับ บนพื้นผิวที่เป็นของแข็ง เช่น สารแขวนลอยและตะกอนไวรัสเป็นเวลานาน การอยู่รอดของไวรัสในสภาพแวดล้อมทางน้ำ (Muhammad, 2022)

การศึกษาแหล่งที่มาและการขนส่งของไวรัสในลำไส้ของมนุษย์ในบ่อน้ำประปาเทศบาล นักวิจัยจำนวนน้อยที่ทราบว่าอาจมีไวรัสอยู่ในชั้นหินอุ้มน้ำและบ่อน้ำลึก ระหว่างปี 2551 และ 2552 ได้เก็บตัวอย่างไวรัสจากบ่อน้ำประปาในเขตเทศบาล 6 แห่ง บ่อน้ำมีความลึกประมาณ 220 ถึง 300 เมตรและ น้ำจากชั้นหินทราย น้ำจากใต้บ่อน้ำระดับภูมิภาค น้ำจากทั้งด้านบนและด้านล่างของบ่อน้ำ นอกจากนี้ ยังสุ่มตัวอย่างทะเลสาบในท้องถิ่นและสิ่งปฏิกูลที่ไม่ผ่านการบำบัดเพื่อเป็นแหล่งของไวรัส ตรวจพบไวรัสมากถึง 61% ในแต่ละตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำใต้ดินจำนวนมากมีผลบวกต่อการติดไวรัส ตัวอย่างทะเลสาบมีไวรัสมากกว่า 75% ความเข้มข้นและซีโรไทป์ของไวรัสที่สังเกตพบแปรผันตามเวลาในตัวอย่างทั้งหมด ตัวอย่างสิ่งปฏิกูลทั้งหมดมีความเข้มข้นของไวรัสสูงมากซีโรไทป์ของไวรัสที่ตรวจพบในน้ำเสียและน้ำใต้ดินมีความสัมพันธ์กันชั่วคราว ซึ่งบ่งชี้ว่าการแพร่กระจายของไวรัสอย่างรวดเร็วจากแหล่งที่มาไปยังบ่อน้ำ ไวรัสอะดีโนและไวรัสเอนเทอโรในบ่อน้ำมีความสัมพันธ์กับการตกตะกอน แหล่งที่มา

ของไวรัสที่พบมากที่สุดคือการรั่วไหลของสิ่งปฏิกูลที่ไม่ผ่านการบำบัดจากท่อระบายน้ำสุขาภิบาล (Vecchia AD, 2013)

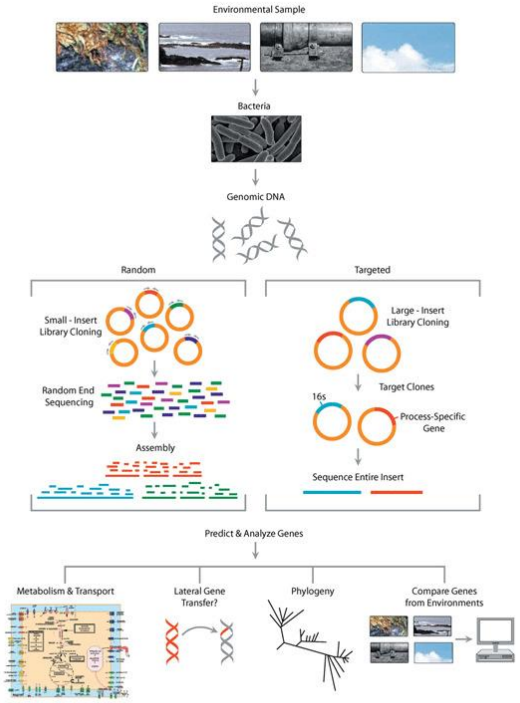
ในการตรวจไวรัสในน้ำประปาที่มีปริมาณมากใช้ตัวกรองเมมเบรนแบบ (pleated membrane filters) ซึ่งเป็นวิธีการสำหรับหาความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของไวรัสจากน้ำในระยะเวลาอันสั้น ไวรัสในน้ำประปาที่เป็น aluminum chloride acid จะถูกดูดซับไปยัง fiberglass ที่มีความลึก 10 นิ้ว (ประมาณ 25.4 ซม.) และตัวกรอง fiberglass epoxy ขนาด 10 นิ้วตามลำดับ ที่อัตราการไหลสูงสุด 37.8 ลิตร/นาที ชุดตัวกรองนี้สามารถดูดซับไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพจากน้ำประปาที่ผ่านการบำบัดแล้วมากกว่า 19,000 ลิตร ไวรัสที่ถูกดูดซับจะถูกชะออกจากตัวกรองด้วยไกลซีนบัฟเฟอร์ (pH 10.5) และสารที่ถูกดูดซับจะถูกปรับความเข้มข้นใหม่โดยใช้กระบวนการตกตะกอนจาก aluminum ไวรัสถูกชะออกจาก aluminum ฟอกด้วย Glycine Buffer (pH 11.5) โดยใช้ขั้นตอนนี้ ไวรัสในน้ำประปา 1,900 ลิตร สามารถเข้มข้น 100% (Weitz, 2006)

การตรวจหาอะดีโนไวรัส โรตาร์ไวรัสและเอนเทอโรไวรัสที่พบในมนุษย์จากการอุปโภคบริโภคน้ำประปาและความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำโดยรวมในการาจีประเทศปากีสถาน แหล่งน้ำดื่มในประเทศกำลังพัฒนาเป็นพื้นที่ที่ถูกละเลยการวิจัยในปากีสถาน ไม่พบข้อมูลความชุกของไวรัสในลำไส้จากน้ำดื่มของเมืองการาจีที่ใหญ่ที่สุด ศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการมีอยู่ของไวรัสในลำไส้ ได้แก่ อะดีโนไวรัส (HAdV), เอนเทอโรไวรัส (hEV) และจีโนไทป์ เอ โรตาร์ไวรัส (GARV) ในน้ำประปา โดยใช้วิธีการพีซีอาร์โดยตรวจพบ 20%, 43% และ 23% ของ HAdV, hEV และ GARV ในตัวอย่างน้ำประปาตามลำดับ นอกจากนี้เรายังได้แสดงคุณภาพโดยรวมของน้ำประปาที่สถานีสูบน้ำและก๊อกน้ำสำหรับผู้บริโภคและไม่พบตัวอย่างที่ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (Hong, 2020)

Torque teno virus (TTV) ในน้ำประปาของโรงเรียนของรัฐทางตอนใต้ของบราซิลได้ศึกษา *Torque teno virus* (TTV) ถูกสำรวจในน้ำประปาที่เก็บรวบรวมในโรงเรียนจากเขตเทศบาล 3 แห่งที่ตั้งอยู่ทางตอนใต้ของบราซิล พบจีโนม TTV ใน 11.7 % (4/34) ของตัวอย่างตรวจพบ TTV ดีเอ็นเอในตัวอย่าง 10.5% (2/19) ที่รวบรวมที่เมืองคาเซียสโดซุลและในตัวอย่าง 25% (2/8) จาก Pelotas มีอัตราการบำบัดน้ำเสียต่ำ ตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งซานตาครูซดูซูลมีการบำบัดน้ำเสียเกือบร้อยละ 92 เป็นลบ ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณของสิ่งปฏิกูลที่บำบัดแล้วอาจส่งผลต่ออัตราการตรวจพบ TTV ดีเอ็นเอในน้ำดื่มโดยแสดงความสัมพันธ์เชิงลบ ($r = -0.76$) เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการบำบัดน้ำเสียกับการตรวจหาจีโนม TTV อัตราการตรวจจับของ TTV ยังถูกเปรียบเทียบกับ อีโคไล (Paez-Espino D, 2017)

เมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)

เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในสิ่งมีชีวิต (community) เช่น ในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ อากาศ ถังหมัก หรือในระบบลำไส้และกระเพาะอาหารทั้งของคนและสัตว์ วิธีการเริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม จากนั้นวิเคราะห์อีเอ็นเอ เหล่านั้นด้วยวิธีการ Next generation sequencing ที่เรียกว่า 16s/ITS Metagenome sequencing ซึ่งมุ่งเน้นการใช้ ไฟรเมอร์ ที่จำเพาะกัน region ที่เหมาะสม เช่น V3–V4 (16S), ITS2 จำนวนข้อมูลที่ได้มากถึง 50,000 read หรือ 100,000 read ซึ่งเพียงพอสำหรับการนำมาวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น Global alignment, Taxonomic assignment, OTU counting และ comparative analysis ใช้ในการค้นหาสารชีวโมเลกุลใหม่ ๆ และใช้วิเคราะห์ความ หลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในชุมชีพ การค้นพบยีนชนิดใหม่ ๆ ทำให้ทราบถึงโครงสร้างและหน้าที่ของจุลินทรีย์ภายในชุมชีพ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การใช้แก้ปัญหาทั้งด้านการแพทย์ การเกษตร และ อุตสาหกรรมได้ดังภาพ 14 (Shakira, 2009)

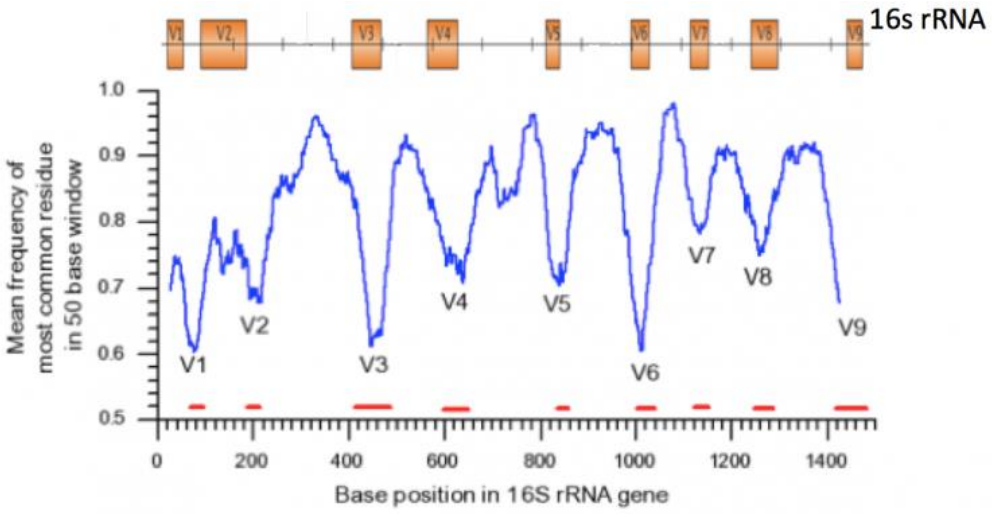


ภาพ 7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Metagenomic

ที่มา: Shakira Ghazanfar (2009)

จากฐานข้อมูลเมตาจีโนม (metagenomic library) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลัก ๆ

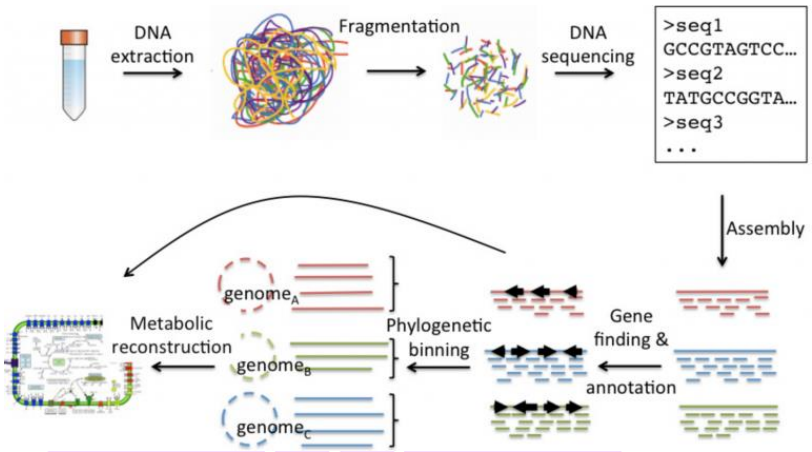
1. การอ้างอิงจากคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา (function-based screening)
2. อ้างอิงจากลำดับเบสของยีนที่ต้องการ (sequence-based screening)



ภาพ 8 Base position 16srNA gene

ที่มา: NGS Analysis/learn.gencore.bio.nyu.edu.com

Targeted Metagenomics ชีวโมเลกุลมากมายที่ถูกค้นพบด้วยวิธี เมตาจีโนมิกส์ เช่น DNA polymerase, lipase, cellulase, protease หรือยีนที่สร้างสารปฏิชีวนะ ชนิดของ Metagenomics แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ Targeted sequencing และ shotgun Targeted Metagenomics application โดย conserved regions (16s rRNA, 18s rRNA, ITS) ถูก amplified PCR และ sequenced บริเวณ conserved เหล่านี้มี variable regions ที่ใช้ identification ของ different groups เชื้อแต่ละกลุ่มจนถึงระดับ species ไม่ได้ และไม่ทราบ function from (NGS Analysis, 2017)



ภาพ 9 Shotgun Metagenomics

ที่มา: NGS Analysis/learn.gencore.bio.nyu.edu.com

Shotgun Metagenomics วิธีนี้ไม่เลือกปฏิบัติเพราะจะ sequence ทุกอย่างในตัวอย่าง สิ่งนี้ไม่เพียงแต่สามารถกำหนด assign taxonomy และ quantify ของ organisms ได้จนถึงระดับ species แต่ยังสามารถ assign function เนื่องจากจะจัด sequence ส่วนต่างๆ ของ organism's genome แต่ละส่วน หากข้อมูลของคุณดีเพียงพอ คุณสามารถสร้างจีโนมหรือยีนทั้งหมด รวมทั้ง infer different pathways ที่แตกต่างกันได้

sequencing platforms 454 pyrosequencing และ Ion Torrent ที่เลิกใช้ไปแล้วไปจนถึง platform Illumina ที่ใช้ในปัจจุบัน พร้อมด้วย platform Nanopore และ PacBio ซึ่งสามารถสร้างการอ่านได้นานกว่าการอ่านของ Illumina ขึ้นอยู่กับคุณภาพและขนาดชิ้นส่วน ของแม่แบบดีเอ็นเอ โดยไม่คำนึงถึงแพลตฟอร์มการจัดลำดับ คุณลักษณะเด่นหลักคือความสามารถในการสร้างการอ่านสั้นจำนวนมาก (โดยทั่วไปคือ 100 ถึง 300 bp ต่อการอ่าน) ต่อการรัน platform การจัดลำดับเหล่านี้ส่วนใหญ่ต้องการความเข้มข้นของ DNA ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (โดยทั่วไปคือ 10 ng ถึง 1 ไมโครกรัมของ DNA) เมื่อเทียบกับวิธีการ metagenomics เชิงฟังก์ชันแบบ Cloning ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการมีน้อย เนื่องจากแพลตฟอร์มการจัดลำดับสมัยใหม่ต้องพึ่งพา PCR แบบ solid phase หรือแบบ Emulsion เพื่อ multiply gene amplification molecules เพื่อให้ความไวในการตรวจจับเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม สิ่งนี้ยังสามารถทำให้เกิดอคติการขยายสัญญาณที่เกิดขึ้นระหว่าง PCR และข้อผิดพลาดในการจัดลำดับเนื่องจาก polymerase ที่มีความแม่นยำต่ำ shotgun sequence ยังไม่ต้องการให้ DNA มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากขั้นตอนการเตรียม library ต้องการให้ DNA ถูกแยกส่วนเหลือประมาณ 400 bp DNA

ที่แยกส่วนมากเกินไปจะทำให้คุณภาพการจัดลำดับลดลงด้วยการสร้างการอ่านที่มีความยาวสั้นกว่าปกติ ดังนั้น จำเป็นต้องมีการปรับโปรโตคอลให้เหมาะสมเพื่อลดอัตราข้อผิดพลาดที่เกี่ยวข้องและความล้มเหลวในคุณภาพการจัดลำดับ

Sampling และ processing การประมวลผลตัวอย่างเป็นขั้นตอนแรกและสำคัญที่สุดใน metagenomics DNA ที่สกัดออกมา เป็นตัวแทนของทุกเซลล์ และต้องมี high quality nucleic acids ปริมาณที่เพียงพอสำหรับ subsequent library production และ sequencing การประมวลผลต้องใช้ protocols เฉพาะสำหรับตัวอย่างแต่ละประเภท และมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากมายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ (เช่น การสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ระบบนิเวศนับหมื่นโดยใช้เทคโนโลยีการสกัด DNA เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถเปรียบเทียบได้ ตัวอย่างบางชนิด (เช่น การตรวจชิ้นเนื้อหรือน้ำบาดาล) มักจะให้ DNA ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น Library production สำหรับ most sequencing technologies ต้องการ DNA ใน nanograms หรือ micrograms ดังนั้นจึงต้องamplification ของ starting material จำเป็นต้องมี Multiple displacement amplification (MDA) โดยใช้ random hexamers และ phage phi29 polymerase เป็นตัวเลือกหนึ่งที่ใช้เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอ วิธีนี้สามารถขยาย femtograms ของ DNA เพื่อเพิ่ม product และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายใน single cell genomics ในระดับหนึ่งใน metagenomics อาศัยการจำแนกลำดับไปยังฟังก์ชันที่รู้จักหรือหน่วยอนุกรมวิธานตามการค้นหาที่เหมือนกันกับข้อมูล สำหรับชุดข้อมูลขนาดเล็ก (< 10,000 ลำดับ) โดยทั่วไป ชุดข้อมูล metagenomics จะมีขนาดใหญ่มาก ดังนั้นจึงไม่สามารถใส่คำอธิบายประกอบด้วยตนเองได้ คำอธิบายประกอบอัตโนมัติจึงต้องมีความแม่นยำมากขึ้น

ฐานข้อมูลเมตาจีโนมิกส์ ที่นิยมใช้ เช่น KEGG egg NOG , COG/KOG , PFAM และ TIGRFAM เนื่องจากไม่มีฐานข้อมูลที่ครอบคลุมฐานทางชีววิทยาทั้งหมด ดังนั้นการวิเคราะห์ metagenomic เกี่ยวข้องกับการประมวลผลชุดข้อมูลขนาดใหญ่ใหม่ การย่อให้เล็กสุด ความซ้ำซ้อนของการค้นหา ซึ่งช่วยให้สามารถตีความได้หลากหลาย Genomic Standards Consortium (GSC) กับโครงการ M5 จัดเตรียมมาตรฐานต้นแบบสำหรับการแลกเปลี่ยนผลการวิเคราะห์ metagenome ที่คำนวณได้ Metagenomic sequencing มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาไวรัส โดยใช้ 16S RNAสำหรับแบคทีเรียและอาร์เคียและ 18S RNA สำหรับยูคาเรีย) วิธีเดียวที่จะเข้าถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม คือการใช้ metagenomics ของไวรัส (เรียกอีกอย่างว่า viromes) เกี่ยวกับความหลากหลายและวิวัฒนาการของไวรัส ตัวอย่างเช่นท่อ metagenomic ที่เรียกว่า Giant Virus Finder แสดงให้เห็นหลักฐานแรกของการมีอยู่ของไวรัสในทะเล รวมถึงแหล่งน้ำต่าง ๆ (Thomas T, 2012)

เมตาจีโนมิกส์ คือเครื่องมือ เพื่อ Monitor Reclaimed Water Quality สารปนเปื้อนทางชีวภาพจำนวนมากแพร่กระจายผ่านน้ำ และการเกิดขึ้นของสิ่งเจือปนอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของประชาชนและสิ่งแวดล้อม การตรวจสอบแบบทั่วไปอาศัย addressing modern water quality concern สมัยใหม่ metagenomics เป็นวิธีการในการประเมินสารปนเปื้อนทางชีวภาพในน้ำอย่างรวดเร็วและคลอบคลุม เมื่อรวมกับวิธีการที่เหมาะสมเพิ่มเติม (เช่น PCR เชิงปริมาณ และ flow cytometry) และเครื่องมือชีวสารสนเทศ Metagenomics สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับทั้งความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายของสารปนเปื้อนทางชีวภาพในน้ำที่นำกลับมาใช้ใหม่ ความสัมพันธ์เพิ่มเติมระหว่างข้อมูลที่ได้จาก เมตาจีโนมิกส์ของสารปนเปื้อนที่เลือกและพารามิเตอร์ที่วัดได้ของคุณภาพน้ำ ด้วยวิธี เมตาจีโนมิกส์ (เช่น ทั้ง platform sequencing และเครื่องมือชีวสารสนเทศ) และ metagenomics ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการตรวจสอบคุณภาพน้ำ (Thomas T, 2012)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้ว

1. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ขนาด 1000 ml (Duran bottle)
2. กระบอกตวง (Cylinder)
3. บีกเกอร์ (Beaker)
4. แท่งแก้วคนสาร

เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
2. เครื่องชั่ง (Balance)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
5. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
6. ไมโครเวฟ (Microwave)
7. เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis)
8. เครื่องถ่ายภาพเจล (Chemiluminescence & fluorescence gel Documentation & image lab software)
9. เครื่องเพิ่มปริมานดีเอ็นเอ (Thermal Cycler &PCR machine)
10. เครื่อง Laminar airflow ยี่ห่อ Grow รุ่น 150D
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real–Time PCR)
12. Micropipette ปริมาตร 10 µl
13. Micropipette ปริมาตร 20 µl
14. Micropipette ปริมาตร 200 µl
15. Micropipette ปริมาตร 1000 µl

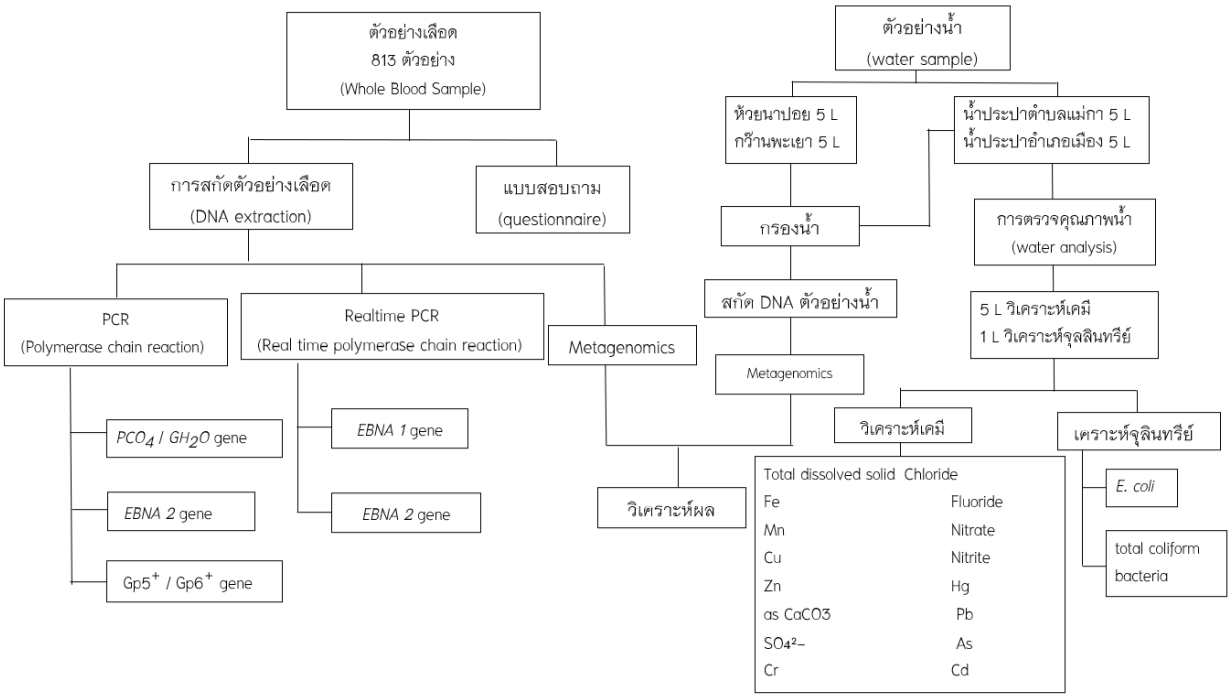
อุปกรณ์

1. Centrifuge tube ขนาด 50 ml
2. Micro centrifuge ขนาด 1.5 ml
3. PCR tube ขนาด 0.2 ml
4. Micro centrifuge tube rack
5. Centrifuge tube rack
6. Tip ขนาด 10 µl
7. Tip ขนาด 20 µl
8. Tip ขนาด 200 µl
9. Tip ขนาด 1000 µl
10. ช้อนตักสาร (Spatula)

สารเคมี

1. Tris–base
2. Glacial Acetic acid
3. EDTA
4. Ethanol
5. lysis buffer
6. lysozyme Solid
7. proteinase K
8. 5M potassium acetate
9. Phenol Chloroform: Isoamyl alcohol
10. Isopropanol
11. TE buffer
12. น้ำกลั่น
13. น้ำยา PCR Master Mix ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia
14. น้ำยา Real time PCR (qPCR) ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia
15. 100 bp DNA Ladder Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia
16. Red safe Intron Biotechnology, Inc

ออกแบบการทดลอง



ภาพ 10 แผนผังการทดลอง

ชุดสกัด (DNA extraction)

1. DNA extraction (Genomic DNA Isolation Kit (Blood/Cultred/Fungus) PDC11-0100, BIO-HELIX Co., Xindian Dist, New Taipei City, Taiwan)

ชุดกรองน้ำ

1. เครื่องกรองสุญญากาศ (Rocker 300, Rocker, Waller Chemical Thailand Co., Ltd., Thailand) พร้อมตัวกรอง
2. กระดาษกรอง size 0.025 µm MCE filter membranes (47 mm diameter, Millipore, Sigma-Aldrich Pte, Singapore)
3. กระดาษกรอง size 0.45 µm Nylon Filter Membrane (Pore size 0.45um)

ตาราง 1 Sequence primer

Primer	Sequence	PCR product
GH_2O Forward primer	5′ GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3′	268 bp
PCO_4 Reverse primer	5′ CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC3′	
GP5$^+$ Forward primer	5′ TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC ‘3	154 bp
GP6$^+$ Reverse primer	5′ GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C ‘3	
EBNA1 PQ_3 Forward primer	5′ CCA CAA TGT CGT CTT ACA CC–3′	99 bp
EBNA1 PQ_4 Reverse primer	5′ ATA ACA GAC AAT GGA CTC CCT–3′	
*EBNA2 F*orward primer	5′ CAG GTA CAT GCC AAC AAC CTT 3′	219 bp
EBNA2 Reverse primer	5′ CCA ACA AAG ATT GTT AGT GGA AT 3′	

วิธีการทดลอง

กลุ่มเป้าหมาย

เก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มเป้าหมายจากอาสาสมัคร อายุ 3–90 ปี ในจังหวัดพะเยา ภาคเหนือ จำนวนทั้งหมด 813 คน จากประชากรตำบลแม่กาและตำบลเวียงในบริเวณแหล่งน้ำธรรมชาติและการใช้น้ำประปาในจังหวัดพะเยา เกณฑ์เดียวที่ใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างคือผู้บริจาคอาศัยอยู่บริเวณแหล่งน้ำธรรมชาติและใช้น้ำประปาจังหวัดพะเยา ซึ่งค่า Prevalence (P) ของ EBV ประมาณ 2% มาจากงานวิจัย Geographic variation in the prevalence of *Epstein–Barr virus* positive diffuse large B–cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population [31]

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

คำนวณจากสมการ ซึ่งเป็นวิธีการคำนวณตัวอย่างที่เป็นมาตรฐานสำหรับศึกษาทดลอง

$$N = Z^2_{1-\alpha} P(1-P)/d^2$$

$$N = 1.96^2 \times 0.02(1-0.02)/0.01^2$$

$$N = 753.816$$

Sample size ค่าความเชื่อมั่น 95% นิยมใช้ในทางการแพทย์ แต่ในการทดลองนี้ใช้ค่าความเชื่อมั่นที่ 99% ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างประมาณ 813 ตัวอย่าง [31] นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เก็บข้อมูลแบบสอบถามจากอาสาสมัครเพื่อนำมาวิเคราะห์สถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS *Pearson's chi-square* test P <0.05 significant

จริยธรรมในการเก็บตัวอย่าง

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ดำเนินการรับรองโครงการตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล Declaration of Helsinki, the Belmont Report,CIOMS guidelines, และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP) เลขที่โครงการวิจัย 1.3/023/63

แบบสอบถาม

สำรวจข้อมูลของผู้มาบริจาคตัวอย่างเลือด โดยทำแบบสอบถามประวัติ รวมถึงการใช้ชีวิตประจำวันและการบริโภค อุปโภคน้ำ เช่น ชื่อ นามสกุล เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ประวัติการเป็นมะเร็ง โรคประจำตัว การอาบน้ำ ใช้น้ำในการแปรงฟัน การดื่มน้ำซื้อ น้ำต้ม น้ำกรอง การรับประทานอาหาร ผัก ผลไม้ การดื่มแอลกอฮอล์ และ สูบบุหรี่ เป็นต้น

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 813 ราย

1. สอบถามประวัติส่วนตัว ข้อมูลการใช้ชีวิตประจำวัน และข้อมูลการใช้น้ำ
2. ตรวจดูว่าป้ายชื่อผู้ป่วยที่ติดที่ในใบตรวจและหลอดเก็บเลือดให้ตรงกันโดยนักเทคนิคการแพทย์
3. ถามชื่อและนามสกุลผู้ป่วยทุกครั้งเมื่อจะเจาะเลือดโดยนักเทคนิคการแพทย์
4. เจาะเลือดใส่ Tube EDTA mix โดยการ invert ขึ้นลง 8 ครั้ง และ Tube clotted blood mix โดยการ invert ขึ้นลง 5 ครั้งโดยนักเทคนิคการแพทย์เพื่อนำไปห้องปฏิบัติการดูดเก็บเลือด 4 องศาเซลเซียส
5. ปั่นแยกซีรัมต้องทำการปั่นแยกภายใน 6 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือดแล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ถึง-80 องศาเซลเซียส เตรียมขั้นตอนสกัดต่อไป

ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างเลือด

ขั้นตอนที่ 1 Sample Cells Harvesting

1. เก็บเลือดในหลอดเก็บตัวอย่าง EDTA–Na2 (หรือสารผสมต้านการแข็งตัวของเลือด) เก็บที่ 4 ml
2. Transfer 300 µl หรือ buffy coat 200 µl ไปยัง 1.5 ml microcentrifuge tube
3. เพิ่ม Buffer CR 900 µl และ mix โดย inversion
4. Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที (พลิกกลับสองครั้งในระหว่าง Incubate)
5. Centrifuge เป็นเวลา 5 นาทีที่ 4,000 xg
6. Remove supernatant ออกให้หมดและ resuspend ที่ cells ใส่ 50 µl ของ Buffer CR

ขั้นตอนที่ 2 Lysis

1 เพิ่ม 300 µl ของ Buffer CC ไปยัง resuspended cells จากขั้นตอนที่ 1 และ vortex

2. Incubate 60 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที หรือจนกว่าตัวอย่าง lysate ในระหว่าง incubation, invert ในอ่างทุกๆ 3 นาที

ขั้นตอนที่ 3 Protein Removal

1. เติม Buffer CB 400 µl ลงในตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 2 แล้วเขย่าอย่างแรง
2. Centrifuge 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที (อย่าเกิน 1 นาที)

ขั้นตอนที่ 4 DNA Binding

1. วาง Column CC in a 2 ml Collection Tube
2. ย้าย supernatant completely จากขั้นตอนก่อนหน้าไปยัง Column CC
3. Centrifuge 14,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที
4. Discard the flow–through และวาง Column CC กลับเข้าไปใน Collection Tube เดียวกัน

ขั้นตอนที่ 5 Wash

1. เพิ่ม 400 µl of the Buffer W1 ลงใน Column CC
2. Centrifuge ที่ 14,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที
3. Discard the flow–through และวาง Column CC กลับไปใน Collection Tube เดียวกัน
4. เติม Buffer W2 600 µl (Ethanol added) ลงใน Column CC
5. Centrifuge ที่ 14,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที
6. Discard the flow–through และวาง Column CC กลับเข้าไปใน Collection Tube เดียวกัน
6. Centrifuge ที่ 14,000 xg อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที remove residual Buffer W2 ที่ตกค้าง

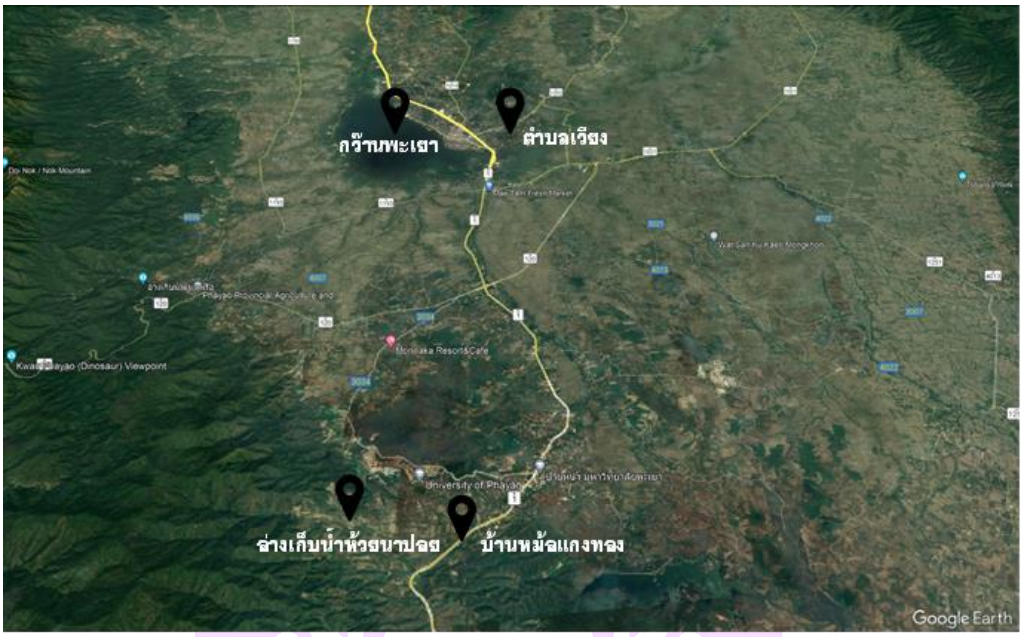
ขั้นตอนที่ 6 DNA Elution

1. Transfer Column CC ที่แห้งไปยัง 1.5 ml microcentrifuge tube
2. เพิ่ม 50–200 µl ของ Pre–Heated Buffer BE หรือ TE ลงในกึ่งกลางของ column matrix
3. Let stand ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
4. Centrifuge เป็นเวลา 2 นาทีที่ 14,000 xg เพื่อ elute the purified DNA

ขั้นตอนการทำ run gel electrophoresis

1. การเตรียม 2% gel agarose โดยชั่ง gel agarose 2 กรัม เติม 1X TAE buffer 100 ml ผสมกับเจลที่ทำการชั่งมาให้ความร้อนเพื่อให้เจลละลาย ด้วย เครื่องไมโครเวฟ
2. รอเจลอุ่นแล้วทำการดูด red safe 5 µl ใส่ จากนั้นเทลงบนถาดเตรียมเจลวาง Com เพื่อที่จะโหลดตัวอย่างลงไป
3. เมื่อเจลแข็งตัวนำไปวางบนเครื่อง gel lectrophoresis เพื่อทำการ run gel
4. นำวุ้นใส่เครื่อง gel electrophoresis เพื่อเติม 1X TAE buffer ให้ท่วมพ้นเจลที่ทำกาวางบนเครื่อง
5. จากนั้นหยดตัวอย่างลงในช่องว่างของเจลหลุม 1–10 และหยด Positive หลุมที่ 11 และหยด Negative หลุมที่ 12 และสุดท้ายหยด Marker (Marker 1 kb) 6 µl ในหลุมที่ 1
6. เมื่อหยดครบแล้วทำการปิดฝา ประกอบถาดรันเจลเข้ากับตัวเครื่องที่จ่ายกระแสไฟ
7. เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ นำเจลไปถ่ายภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพ
8. บันทึกผลที่ได้

สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำ



ที่มา : google earth (กว๊านพะเยา : 19.159372,99.902416 ตำบลเวียง : 19.166839,99.900765 อ่างเก็บน้ำห้วยนาปอย : 19.007402,99.874467 บ้านหม้อแกงทอง : 19.003863,99.896643)

วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำธรรมชาติ

1. เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ห้วยนาปอย 5 ลิตร และกว๊านพะเยา 5 ลิตร จังหวัดพะเยาเพื่อวิเคราะห์ Metagenomic
2. เก็บตัวอย่างน้ำจากน้ำประปา ต.แม่กา 5 ลิตร และ อ.เมือง 5 ลิตร จังหวัดพะเยา เพื่อวิเคราะห์ Metagenomic
3. เก็บตัวอย่างน้ำจากน้ำประปา ต.แม่กา 5 ลิตร และ อ.เมือง 5 ลิตร จังหวัดพะเยา จังหวัดพะเยาเพื่อเตรียม 5 ลิตรสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี 1 ลิตร สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์
4. นำขวดแก้วหรือกระบอกตวงที่มีความจุขนาด 1000 ml เพื่อสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ
5. ติดฉลากบนขวดเพื่อระบุรายละเอียดของตัวอย่างให้เรียบร้อย
6. เก็บที่ระดับความลึก 30 เซนติเมตร จากผิวน้ำ ไม่เก็บใกล้ฝั่ง
7. ก่อนเก็บตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างน้ำกลั้ว (Rinse) ขวดเก็บตัวอย่างก่อนสัก 2-3 ครั้ง
8. บรรจุตัวอย่างน้ำใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง นำส่งห้องปฏิบัติการ

วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำประปา

1. เก็บตัวอย่างน้ำประปา ต.แม่กา 5 ลิตร และน้ำประปา อ.เมือง 5 ลิตรในจังหวัดพะเยา
2. นำขวดแก้วหรือกระบอกตวงที่มีความจุขนาด 1000 ml เพื่อสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ
3. ติดฉลากบนขวดเพื่อระบุรายละเอียดของตัวอย่างให้เรียบร้อย
4. ใช้ทิชชูหรือสำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดบนก๊อกน้ำ เปิดน้ำปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
5. ก่อนเก็บตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างน้ำกลั้ว (Rinse) ขวดเก็บตัวอย่างก่อนสัก 2-3 ครั้ง บรรจุตัวอย่างน้ำใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง นำส่งห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนการกรองน้ำ

1. ติดตั้งชุดกรองสุญญากาศบุชเนอร์และปั๊มดูดอากาศ (Rocker 300, Rocker, Waller Chemical Thailand Co., Ltd., Thailand) พร้อมตัวกรอง
2. วางกระดาษกรองขนาด 0.025 µm MCE filter membranes ลงบนบุชเนอร์ ตามด้วยกระดาษกรอง 0.45 µm Nylon Filter Membrane วางด้านบน ทำให้เปียกด้วยน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยเปิดปั๊มดูดอากาศ
3. ค่อยๆ เทน้ำตัวอย่างที่ mix ลงบนกรวยกรองบุชเนอร์ ใช้ forceps คีบกระดาษกรองออกทุกครั้งแทนการใช้มือจับ

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างน้ำ

1. น้ำกระดาษกรองทำการเติม lysis buffer 400 µl 8 ครั้ง เพื่อไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์แตก จากนั้นทำการ Vortex จนกว่าตะกอนเซลล์ไม่เกาะเป็นก้อน lysozyme Solid (50 mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที
2. เติม proteinase K (20 mg/ml) 100 µl 8 ครั้ง ทำการ Vortex เพื่อย่อยโปรตีน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
4. จากนั้นเติม 5M potassium acetate 400 µl 8 ครั้ง เพื่อตกตะกอนโปรตีน ทำการ mix โดย invert แช่ ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีน นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 xg อุณหภูมิองศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. ทำการดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (1 volume) 500 ul (25:24:1) ให้แยกไขมันและโปรตีนที่เหลืออยู่ออกมา เป็นอัตราส่วน 1:1

ให้เท่ากับส่วน ใสที่ดูดออกทำการ invert ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศา เป็นเวลา10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ 500 ul

6. เติม Isopropanol 500 µl (1 volume)
7. mix Invert ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg 10 นาที
8. เทส่วนใสทิ้ง
9. เติม 70% ethanol 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg 1 นาที ทำการเทส่วนใสทิ้ง
10. Air-dryตากทิ้งไว้ 30 นาที
11. เติม TE buffer 35 µl เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
12. เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน

ขั้นตอนการทำ Metagenomic

1. ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด น้ำธรรมชาติจากห้วยนาปอย น้ำประปาจากตำบลแม่กา น้ำธรรมชาติจากกว๊านพะเยา น้ำประปาจากอำเภอเมืองพะเยาทั้งหมด 5 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดย shotgun metagenomic sequencing
2. ดีเอ็นเอที่สกัดได้แสดงถึงไวรัสทั้งหมดในน้ำและตัวอย่างเลือดทั้งหมด ใช้ Agilent 2100
3. ตรวจสอบ sufficient target DNA นี้เป็นชุดของ range ของ repairing สำหรับเชื่อมต่อกับ sequencing adapters
4. ใช้ขั้นตอนการเพิ่มของ PCR produce a library หลังจากการ sequencing performed โดยใช้ paired end อ่าน sequencing โดยใช้ platform Illumina

ขั้นตอนทำ Polymerase chain reaction (PCR)

Human bata globin

การทดลองครั้งนี้จะใช้ primer เพื่อตรวจหา *human beta–globin gene* ซึ่งเป็น housekeeping gene ของมนุษย์ เพื่อตรวจหา *human beta–globin* gene

ตาราง 2 การเตรียมสารในการทำ PCR Master Mix โดยใช้ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia และใช้ gene *human beta globin,* Primer PCO_4 /GH_2O 268 bp

***PCO_4 /GH_2O* Primer**	**20 µl**	**15 µl**
1. 5xFiREPOL Master mix	4 µl	3 µl
2. 10 µM Forward primer *PCO_4*	0.4 µl	0.3 µl
3. 10 µM Reverse Primer *GH_2O*	0.4 µl	0.3 µl
4. DNA templates	4 µl	3 µl
5. Add DW	11.2 µl	8.4 µl
Total	20 µl	15 µl

เมื่อเตรียมสารเสร็จ เขย่าให้สารเข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ในหลอด PCR tube หลอดละ 12 µl แล้วเติม DNA template 3 µl ในแต่ละหลอดใส่ในเครื่อง PCR (Thermo cyclers) และตั้งอุณหภูมิการทำงานของ PCR

ตาราง 3 การตั้งค่าโปรแกรมทำงาน PCR *human bata globin* gene ขนาด 268 bp

	Team (°C)	**Time (min)**	**Cycle**
Initial denaturation	94	2 min	
Denaturation	94	1 min	35
Annealing	58.5	1 min	
Elongation	72	1 min	
Final elongation	72	5 min	

หลังจากเครื่องทำงานเสร็จ นำตัวอย่างไปรันเจลด้วยเครื่องอิเล็กโตรโพซิล (run agarose gel electrophoresis)

HPV (GP5 $^{+}$/GP6 $^{+}$)

ตาราง 4 การเตรียมสารในการทำ PCR HPV DNA โดยใช้ PCR Master Mix ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia และใช้ primer GP5^{+}/GP6^{+} ขนาด 154 bp

PCR GP5 $^{+}$/GP6 $^{+}$	20 µl	15 µl
1. 5xFiREPOL Master mix	4 µl	3 µl
2. 10 µM Forward primer GP5 $^{+}$	0.4 µl	0.4 µl
3. 10 µM Reverse Primer GP6 $^{+}$	0.4 µl	0.4 µl
4. DNA templates	4 µl	3 µl
5. Add DW	11.2 µl	8.2 µl
Total	20 µl	15 µl

เมื่อเตรียมสารเสร็จ เขย่าให้สารเข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ในหลอด PCR tube หลอดละ 12 ไมโครลิตร แล้วเติม DNA template 3 ไมโครลิตร นำหลอด PCR tube แต่ละหลอดใส่ในเครื่อง PCR (Thermo cyclers) และตั้งอุณหภูมิการทำงานของ PCR

ตาราง 5 การตั้งค่าโปรแกรมทำงาน PCR HPV DNA โดยใช้ primer GP5^{+}/GP6^{+} ขนาด 154 bp

	Team (°C)	Time (min)	Cycle
Initial denaturation	94	5	
Denaturation	94	1	
Annealing	42	1	40
Elongation	72	1	
Final elongation	72	5	

หลังจากเครื่องทำงานเสร็จ นำตัวอย่างไปรันเจลด้วยเครื่องอิเล็กโตรโพซิล (run agarose gel electrophoresis)

***EBNA2* gene**

ตาราง 6 การเตรียมสารในการทำ PCR EBV (EBNA 2 gene) โดยใช้ PCR Master Mix ยี่ห้อ Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia ขนาด 219 bp

PCR *EBNA 2*	20 µl	15 µl
1. 5x Master mix	4 µl	3 µl
2. 10 µM Forward primer *EBNA2*	0.4 µl	0.3 µl
3. 10 µM Reverse primer *EBNA2*	0.4 µl	0.3 µl
4. DNA templates	4 µl	3 µl
5. Add DW	11.2 µl	8.4 µl
Total	20 µl	15 µl

เมื่อเตรียมสารเสร็จ เขย่าให้สารเข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ในหลอด PCR tube หลอดละ 12 ไมโครลิตร แล้วเติม DNA template 3 ไมโครลิตร นำหลอด PCR tube แต่ละหลอดใส่ในเครื่อง PCR (Thermo cyclers) และตั้งอุณหภูมิการทำงานของ PCR

ตาราง 7 การตั้งค่าโปรแกรมทำงาน PCR EBNA 2 ขนาด 219 bp

	Team (°C)	Time (min)	Cycle
Initial denaturation	95	5 min	
Denaturation	95	1	40
Annealing	58	1	
Elongation	72	1	
Final elongation	72	5	

หลังจากเครื่องทำงานเสร็จ นำตัวอย่างไปรันเจลด้วยเครื่องอิเล็กโตรโพซิล (run agarose gel electrophoresis) และ ทำการรันเจลเสร็จนำเจลไปถ่ายรูป โดยใช้เครื่องถ่ายรูปเจล (Gel documentation) วิเคราะห์สถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS Pearson's chi-square test P <0.05 significant

วิธีการทำ Real time PCR

***EBNA1 (PQ_3/PQ_4)* gene**

ตาราง 8 การเตรียมสารในการทำ Real time PCR EBV EBNA1 gene DNA โดยใช้ ยี่ห้อ (Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia และใช้ PQ_3 และ PQ_4 primer

Real time PCR	20 µl	10 µl
1. 5x FiREPOL Eva Green qPCR Mix Plus	4 µl	2 µl
2. 10 µM Forward primer *PQ_3*	0.4 µl	0.25 µl
3. 10 µM Reverse primer *PQ_4*	0.4 µl	0.25 µl
5. DNA templates	4 µl	2 µl
6. Add DW	11.2 µl	5.5 µl
Total	20 µl	10 µl

เมื่อเตรียมสารเสร็จ เขย่าให้สารเข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ PCR Micro plates หลอดละ 12 ไมโครลิตร เติม DNA template 3 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม นำไปปั่นเหวี่ยง และใส่ในเครื่อง Real time PCR ตั้งอุณหภูมิ ตั้งการทำงานของเครื่องจากนั้นเริ่มทำงาน

ตาราง 9 การตั้งค่าอุณหภูมิของ Real time PCRหลังจากเครื่องทำงานเสร็จ โปรแกรมจะแสดงกราฟและค่า melting curve

	Team (°C)	Time (min)	Cycle
Initial activation	95	12 min	
Denaturation	95	15 sec	40
Annealing/elongation	60	30 sec	
melting temperature	65–95	5 s/set	

***EBNA2* gene**

ตาราง 10 การเตรียมสารในการทำ Real time PCR EBV DNA (EBNA2 gene) โดยใช้ยี่ห้อ (Solis Bio Dyne, Tartu, Estonia ขนาด 219 bp

	Team (˚C)	Time (min)	Cycle
Initial activation	95	12 min	
Denaturation	95	15 sec	40
Annealing/elongation	60	30 sec	
melting temperature	65–95	5 s/set	

เมื่อเตรียมสารเสร็จ เขย่าให้สารเข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ PCR Micro plates หลอดละ 12 ไมโครลิตร เติม DNA template 3 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม นำไปปั่นเหวี่ยง และใส่ในเครื่อง Real time PCR ตั้งอุณหภูมิ ตั้งการทำงานของเครื่องจากนั้นเริ่มทำงาน

ตาราง 11 การตั้งค่าอุณหภูมิของ Real time PCRหลังจากเครื่องทำงานเสร็จ โปรแกรมจะแสดงกราฟและค่า melting curve

Real time PCR	10 µl	10 µl
1. 5x FiREPOL Eva Green qPCR Mix Plus	4 µl	2 µl
2. 10 µM Forward primer *EBNA2*	0.4 µl	0.25 µl
3. 10 µM Reverse primer *EBNA2*	0.4 µl	0.25 µl
4.DNA templates	4 µl	2 µl
5. Add DW	11.2 µl	5.5 µl
Total	20 µl	10 µl

วิเคราะห์สถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS Pearson's chi-square test P <0.05 significant

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

จากการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำประปาจากแม่กา และตำบลเวียง อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยานำมาวิเคราะห์ทาง Physical, Chemical, Microbiological และ Chemical poison ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำประปา การประปาส่วนภูมิภาค ในการตรวจวัดด้าน Physical มีเกณฑ์การประเมินได้แก่ Color Turbidity และ pH ด้าน Chemical มีเกณฑ์การประเมินได้แก่ Total dissolved solid, Iron (Fe) , Manganese (Mn), Copper (Cu), Zine (Zn), Total Hardness, (as CaCO3), Sulphate (as SO_4^{2-}), Chloride, Fluoride, Nitrate และ Nitrite ด้าน Microbiological มีเกณฑ์การประเมินได้แก่ Total Coliform Bacteria และ *Escherichia coli* และ ด้าน Chemical poison มีเกณฑ์การประเมินได้แก่ Mercury (Hg), Lead (Pb), Arsenic (As), Chromium (Cr) และ Cadmium (Cd)

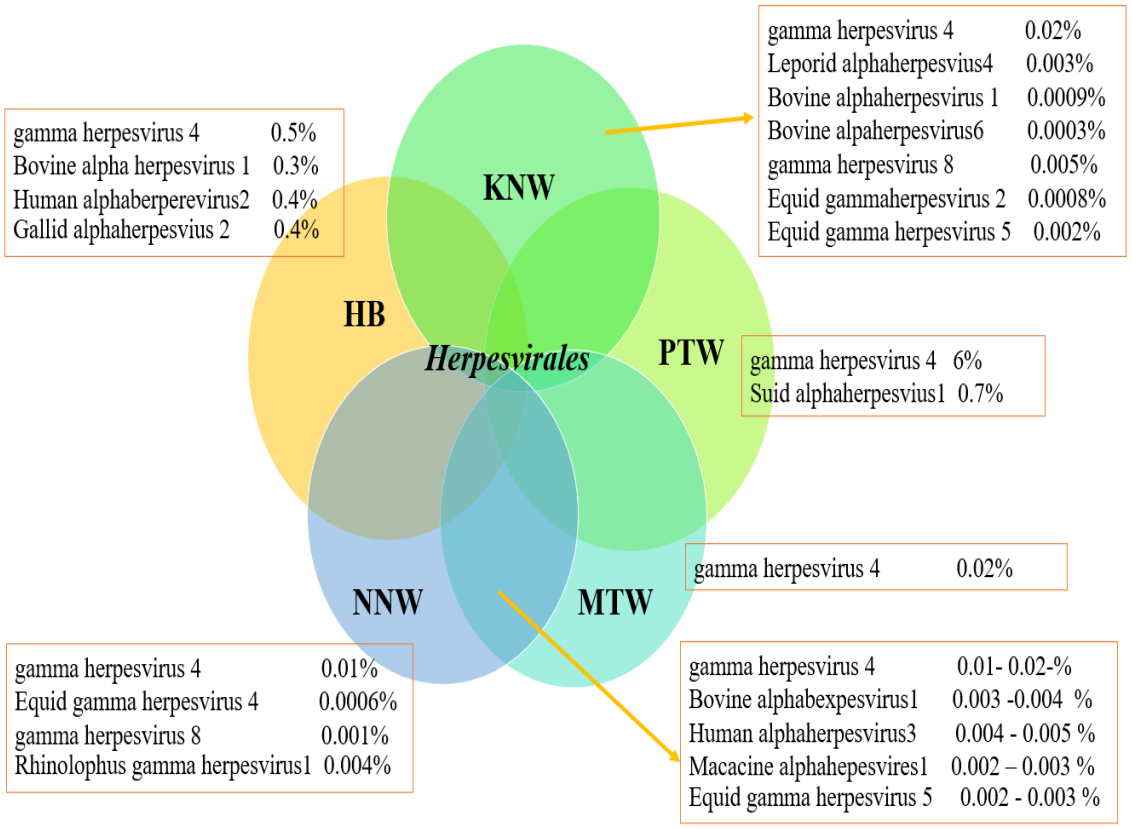
จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างจากแหล่งน้ำประปาจากแม่กามีค่า มี Fe 0.33 mg/L, Mn 0.135 mg/L มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน การวิเคราะห์ทาง Chemical และ Microbiological ของน้ำประปาจากตำบลเวียงพบว่ามี ความขุ่นมองเห็นได้ด้วยตาสูงกว่าค่ามาตรฐานในแหล่งน้ำจากประปาแม่กา และ Total Coliform Bacteria จากแหล่งน้ำทั้ง 2 แหล่งซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ผลลัพธ์แสดงในตาราง

ตาราง 12 ผลตรวจวิเคราะห์คุณภาพ turbidity, color, pH, และ trace elements ของน้ำประปา

	test item	Standard	น้ำประปา ต.แม่กา	น้ำประปา อ.เมือง	Unit
Physical	Color	15	0.48	0.7	Pt-Co unit
	Turbidity	5	17.235	1.575	NTU
	pH	6.5-8.5	7.97	7.63	
Chemical	Total dissolved solid	1000	205	135.75	Mg/L
	Iron (Fe)	0.3	0.33	0.062	Mg/L
	Manganese (Mn)	0.1	0.135	0.0295	Mg/L
	Copper (Cu)	2.0	0.0095	0.003	Mg/L
	Zine (Zn)	3.0	0.018	0.010	Mg/L
	Total Hardness (as CaCO3)	300	99.5	71	Mg/L
	Sulphate (as SO_4^{2-})		6.525	12.695	Mg/L
	Chloride	250	Not Detected	16.715	Mg/L
	Fluoride	1.5	0.24	0.34	Mg/L
	Nitrate	50	1.77	Not Detected	Mg/L
	Nitrite	3	Not Detected	Not Detected	Mg/L
Microbiological	Total Coliform Bacteria	-	23	1.1	MPN-100mL
	Escherichia coli	-	Detected	Not Detected	In 100 mL
Chemical	Mercury (Hg)	1	Not Detected	Not Detected	Mg/L
poison	Lead (Pb)	10	0.0010	Not Detected	Mg/L
	Arsenic (As)	10	0.00185	0.0011	Mg/L
	Chromium (Cr)	50	Not Detected	Not Detected	Mg/L
	Cadmium (Cd)	3	Not Detected	Not Detected	Mg/L

ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากห้วยนาปอย ตัวอย่างน้ำประปาจากตำบลแม่กา ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากกว๊านพะเยา ตัวอย่างน้ำประปาจากอำเภอเมืองพะเยา และตัวอย่างเลือดทั้งหมด 5 ตัวอย่างวิเคราะห์โดย shotgun metagenomic sequencing แสดงให้เห็นว่ามีดีเอ็นเอแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในตัวอย่างน้ำทั้งหมดเช่น *Escherichia coli, Salmonella enteritis, Salmonella spp. และStaphylococcus aureus* เป็นต้น ในตัวอย่างเลือด (HB) พบ *Ortervir*ales Order *Retroviridae* คิดเป็น 72% ของไวรัสทั้งหมดและพบ *Herpesviales* 20% ในตัวอย่างน้ำ

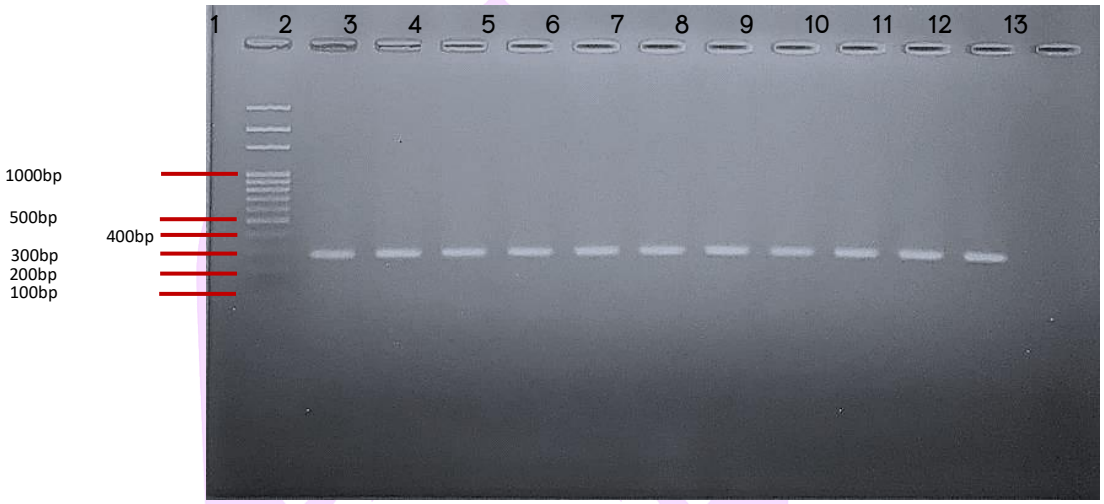
พบ *gamma herpesvirus 4* ทั้งในตัวอย่างเลือดและตัวอย่างน้ำทั้งหมด 0.01–6% นอกจากนี้ยังพบ Species *Equid gamma herpesvirus 5* ในตัวอย่างน้ำของกว๊านพะเยา (KNW) ตัวอย่างน้ำห้วยนาปอย (NNW) และตัวอย่างน้ำประปาจากแม่กา (MTW) 0.002–0.003%



ภาพ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ Metagenomics ของ Herpesvirales ใน human blood และ ตัวอย่างน้ำทั้งหมดแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ (%): (HB) ตัวอย่างเลือด, (KNW) น้ำกว๊านพะเยา, (PTW) น้ำประปาพะเยา, (MTW) น้ำประประปาแม่กา, (NNW) น้ำธรรมชาติห้วยนาปอย

ผลการทำพีซีอาร์ของการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

ผลการ run gel electrophoresis PCR *GH_2O* forward primer และ *PCO_4* reverse primer ขนาด product 268 bp จากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจำนวน 813 ตัวอย่าง พบ DNA 813 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (100%) ของตัวอย่าง



ภาพ 12 การ run gel electrophoresis PCR *GH_2O* Forward primer และ *PCO_4* Reverse primer ขนาด PCR product 268 bp ตัวอย่างเลือด (ดีเอ็นเอ 3 µl)

Lane 1 Marker 100 bp 6 µl

Lane 2 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 (บวก)

Lane 3 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 (บวก)

Lane 4 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 3 (บวก)

Lane 5 ตัวอย่างเดีเอ็นเอ 4 (บวก)

Lane 6 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 5 (บวก)

Lane 7 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 6 (บวก)

Lane 8 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 7 (บวก)

Lane 9 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 8 (บวก)

Lane 10 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 9 (บวก)

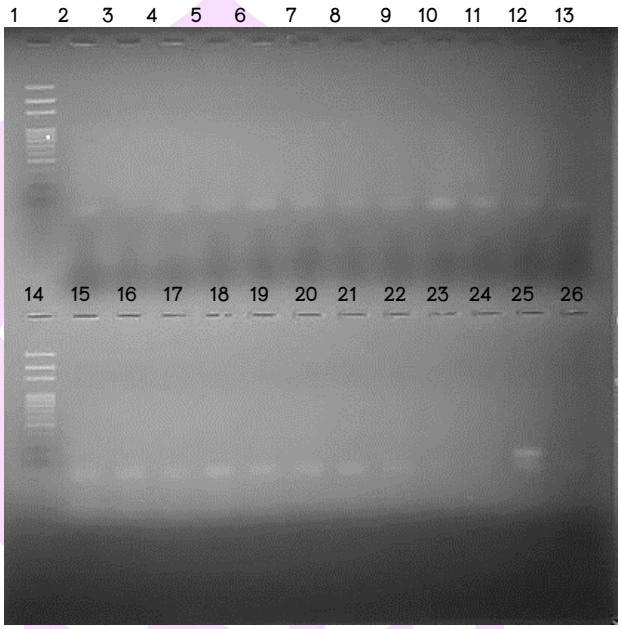
Lane 11 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 10 (บวก)

Lane 12 ตัวอย่างดีเอ็นเอ 11 (บวก)

Lane 13 Negative

การทำพีซีอาร์ของ *Human Papillomavirus* (HPV) GP5^{+} Forward และ GP6^{+} Reverse

ผลการ Run gel electrophoresis จากการทำ PCR HPV gene โดยนำเอาดีเอ็นเอที่นำไปทำ PCR (GH_2O, PCO_4) มาทำ PCR (GP5^{+}/6^{+}) เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ HPV ทั้งหมด 813 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ HPV 0 ราย คิดเป็น 0% ของตัวอย่าง

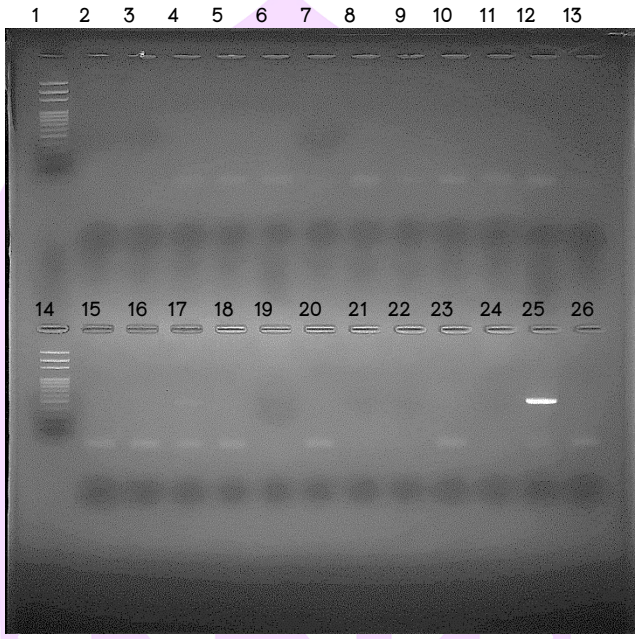


ภาพ 13 ผลการ run Gel electrophoresis PCR Primer GP5^{+}/GP6^{+} ขนาด PCR Product 154 bp (DNA 3 µl) ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ E1–22

Lane 1 Marker 6 µl
Lane 2 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E1 (ลบ)
Lane 3 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E2 (ลบ)
Lane 4 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E3 (ลบ)
Lane 5 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E4 (ลบ)
Lane 6 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E5 (ลบ)
Lane 7 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E6 (ลบ)
Lane 8 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E7 (ลบ)
Lane 9 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E8 (ลบ)
Lane 10 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E9 (ลบ)
Lane 11 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E10 (ลบ)
Lane 12 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E11 (ลบ)
Lane 13 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E12 (ลบ)
Lane 14 Marker 6 µl
Lane 15 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E13 (ลบ)
Lane 16 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E14 (ลบ)
Lane 17 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F15 (ลบ)
Lane 18 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F16 (ลบ)
Lane 19 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F17 (ลบ)
Lane 20 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F18 (ลบ)
Lane 21 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F19 (ลบ)
Lane 22 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F20 (ลบ)
Lane 23 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F21 (ลบ)
Lane 24 ตัวอย่างดีเอ็นเอ F22 (ลบ)
Lane 25 Positive Caski
Lane 26 Negative

การทำ PCR ของ Epstein–Barr virus (EBV) *EBNA2* gene

ผลการ Run gel electrophoresis จากการทำ PCR HPV gene โดยนำเอาดีเอ็นเอที่นำไปทำ PCR (*GH2O,PCO4*) มาทำ PCR *EBNA2* forward reverse primer เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ EBV ทั้งหมด 813 ตัวอย่าง อยู่ 7/813 ราย คิดเป็น 0.86% ของตัวอย่าง



ภาพ 14 ผลการ run Gel electrophoresis PCR primer EBNA 2 **ขนาด** PCR product 219 bp (DNA 3 µl) **ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ** G168–189

Lane 1 Marker 6 µl
Lane 2 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E168 (ลบ)
Lane 3 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E169 (บวก)
Lane 4 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E170 (ลบ)
Lane 5 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E171 (ลบ)
Lane 6 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E172 (บวก)
Lane 7 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E173 (ลบ)
Lane 8 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E174 (ลบ)
Lane 9 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E175 (ลบ)
Lane 10 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E176 (ลบ)
Lane 11 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E177(ลบ)
Lane 12 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E178 (บวก)
Lane 13 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E179 (ลบ
Lane 14 Marker 6 µl
Lane 15 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E180 (ลบ)
Lane 16 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E181(ลบ)
Lane 17 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E182 (บวก)
Lane 18 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E183 (ลบ)
Lane 19 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E184(ลบ)
Lane 20 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E185 (ลบ)
Lane 21 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E186(ลบ)
Lane 22 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E187 (ลบ)
Lane 23 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E188 (ลบ)
Lane 24 ตัวอย่างดีเอ็นเอ E189 (ลบ)
Lane 25 Positive B95
Lane 26 Negativ

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ PCR EBNA2 ขนาด 219 bp โดยใช้การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS Pearson's chi-square test P <0.05 significant พบว่าเพศชายพบการติดเชื้อ 1/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.12 และเพศหญิงพบการติดเชื้อ EBV 6/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.03 (p-value=0.405) จากข้อมูลในตาราง พบปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ EBV ได้แก่ โรคประจำตัว Congenital disease (p-value=0.042) ดังตาราง

ตาราง 13 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลการทำ PCR EBNA2 ขนาด 219 bp

Demographical factors	EBV PCR *EBNA2* 219 bp		*P*-value
	Positive	Negative	
Sex			
Male	1(0.12)	230(99.57)	0.405
Female	6(1.03)	576(98.96)	
Mean Age			
1-10	0(0)	21(100)	0.082
1-20	0(0)	57(100)	
21-30	0(0)	52(100)	
31-40	0(0)	52(100)	
41-50	4(3.36)	115(96.64)	
51-60	3(1.51)	196(98.49)	
61-70	0(0)	216(100)	
71-80	0(0)	77(100)	
81-90	0(0)	20(100)	
Congenital disease			
Yes	6(1.55)	380(98.45)	0.042
No	1(0.23)	426(99.76)	
Family history of cancer			
Yes	3(1.63)	181(93.37)	0.199
No	4(0.64)	625(99.36)	
exercise >30 min			

Demographical factors	EBV PCR *EBNA2* 219 bp		*P*-value
	Positive	Negative	
No	1(0.63)	159(99.38)	0.718
1–7 times a week	6(0.92)	647(99.08)	
source of drinking water (boiled or filter)			
Yes	7(1.31)	529(98.69)	0.056
No	0(0)	277(100)	
Source of drinking water (bottled water)			
Yes	7(0.93)	743(99.07)	0.441
No	0(0)	63(100)	
clean of water for consumer–consume			
clean enough	5(0.73)	679(99.27)	0.356
unclean	2(1.55)	127(98.45)	
tap of water for brushing teeth			
Yes	5(0.72)	693(99.28)	0.271
No	2(1.73)	113(98.26)	
Alcohol consumption			
Yes	5(1.63)	302(98.37)	0.065
No	2(0.40)	504(99.60)	
type of alcohol			
beer	2(0.91)	217(99.09)	0.277
alcohol	2(2.56)	76(96.20)	
serving spoon.			
No	2(1.56)	126(98.44)	0.349
1–7 times a week	5(0.73)	680(99.27)	
Smoking			
Yes	2(1.65)	119(98.35)	
No	5(0.72)	687(99.27)	0.307
Secondhand smoke			
Yes	2(1.78)	168(98.82)	0.617
No	5(0.78)	638(99.22)	

Demographical factors	EBV PCR *EBNA2* 219 bp		*P*-value
	Positive	Negative	
Eat fresh fruit			
No	0(0)	31(100)	0.216
1–2 times a week	2(2.41)	81(97.59)	
3–4 times a week	0(0)	200(100)	
5–7 times a week	5(1.00)	494(98.99)	
eat vegetables.			
No	0(0)	35(100)	0.113
1–2 times a week	2(3.39)	57(96.61)	
3–4 times a week	0(0)	143(100)	
5–7 times a week	5(0.87)	571(99.13)	

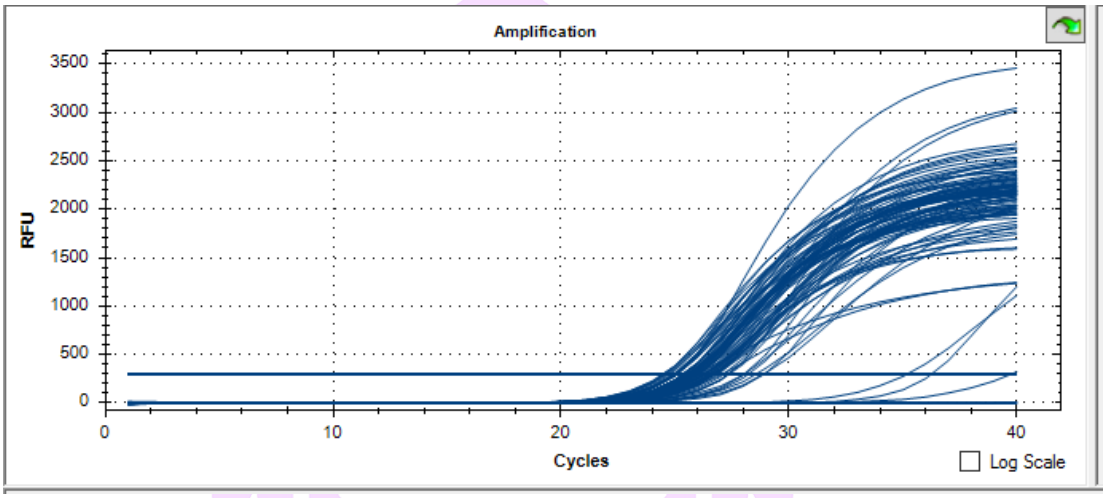
ตาราง 14 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด

Demographical factors	*EBNA2* PCR 219 bp			
	P-value	Odds Ratio	95% CI	
			Lower	Upper
Congenital disease	0.042	6.726	0.86	56.123
Family history of cancer	0.199	2.590	0.574	11.677
Bottled drinking water	0.441	1.009	1.002	1.016
Water for brushing teeth	0.271	2.453	0.470	12.797
Alcohol consumption	0.065	4.172	0.804	21.638
Serving spoon	0.349	2.159	0.414	11.250
Smoking	0.307	2.309	0.443	12.040
Secondhand smoke	0.617	1.519	0.292	7.899
BMI	0.419	0.543	0.121	2.443
Not eating fresh fruit	0.609	1.009	1.002	1.016

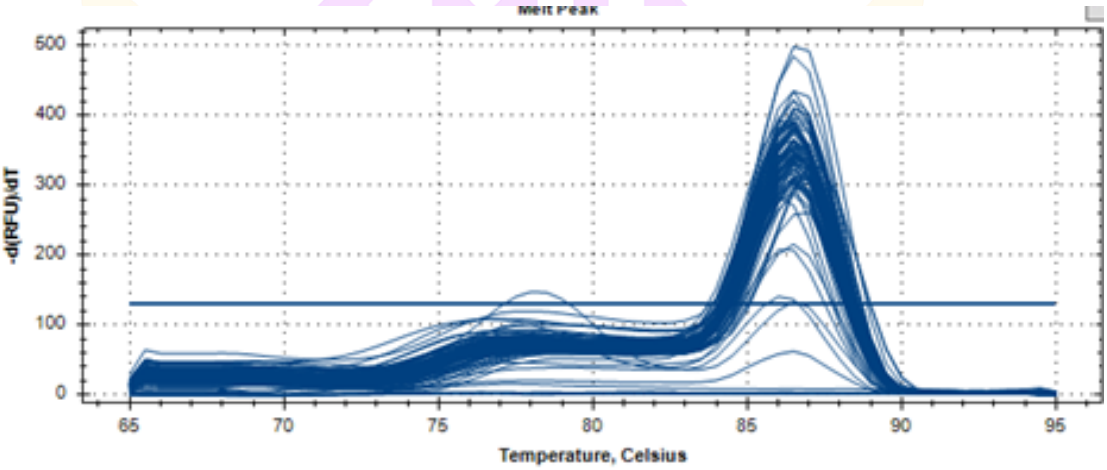
Real time polymerase chain reaction

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Realtime PCR *EBNA1* ขนาด 213 bp และ *EBNA2* ขนาด 219 bp

กราฟค่าแสดง amplification Curve ของ Positive และ Negative

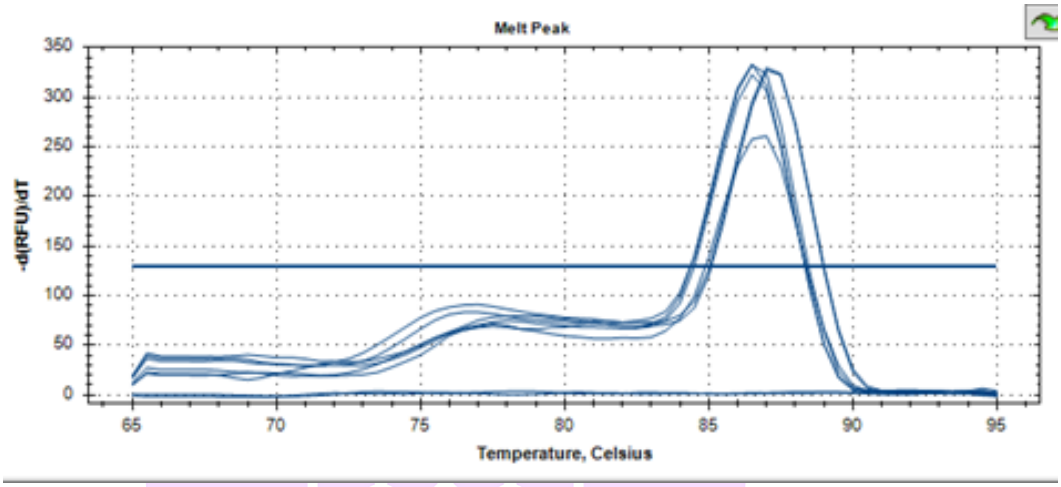


ภาพ 15 กราฟแสดงค่า amplification และพิจารณาค่า Ct ของ Positive = 23.58 และค่า ของ Negative = 19.85



ภาพ 16 กราฟแสดงค่า Melt Curve และพิจารณาค่า (Tm) ของ Positive = 82.50 และ Melt Curve (Tm) ของ Negative = None หรือ 75.50

กราฟค่าแสดง Melt Curve ของ Sample



ภาพ 17 กราฟแสดงค่า Melt Curve และพิจารณาค่า (Tm) ของ sample มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 82.50

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Real time PCR *EBNA1* ขนาด 213 bp โดยใช้การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS Pearson's chi-square test P <0.05 significant พบว่าเพศชายพบการติดเชื้อ 17/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.36 และเพศหญิงพบการติดเชื้อ EBV 36/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.19 (p-value=0.514) พบปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ EBV ได้แก่ อายุ (p-value=0.005) ช่วงอายุ (p-value=0.006) การใช้น้ำประปาแปรงฟัน (p-value=0.025) การดื่มแอลกอฮอล์ (p-value=0.003) และ การรับประทานผลไม้ (p-value=0.021) ดังตาราง

ตาราง 15 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Real time PCR EBNA1 ขนาด 213 bp

Demographical factors	*EBNA1* 213 bp Real time PCR		
	Positive	Negative	*P*-value
Sex			
Male	17(7.36)	214(96.64)	0.541
Female	36(6.19)	546(93.81)	
Mean Age			
1-10	0(0)	21(100)	0.006
1-20	7(12.28)	50(12.28)	
21-30	5(9.62)	47(8.06)	
31-40	5(9.62)	47(8.06)	
41-50	15(12.61)	104(87.39)	
51-60	12(6.03)	187(93.96)	
61-70	5(2.31)	211(97.69)	
71-80	4(5.19)	73(94.81)	
81-90	0(0)	20(100)	
Congenital disease			
Yes	20(5.18)	366(94.81)	0.142
No	33(7.773)	394(92.27)	
Family history of cancer			
Yes	12(6.52)	172(93.48)	0.999
No	41(6.52)	588(93.48)	
exercise >30 min			
No	12(7.5)	148(92.5)	0.575
1-7 times a week	41(6.27)	612(93.72)	
source of drinking water (boiled or filter)			
Yes	36(6.72)	500(93.28)	0.751
No	17(6.13)	260(93.86)	
Source of drinking water (bottled water)			
Yes	45(6.00)	705(94.00)	0.039
No	8(12.70)	55(87.30)	
clean of water for consumer-consume			
clean enough	43(6.29)	641(93.71)	0.536
unclean	10(7.75)	119(92.25)	

Demographical factors	*EBNA1* 213 bp Real time PCR		
	Positive	Negative	*P*-value
Yes	40(5.73)	658(67.98)	0.025
No	13(11.30)	102(88.97)	
Alcohol consumption			
Yes	30(9.77)	277(54.64)	0.003
No	23(4.55)	483(95.27)	
type of alcohol			
beer	14(6.39)	205(93.61)	0.445
alcohol	7(8.97)	71(91.03)	
serving spoon.			
No	10(7.81)	118(92.19)	0.518
1-7 times a week	43(6.28)	642(93.72)	
Smoking			
Yes	11(9.09)	110(90.90)	
No	42(6.07)	650(93.93)	0.214
Secondhand smoke			
Yes	15(8.82)	155(91.78)	0.171
No	38(5.91)	605(94.09)	
Eat fresh fruit			
No	6(19.35)	25(80.65)	0.021
1-2 times a week	5(6.02)	78(93.98)	
3-4 times a week	15(7.5)	185(92.5)	
5-7 times a week	27(5.41)	472(94.59)	
eat vegetables.			
No	3(8.57)	32(91.43)	0.171
1-2 times a week	3(5.08)	56(94.92)	
3-4 times a week	15(10.56)	128(89.51)	
5-7 times a week	32(5.56)	544(94.44)	

ตาราง 16 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด

Demographical factors	*EBNA1* Real time PCR			
	P-value	Odds Ratio	95% CI	
			Lower	Upper
Congenital disease	0.142	0.652	0.368	1.158
Family history of cancer	0.999	1.001	0.514	1.946
Bottled drinking water	0.039	2.279	1.023	5.074
Water for brushing teeth	0.025	2.097	1.084	4.055
Alcohol consumption	0.003	2.274	1.295	3.993
Serving spoon	0.518	1.265	0.619	2.588
Smoking	0.214	1.548	0.773	3.098
Secondhand smoke	0.171	1.541	0.826	2.873
BMI	0.256	1.406	0.780	2.534
Not eating fresh fruit	0.002	4.091	1.589	10.531

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Realtime PCR *EBNA2* ขนาด 219 bp โดยใช้การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS Pearson's chi-square test P <0.05 significant พบว่าเพศชายพบการติดเชื้อ 17/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.36 และเพศหญิงพบการติดเชื้อ EBV 36/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.19 (*p*-value=0.514) พบปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ EBV ได้แก่ คนที่มีโรคประจำตัว (*p*-value=0.019) คนในครอบครัวเคยเป็นมะเร็ง(*p*-value=0.010) ประเภทของแอลกอฮอล์ (*p*-value=0.017) และการสูบควันบุหรี่ (*p*-value=0.000)

ตาราง 17 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ Real time PCR EBNA2 ขนาด 219 bp

Demographical factors	*EBNA2* 219 bp Real time PCR		*P*-value
	Positive	Negative	
Sex			
Male	1(0.12)	230(99.57)	0.522
Female	5(0.86)	577(99.14)	
Mean Age			
1-10	0(0)	21(100)	0.161
1-20	0(0)	57(100)	
21-30	2(3.85)	50(96.15)	
31-40	0(0)	52(100)	
41-50	2(1.68)	117(1.68)	
51-60	2(1.01)	197(1.01)	
61-70	0(0)	216(100)	
71-80	0(0)	77(100)	
81-90	0(0)	20(100)	
Congenital disease			
Yes	0(0)	386(100)	0.019
No	6(1.41)	421(98.59)	
Family history of cancer			
Yes	4(2.17)	180(97.82)	0.010
No	2(0.32)	627(99.68)	
exercise >30 min			
No	0(0)	160(100)	0.224
1-7 times a week	6(0.92)	647(99.08)	
source of drinking water (boiled or filter)			
Yes	3(0.56)	533(99.44)	0.409
No	3(1.08)	274(98.92)	
Source of drinking water (bottled water)			
Yes	6(0.8)	744(99.2)	0.476
No	0(0)	63(100)	
clean of water for consumer-consume			
clean enough	4(0.58)	680(99.41)	0.240

Demographical factors	*EBNA2* 219 bp Real time PCR		*P*-value
	Positive	Negative	
unclean	2(1.55)	127(98.44)	
tap of water for brushing teeth			
Yes	4(0.57)	694(71.69)	0.176
No	2(1.73)	113(98.26)	
Yes	3(0.98)	304(99.02)	0.535
No	3(0.59)	503(99.41)	
type of alcohol			
beer	0(0.00)	219(100)	0.017
alcohol	2(2.56)	76(96.20)	
serving spoon.			
No	3(2.34)	125(97.66)	0.21
1-7 times a week	3(0.44)	682(99.56)	
Smoking			
Yes	2(1.65)	119(98.35)	
No	4(0.58)	688(98.57)	0.202
Secondhand smoke			
Yes	5(2.94)	165(97.06)	0.000
No	1(0.16)	642(99.84)	
Eat fresh fruit			
No	0(0)	31(100)	0.079
1-2 times a week	1(1.20)	82(98.75)	
3-4 times a week	4(2.04)	196(98)	
5-7 times a week	1(0.20)	498(99.80)	
eat vegetables.			
No	0(0)	35(100)	0.528
1-2 times a week	1(1.72)	58(98.31)	
3-4 times a week	2(1.39)	141(98.61)	
5-7 times a week	3(0.52)	573(99.48)	

ตาราง 18 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด

Demographical factors	*EBNA2* Realtime PCR			
	P–value	Odds Ratio	95% CI	
			Lower	Upper
Congenital disease	0.019	1.014	1.003	1.026
Family history of cancer	0.010	6.967	1.266	38.344
Bottled drinking water	0.476	1.008	1.002	1.015
Water for brushing teeth	0.176	3.071	0.556	16.961
Alcohol consumption	0.535	1.655	0.332	8.250
Serving spoon	0.021	5.456	1.089	27.340
Smoking	0.202	2.891	0.524	15.959
Secondhand smoke	0.000	19.455	2.257	167.657
BMI	0.661	1.4661	0.266	8.021
Not eating fresh fruit	0.636	1.008	1.002	1.014

ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ PCR *EBNA2, EBNA1* Real time PCR, *และ EBNA2* Real time PCR โดยใช้การวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS Pearson's chi-square test *P* <0.05 significant พบว่าเพศชายพบการติดเชื้อ 17/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.36 และเพศหญิงพบการติดเชื้อ EBV 42/813 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.22 (*p*–value=0.944) พบปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ EBV ได้แก่ อายุ (*p*–value=0.000) ช่วงอายุ (*p*–value=0.000) การดื่มแอลกอฮอล์ (*p*–value=0.000) การสูบควันบุหรี่ (*p*–value=0.011) และการรับประทานผลไม้ (*p*–value=0.019)

ตาราง 19 การเปรียบเทียบข้อมูลอาสาสมัครเทียบกับ EBV infection ผลจากการทำ PCR EBNA2 EBNA1 Real time PCR, และ EBNA2 Real time PCR

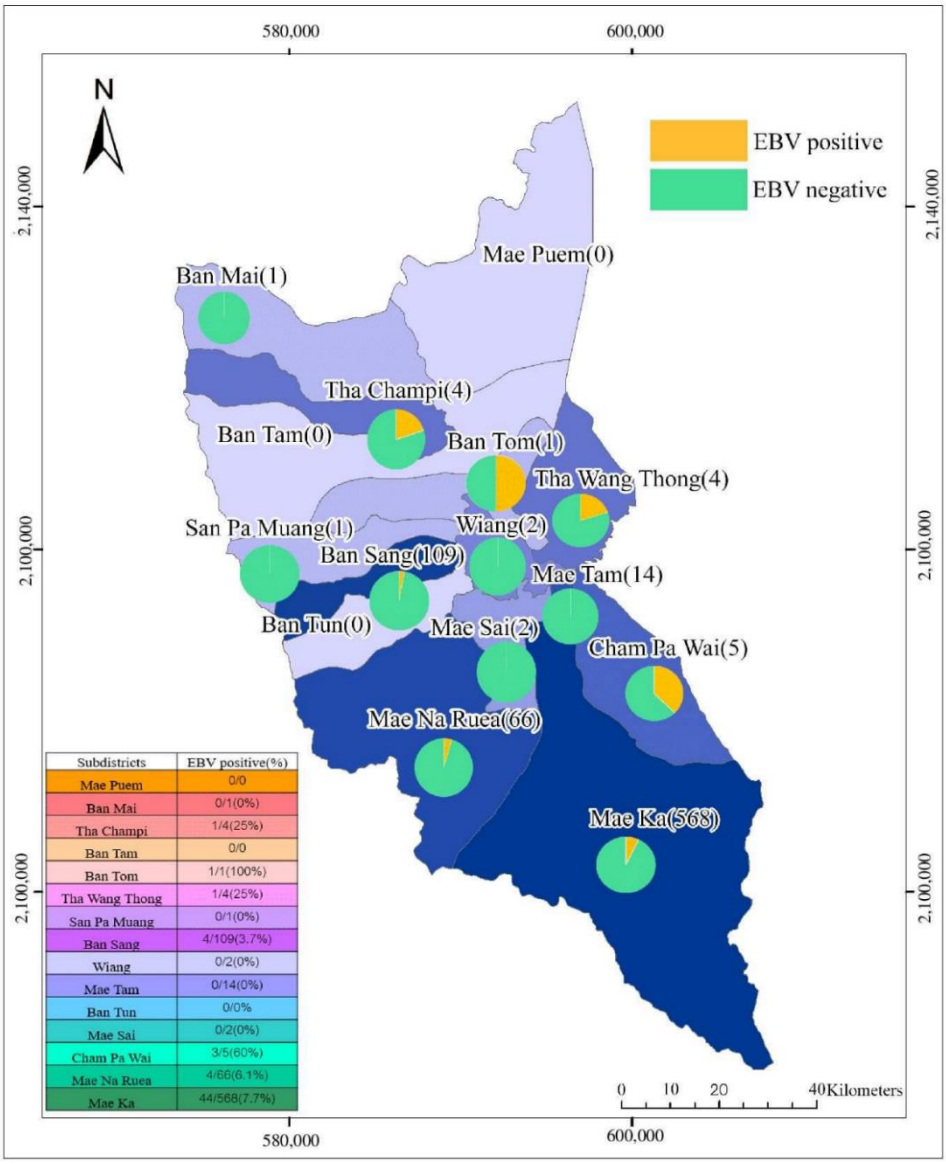
Demographical factors	ผลรวม *EBNA2* PCR, *EBNA1* และ *EBNA2 Real* time PCR		*P*–value
	Positive	Negative	
Sex			
Male	17 (7.36)	214 (92.64)	0.944
Female	42 (7.22)	540 (92.78)	
Age (years)			
Mean	44.37	52.61	0.000
SD	16.05	18.71	
Age groups (years)			
1–10	0 (0)	21 (100)	
11–20	7 (12.28)	50 (87.72)	
21–30	6 (11.54)	46 (88.46)	
31–40	5 (9.62)	47 (90.38)	
41–50	20 (16.81)	99 (83.19)	
51–60	15 (7.54)	184 (92.46)	
61–70	2 (0.93)	214 (99.07)	
71–80	4 (5.19)	73 (94.81)	
81–90	0 (0)	20 (100)	
Congenital disease			
Yes	23 (5.96)	363 (94.04)	0.175
No	36 (8.43)	391 (91.57)	
Family history of cancer			
Yes	16 (8.70)	168 (91.30)	0.392
No	43 (6.84)	586 (93.16)	
Exercise			
Yes	48 (7.35)	605 (92.65)	0.835
No	11 (6.87)	149 (93.13)	
Boiled/filtered drinking water			
Yes	41 (7.65)	495 (92.35)	0.549
No	18 (6.50)	259 (93.50)	

Demographical factors	ผลรวม *EBNA2* PCR, *EBNA1* และ *EBNA2 Real* time PCR		*P*–value
	Positive	Negative	
Bottled drinking water			
No	8 (12.70)	55 (87.30)	0.083
Yes	51 (6.80)	699 (93.20)	
Cleaning of water for consumption			
Yes	46 (6.73)	638 (93.27)	0.178
No	13 (10.08)	116 (89.92)	
Tap water used for brushing teeth			
No	14 (12.17)	101 (87.83)	0.028
Yes	45 (6.45)	653 (93.55)	
Alcohol consumption			
Yes	35 (11.40)	272 (88.60)	0.000
No	24 (4.74)	482 (95.26)	
Serving spoon			
No	13 (10.16)	115 (89.84)	0.168
Yes	46 (6.72)	639 (93.28)	
Smoking status			
Yes	13 (10.74)	108 (89.26)	0.109
No	46 (6.65)	646 (93.35)	
Secondhand smoke status			
Yes	20 (11.76)	150 (88.24)	0.011
No	39 (6.07)	604 (93.93)	
Eat fresh fruit (per week)			
No	6 (19.35)	25 (80.65)	0.019
1–2 times	8 (9.64)	75 (90.36)	
3–4 times	17 (8.50)	183 (91.50)	
5–7 times	28 (5.61)	471 (94.39)	
Eat vegetables (per week)			
No	3 (8.57)	32 (91.43)	0.236
1–2 times	6 (10.17)	53 (89.83)	
3–4 times	15 (10.49)	128 (89.51)	
5–7 times	35 (6.08)	541 (93.92)	

ตาราง 20 ประวัติการใช้ชีวิตประจำวันและปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อ EBV ในเลือด

Demographical factors	Total 3 methods			
	P-value	Odds Ratio	95% CI	
			Lower	Upper
Congenital disease	1.841	0.688	0.400	1.184
Family history of cancer	0.392	1.298	0.713	2.363
Bottled drinking water	0.083	1.994	0.901	4.411
Water for brushing teeth	0.028	2.011	1.066	3.797
Alcohol consumption	0.000	2.584	1.506	4.436
Serving spoon	0.168	1.570	0.822	2.999
Smoking	0.109	1.690	0.884	3.233
Secondhand smoke	0.011	2.065	1.170	3.644
BMI	0.342	1.308	0.751	2.278
Not eating fresh fruit	0.005	3.598	1.404	9.218

แผนที่แสดงการพบเชื้อ EBV DNA ในกระแสเลือด ในแต่ละตำบลในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา จากการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้อาสาสมัครจำนวน 813 ราย พบว่า ตำบลท่าจำปา พบ EBV positive 1/4 รายคิดเป็น 25% ตำบลบ้านต๋อม 1/1 ราย คิดเป็น 100% ตำบลท่าวังทอง 1/4 ราย คิดเป็น 25% ตำบลบ้านสาง 4/109 ราย คิดเป็น 3.7% ตำบลจำป่าหวาย 3/5 ราย คิดเป็น 60% ตำบลแม่นาเรือ 4/66 ราย คิดเป็น 6.1% และ ตำบลแม่กา 44/568 ราย คิดเป็น 7.7%



Subdistricts	EBV positive(%)
Mae Puem	0/0
Ban Mai	0/1(0%)
Tha Champi	1/4(25%)
Ban Tam	0/0
Ban Tom	1/1(100%)
Tha Wang Thong	1/4(25%)
San Pa Muang	0/1(0%)
Ban Sang	4/109(3.7%)
Wiang	0/2(0%)
Mae Tam	0/14(0%)
Ban Tun	0/0%
Mae Sai	0/2(0%)
Cham Pa Wai	3/5(60%)
Mae Na Ruea	4/66(6.1%)
Mae Ka	44/568(7.7%)

ภาพ 18 แผนที่แสดงการพบเชื้อ EBV ตำบลในเขตอำเภอเมืองในจังหวัดพะเยา

บทที่ 5

บทสรุป

อธิบายการทดลอง

ตัวอย่างจากแหล่งน้ำประปาจากตำบลแม่กา มีค่า มี Fe 0.33 mg/L, Mn 0.135 mg/L ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานตามที่ประปาส่วนภูมิภาคกำหนดการ จากการทดลองพบดีเอ็นเอของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Escherichia coli. Salmonella enteritis, Salmonella spp.* และ *Staphylococcus aureus* รวมถึงไวรัสก่อโรคเช่น *Herpesvirales.* การผลิตน้ำประปาจากแหล่งน้ำสกปรกอาจทำให้เกิดปัญหามากมาย ผู้ผลิตควรคำนึงถึงความปลอดภัยอย่างจริงจัง แม้ว่าแหล่งน้ำประปาจากห้วยนาปอยและกว๊านพะเยาจะไม่เหมาะสำหรับการดื่มกิน แต่ประชากรส่วนใหญ่ใช้น้ำประปาในการแปรงฟัน ล้างผักและผลไม้ หรือล้างจาน ซึ่งอาจเป็นช่องทางให้เกิดโรคจากแบคทีเรียและไวรัสได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษานี้พบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสอีบีวีจากแหล่งน้ำและเลือดของอาสาสมัครจากประชากรในเขตจังหวัดพะเยา

การศึกษาหาเชื้อเอชพีวีในเลือดจากผู้อาสามัคร อำเภอเมือง จังหวัดพะเยาจำนวน 813 ราย ไม่พบเชื้อเอชพีวี จากรายงานตรวจหาอีบีวีดีเอ็นเอใน PBMC จากผู้บริจาคโลหิตชาวชิลีที่มีสุขภาพดีจำนวน 207 ราย โดยวิธีพีซีอาร์ไพม์เมอร์ $GP5^{+}/6^{+}$ เอชพีวีตรวจพบ เอชพีวีดีเอ็นเอใน 6.8% (14/207) ของผู้บริจาคโลหิต ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของเอชพีวีมีอยู่ใน PBMC จากผู้บริจาคเลือดที่มีสุขภาพดีแต่ไม่ใช่ประชากรในจังหวัดพะเยา

การศึกษานี้พบอีบีวีดีเอ็นเอที่ก่อมะเร็งจากแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำประปา และตัวอย่างเลือดของมนุษย์มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์อ้างอิง *Human gamma herpesvirus 4* และอาจมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างอีบีวีก่อมะเร็งในน้ำกับเลือดของมนุษย์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเสี่ยงของอีบีวีก่อมะเร็งในน้ำที่อาจถ่ายทอดไปยังมนุษย์ได้

การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่กล่าวถึงความปลอดภัยของน้ำธรรมชาติ น้ำประปา และสุขภาพของชุมชนในจังหวัดพะเยาต่อการมีอยู่ของเชื้ออีบีวี ปัจจุบันโรคไม่ติดต่อคิดเป็น 71% ของการเสียชีวิตในประเทศไทย ตามมาด้วยโรคมะเร็ง (17%) ปัจจัยหลายอย่างรวมถึงไวรัสอาจทำให้เกิดโรคมะเร็งได้โดยน้ำอาจเป็นพาหนะในการแพร่เชื้อไวรัส โดยพบว่าไวรัสอาจรอดชีวิตในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วได้ จากการทดลองนี้พบไวรัสที่มีอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติและ

น้ำประปาในอำเภอเมืองของพะเยาโดยใช้เมตาโกโนมิกส์ ซึ่งอาจเป็นแนวทางบำบัดให้กับหน่วยงานสาธารณสุขและการประปาส่วนภูมิภาคในอนาคตได้

การศึกษานี้พบว่าบุคคลอายุระหว่าง 11–50 ปีมีแนวโน้มที่จะติดเชื้ออีบีวีมากที่สุด นอกจากนี้การติดเชื้ออีบีวีมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันของแต่ละคน ความชุกของอีบีวีแตกต่างกันไปตามวิธีการตรวจหาที่ใช้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการหรือยีนหลายวิธีในการตรวจหาอีบีวี การศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้ออีบีวีในเลือดต่ำ โดยปกติเชื้ออีบีวีมักแพร่กระจายไปยังโฮสต์อื่นอย่างมีประสิทธิภาพผ่านทางน้ำลาย เช่น การจูบ การใช้แก้วร่วมกัน และการไม่ใช้ช้อนหรือช้อนส้อม การศึกษานี้พบการติดเชื้ออีบีวีในเลือดน้อยในผู้ที่ใช้น้ำประปาในการแปรงฟัน และพบมากในผู้ที่ใช้น้ำจากแหล่งอื่น เช่นน้ำฝน น้ำบาดาลในการแปรงฟัน โดยจังหวัดพะเยาเป็นจังหวัดเล็ก ๆ ทำให้บางหมู่บ้านยังคงผลิตน้ำประปาใช้เอง มีการใช้น้ำฝนหรือน้ำบาดาลซึ่งไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้นคุณภาพน้ำอาจไม่ได้รับการควบคุมอย่างเหมาะสม และการสัมผัสกับเชื้อโรคผ่านทางน้ำอาจเป็นเรื่องที่น่ากังวลโดยขึ้นอยู่กับแหล่งน้ำที่นำมาใช้

การศึกษานี้พบว่าปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อายุ การดื่มแอลกอฮอล์ การได้รับควันบุหรี่มือสอง และการไม่รับประทานผลไม้สด เป็นปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้ออีบีวีในกระแสเลือด การสูบบุหรี่ รวมถึงการได้รับควันบุหรี่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้ออีบีวีจากการศึกษาครั้งนี้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า มีการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้ออีบีวีในแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำประปาและเลือด ของประชากรในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ไม่พบเชื้อเอชพีวี ซึ่งการพบดีเอ็นเอของเชื้ออีบีวีในแหล่งน้ำและเลือดเป็นสายพันธุ์เดียวกันเมื่อเทียบกับฐานอ้างอิงอีบีวีในฐานข้อมูล (RefSeq) NC_007605

ข้อเสนอแนะ

ประชาชนควรเลือกใช้น้ำสะอาดในการอุปโภค บริโภค หลีกเลี่ยงการใช้น้ำตามแหล่งน้ำธรรมชาติมาอุปโภค บริโภค

บรรณานุกรม

พิไลพันธ พุธวัฒนะ และคณะ **หนังสือไวรัสวิทยา** พิมพ์ครั้งที่ 2.–กรุงเทพฯ: อักษรสมัย, 2559 หน้า511 สำนักพิมพ์ โรงพิมพ์อักษรสมัย

Behrman EJ. Of: C. Liang & J.–H. Lei, Water Environ. Res., 87, 656–659 (2015). **Water Environ Res.** 2018 May 1;90(5):479. doi: 10.2175/106143017X15131012153013. PMID: 29678217.Servi J C Stevens et all (2005)

Cao, Y., Xie, L., Shi, F. et al. (2021). **"Targeting the signaling in Epstein–Barr virus associated diseases: mechanism, regulation, and clinical study.** Sig Transduct Target Ther. 6, 15 (2021). et al., A. Dolan 2006

Dolan A, A. C., Gatherer D, Davison AJ, McGeoch DJ. (2006). **The genome of Epstein–Barr virus type 2 strain AG876**. Virology. 2006 Jun 20;350(1):164–70. doi: 10.1016/j.virol.2006.01.015. Epub 2006 Feb 21. PMID: 16490228 "

Gupta I, Nasrallah GK, Sharma A, et al. **Correction to: Co–prevalence *of human Papillomaviruses (*HPV) and Epstein–Barr virus (EBV) in healthy blood donors from diverse nationalities in Qatar**. Cancer Cell Int. 2022;22(1):45. Published 2022 Jan 29. doi:10.1186/s12935–022–02459–4

Germini, Diego, Fatimata Bintou Sall, Anna Shmakova, Joëlle Wiels, Svetlana Dokudovskaya, Emmanuel Drouet, and Yegor Vassetzky. 2020. "**Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein"** Cancers 12, no. 6: 1479.38

Hofscheier A, Ponciano A, Bonzheim, I. et al. **"Geographic variation in the prevalence of Epstein–Barr virus positive diffuse large B–cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population"** 2011 DOI: 10.1038/modpathol.2011.62

Hjalgrim, H.; Ekstrom–Smedby, K.; Rostgaard, K.; et al. **Cigarette smoking and risk of Hodgkin lymphoma: a population–based case–control study. Cancer Epidemiol Biomarkers** Prev. 2007; 16: 1561–6. 10.1158/1055–9965.EPI–07–0094

RJ, Borchardt MA, Richards KD, Spencer SK. **Assessment of sewer source contamination of drinking water wells using tracers and human enteric viruses**. Environ Sci Technol. 2010 Oct 15;44(20):7956–63. doi: 10.1021/es100698m. PMID: 20822128.

Hong, Pei–Ying et al. **"Metagenomics as a Tool to Monitor Reclaimed–Water Quality." Applied and environmental microbiology vol**. 86,16 e00724–20. 3 Aug. 2020, doi:10.1128/AEM.00724–20

Jangra S, Yuen KS, Botelho MG, Jin DY. E**pstein–Barr Virus and Innate Immunity: Friends or Foes? Microorganisms.** 2019 Jun 24;7(6):183. doi: 10.3390/microorganisms7060183. PMID: 31238570; PMCID: PMC6617214

Lin CL, Ying TH, Yang SF, Chiou HL, Chen YS, Kao SH, Hsieh YH. MTA2 **silencing attenuates the metastatic potential of cervical cancer cells by inhibiting AP1–mediated MMP12 expression via the ASK1/MEK3/p38/YB1 axis**. Cell Death Dis. 2021 May 6;12(5):451. doi: 10.1038/s41419–021–03729–1. PMID: 33958583; PMCID: PMC8102478

Loonibha, Shrestha. **Human Papillomavirus (HPV)– An Overview "Structure of Human Papillomavirus (HPV)"** (2022)

Margaret, A. et al. **"Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus"** (2012): Stanley Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

Malki, Ahmed et al. "**Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements."** International journal of molecular sciences vol. 22,1 130. 24 Dec. 2020, doi:10.3390/ijms22010130

Mandelbaum RT, Shati MR, Ronen D. **In situ microcosms in aquifer bioremediation studies. FEMS Microbiol Rev.** 1997 Jul;20(3–4):489–502. doi: 10.1111/j.1574–6976. 1997.tb00332. x. PMID: 9299716.

Muhammad, Rashi. et all. (2022)

NGS Analysis "metagenomics" //learn.gencore.bio.nyu.edu.com (2017).

Paez-Espino D, Pavlopoulos GA, Ivanova NN, Kyrpides NC. **Nontargeted virus sequence discovery pipeline and virus clustering for metagenomic data**. Nat Protoc. 2017 Aug;12(8):1673-1682. doi: 10.1038/nprot.2017.063. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28749930.

Pinon A, Vialette M. **Survival of Viruses in Water. Intervirology**. 2018;61(5):214-222. doi: 10.1159/000484899. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29316545

S.R. FarrahS.M. GoyalC. P.GerbaV. K. Mahajan C.Wallis J.L. MelnickDepartmentof **Virology and Epidemiology and Institute of Lipid Research, Baylor College of Medicine, Houston,** TX 77030, U.S.A. Revised 25 August 1977, Available online 31 March 2003

Shakira, Ghazanfar. et al. **"Metagenomics and its Application in Rumen Ecosystem: Potential Biotechnological Prospect"** 2009 DOI:10.3923/pjn.2009.1309.1315

Takada, Kensuke et al. **"Kruppel-like factor 2 is required for trafficking but not quiescence in postactivated T cells."** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) vol. 186,2 (2011): 775-83. doi:10.4049/jimmunol.1000094

Takada, Kensuke et al. "**Kruppel-like factor 2 is required for trafficking but not quiescence in postactivated T cells."** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) vol. 186,2 (2011): 775-83. doi:10.4049/jimmunol.1000094

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. **Metagenomics - a guide from sampling to data analysis.** Microb Inform Exp. 2012 Feb 9;2(1):3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3. PMID: 22587947; PMCID: PMC3351745.'

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. **Metagenomics - a guide from sampling to data analysis.** Microb Inform Exp. 2012 Feb 9;2(1):3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3. PMID: 22587947; PMCID: PMC3351745.'

Uzoma, Ijeoma C et al. **"Distinct pattern of lymphoid neoplasms characterizations according to the WHO classification (2016) and prevalence of associated Epstein-Barr virus infection in Nigeria population."** Infectious agents and cancer vol. 16,1 36. 24 May. 2021, doi:10.1186/s13027-021-00378-z

Vergara N, Balanda M, Vidal D, Roldán F, S Martín H, Ramírez E. **Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in peripheral blood mononuclear cells from blood donors.** J Med Virol. 2019 Nov;91(11):2009–2015. doi: 10.1002/jmv.25551. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31317547.

Vecchia AD, Kluge M, dos Santos da Silva JV, Comerlato J, Rodrigues MT, Fleck JD, da Luz RB, Teixeira TF, Roehe PM, Capalonga R, Oliveira AB, Spilki FR. **Presence of Torque teno virus (TTV) in tap water in public schools from Southern Brazil.** Food Environ Virol. 2013 Mar;5(1):41–5. doi: 10.1007/s12560–012–9096–7. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23412718.

Weitz, J. S., and Wilhelm, S. W. (2013, July 1). **An ocean of viruses. In The scientist**. Retrieved from http://www.the–scientist.com/?articles.view/articleNo/36120/title/An–Ocean–of–Viruses/.Grom F, Kentsch J, Müller T, Schnelle T, Stelzle M. **Accumulation and trapping of hepatitis A virus particles by electrohydrodynamic flow and dielectrophoresis. Electrophoresis**. 2006 Apr;27(7):1386–93. Doi: 10.1002/elps.200500416. PMID: 16568408.

Yoshii,Miyuki et al. "**Systemic Epstein–Barr virus–positive T–cell lymphoproliferative disease of childhood: Report of a case with review of the literature.**" Oncology letters vol. 4,3 (2012): 381–384. doi:10.3892/ol.2012.754

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมี 1X Phosphate – buffered saline (PBS) (pH 7.4)

NaCl	8	g
KCl	0.21	g
Na_2HPO_4	1.44	g
KH_2PO	0.24	g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	1000	ml

นำสารผสมกันในน้ำกลั่น 900 ml ปรับด้วยน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 7.4 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมี 1M Tris – HCl (stock) (pH 7.8)

Tris – HCl	15.76	g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	100	ml

นำสารผสมกัน นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 7.8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. การเตรียม 0.5 M Ethylene di – amine tetra acetic acid (EDTA) (Stock) (pH8)

EDTA	18.6	g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	100	ml

ชั่งสาร EDTA 18.6 กรัม ลงในน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. การเตรียม Lysis buffer

10 M Tris – HCl	500	µl
0.1 M EDTA (pH8)	10	ml
10% SDS	2.5	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	50	ml

นำสารทั้งหมดมาใส่ขวดตามปริมาตรที่จะใช้ ผสมให้เข้ากัน นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. การเตรียม 1 X Lysis buffer (pH7.8)

1 M Tris – HCl (Final 10 mM)	10	ml
0.5 EDTA (Final 0.1 M)	20	ml
10% SDS (Final 0.5% SDS)	5	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	100	ml

นำสารทั้งหมดมาใส่ขวดตามปริมาตรที่จะใช้ ผสมให้เข้ากัน นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 7.8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. การเตรียม 0.1 M $CaCl_2$ (stock)

$CaCl_2$	0.555	g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	50	ml
นำ $CaCl_2$ ละลายในน้ำกลั่น	50	ml

7. การเตรียม Proteinase K (20 mg/ml.) (stock)

Proteinase K	12	mg
0.1 M Tris – HCL	60	ml
0.1M $CaCl_2$	6	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	120	ml

นำสารผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 600 ไมโครลิตร

8. การเตรียม Proteinase K (20 mg/ml.)

Proteinase K	0.6 g
0.1 M Tris – HCL (To Final 10 mM Tris – HCl)	3 ml
0.1M $CaCl_2$ (To Final 10 mM $CaCl_2$)	6 ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	30 ml

นำสารผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 30 ml

9. การเตรียม 5 M Potassium acetate

Potassium acetate	49.07	g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	100	ml

นำมาผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 5.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียสที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

10. การเตรียม 5 M Potassium acetate

Potassium acetate	73.60	g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น	150	ml

นำมาผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 150 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 5.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียสที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

11. การเตรียม Phenol Chloroform Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

Phenol	25	ml
Chloroform	24	ml
Isoamyl alcohol	1	ml

นำมาผสมให้เข้ากันใส่ขวด Duran จากนั้นนำมาห่อฟรอยให้ทึบแสง เพื่อป้องกันการเสียสภาพของสาร

12. การเตรียม Phenol Chloroform Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

Phenol	100	ml
Chloroform	96	ml
Isoamyl alcohol	4	ml

นำมาผสมให้เข้ากันใส่ขวด Duran จากนั้นนำมาห่อฟรอยให้ทึบแสง เพื่อป้องกันการเสียสภาพของสาร

13. การเตรียม 70% Ethanol

Ethanol	70	ml
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	30	ml

นำ ethanol และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อมาผสมให้เข้ากัน

14. การเตรียม 70% Ethanol

Ethanol	140	ml
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	60	ml

นำ ethanol และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อมาผสมให้เข้ากัน

15. การเตรียม TE buffer (pH 8.0)

0.1 M Tris – HCL	10	ml
1 M EDTA	0.2	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตร	100	ml

นำ 1 M Tris – HCL 10 ml ผสมกับ 0.5MEDTA 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 8.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

16. การเตรียม TE buffer (pH 8.0)

0.1 M Tris – HCL (Final 10 mM)	10	ml
1 M EDTA (Final 1 mM)	0.2	ml
น้ำกลั่นปรับปริมาตร	100	ml

นำ 1 M Tris – HCL 1 ml ผสมกับ 0.5M EDTA 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 8.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

17. การเตรียม 10 % Sodium dodecyl sulphate (stock) (pH7.2)

Sodium dodecyl sulphate	10	g
น้ำกลั่น	100	ml

ชั่ง Sodium dodecyl sulphate 10กรัม ลงในน้ำกลั่น 90 ml จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml นำไปปรับ pH ให้ได้ pH7.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

18. การเตรียม 50X TAE buffer (pH 8.0)

Tris – base	121	g
Glacial Acetic acid	28.5	ml
0.5 M EDTA	50	ml

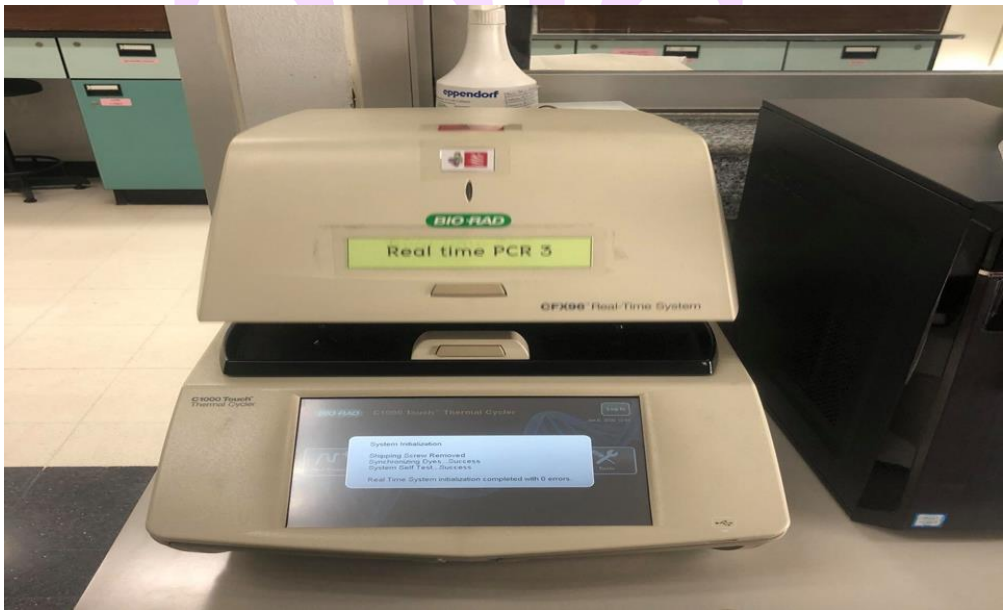
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเท่ากับ 500 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

19. Absolute ethanol 290 ml

20. Isopropanol 200 ml

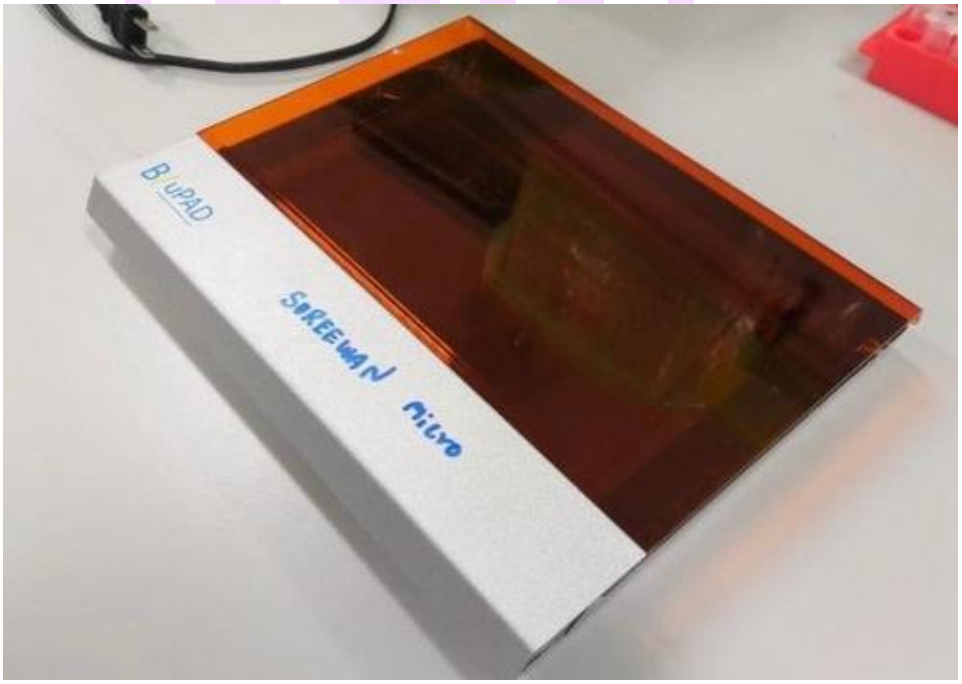
ภาคผนวก ข เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเพิ่มปริมานดีเอ็นเอ (Thermal Cycler &PCR machine)



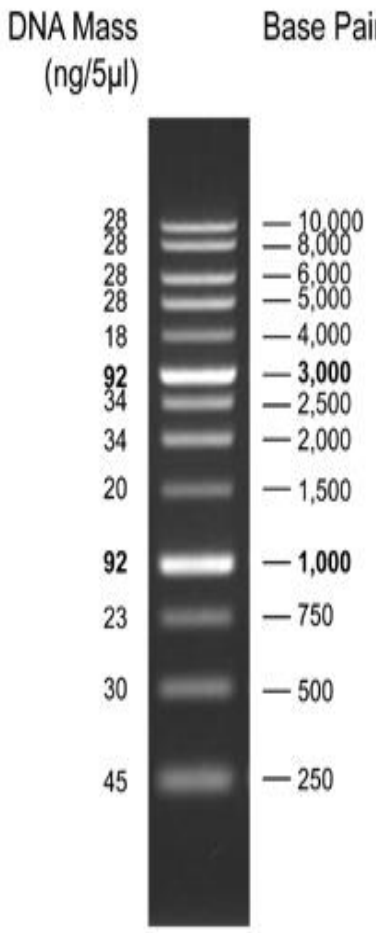
Real–time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR)

เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis)



เครื่องถ่ายภาพเจล (Chemiluminescence & fluorescence gel

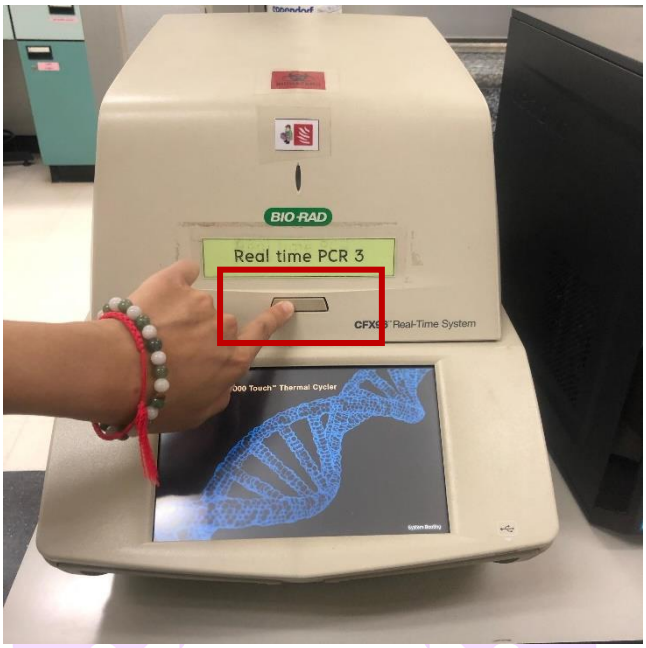
Documentation & image lab software)



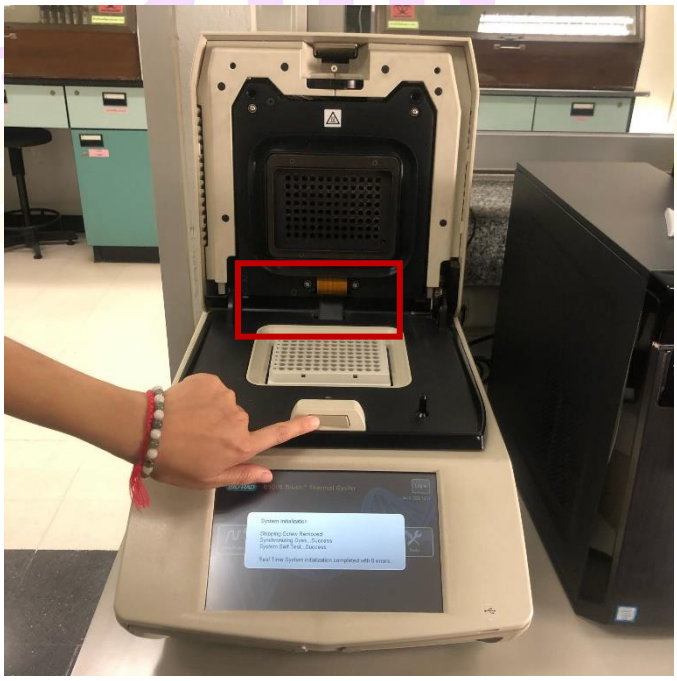
1 % TAE agarose gel

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

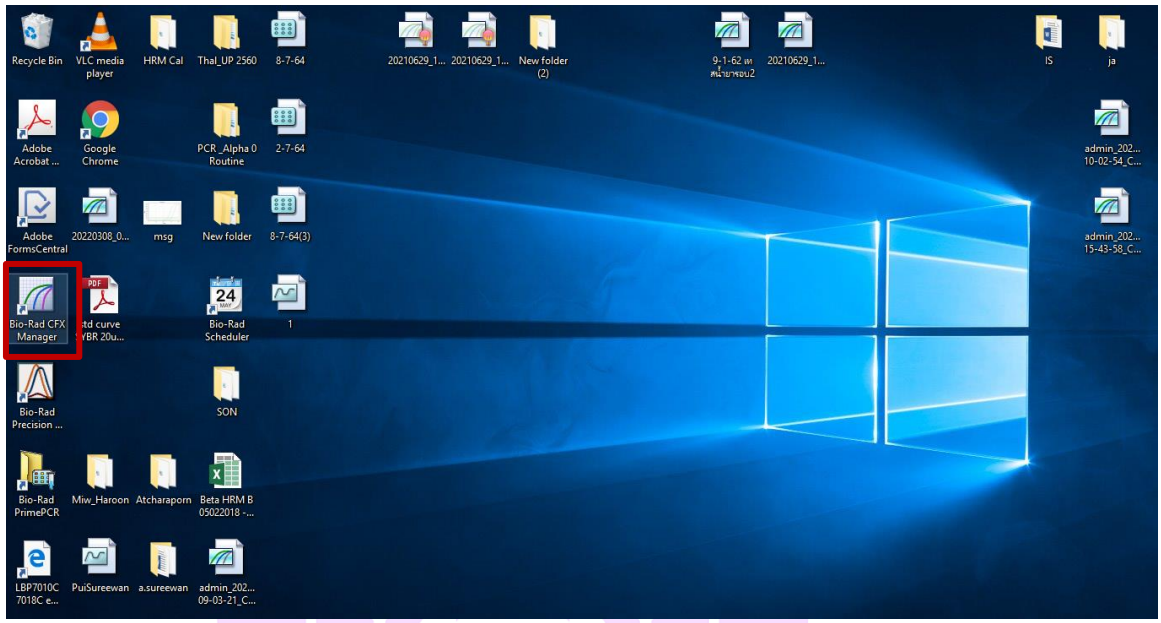
วิธีการใช้เครื่องโปรแกรม Real-time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR)



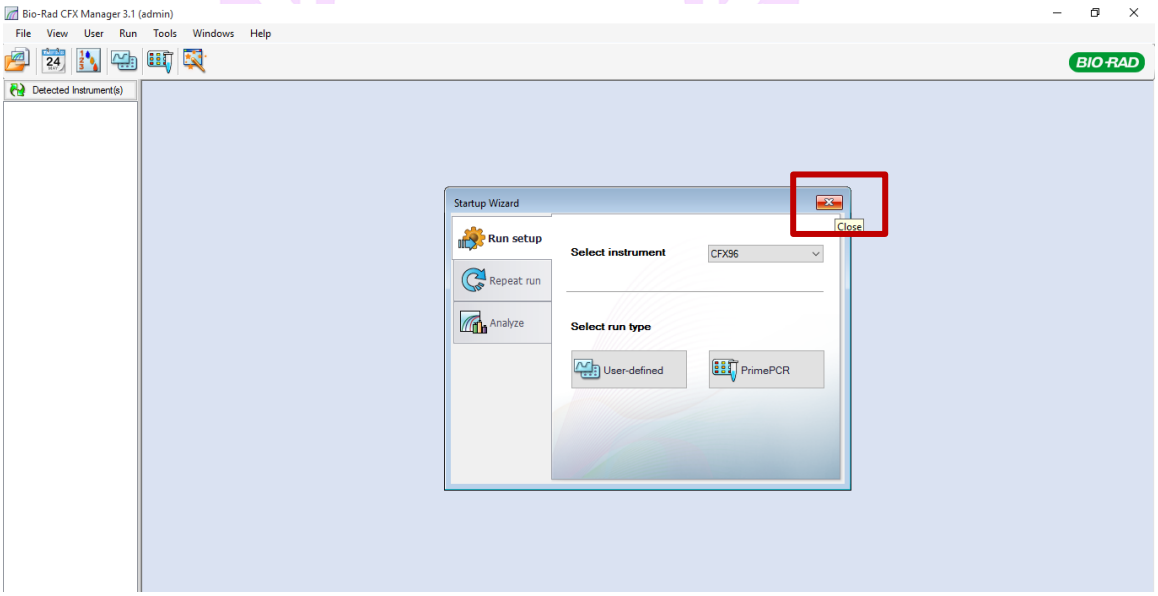
กดเปิดปุ่มที่ตัวเครื่อง Real time PCR



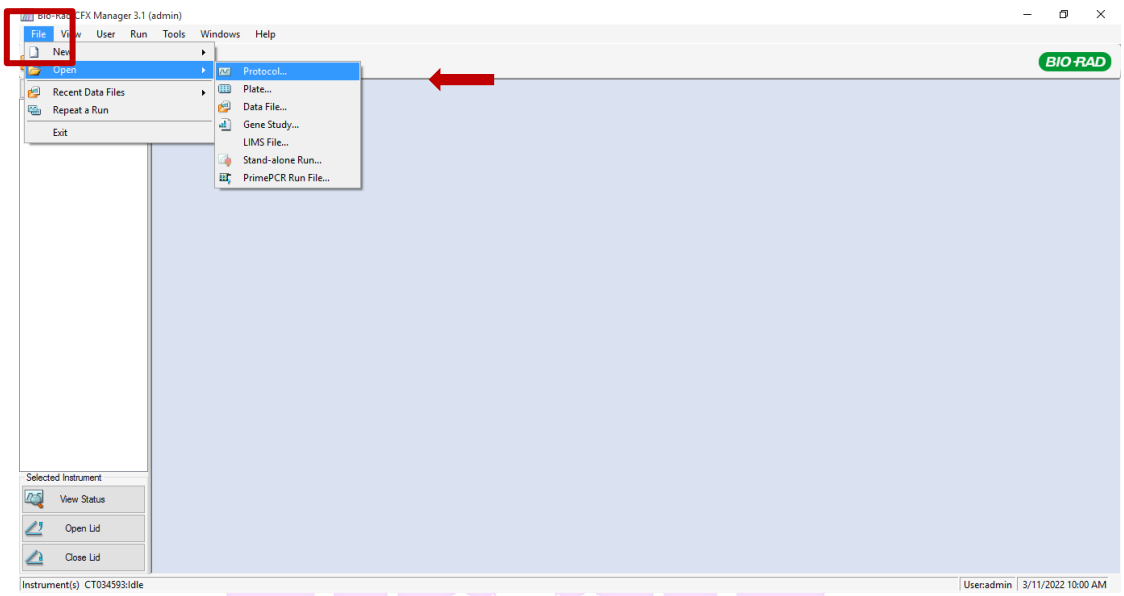
ใส่ PCR Micro platesกดปิดปุ่มที่ตัวเครื่อง Real time PCR



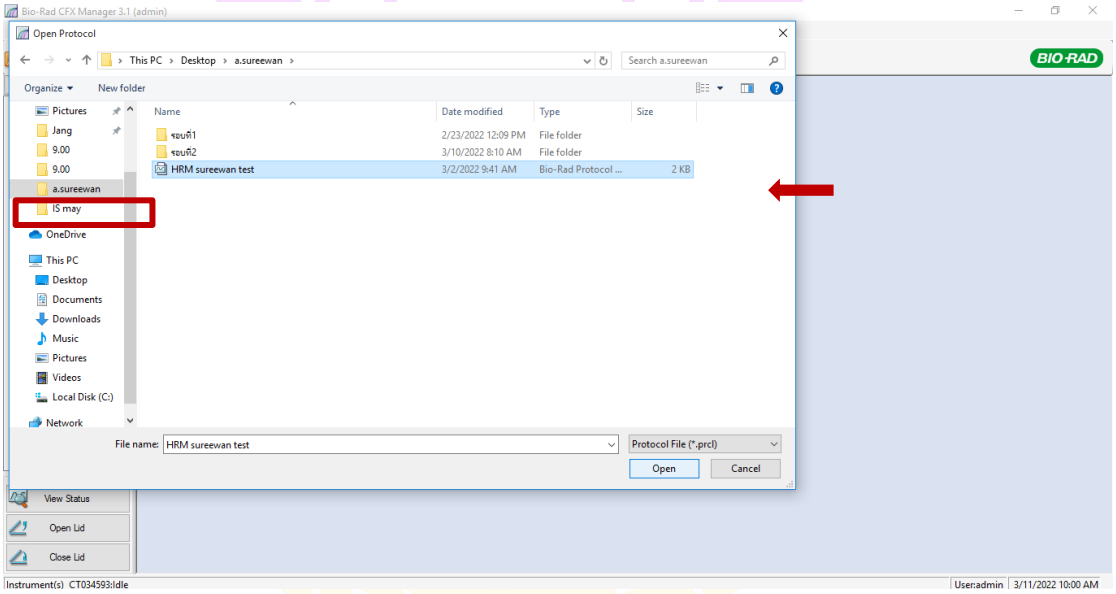
เปิดโปรแกรม Bio– Real OFX Manager



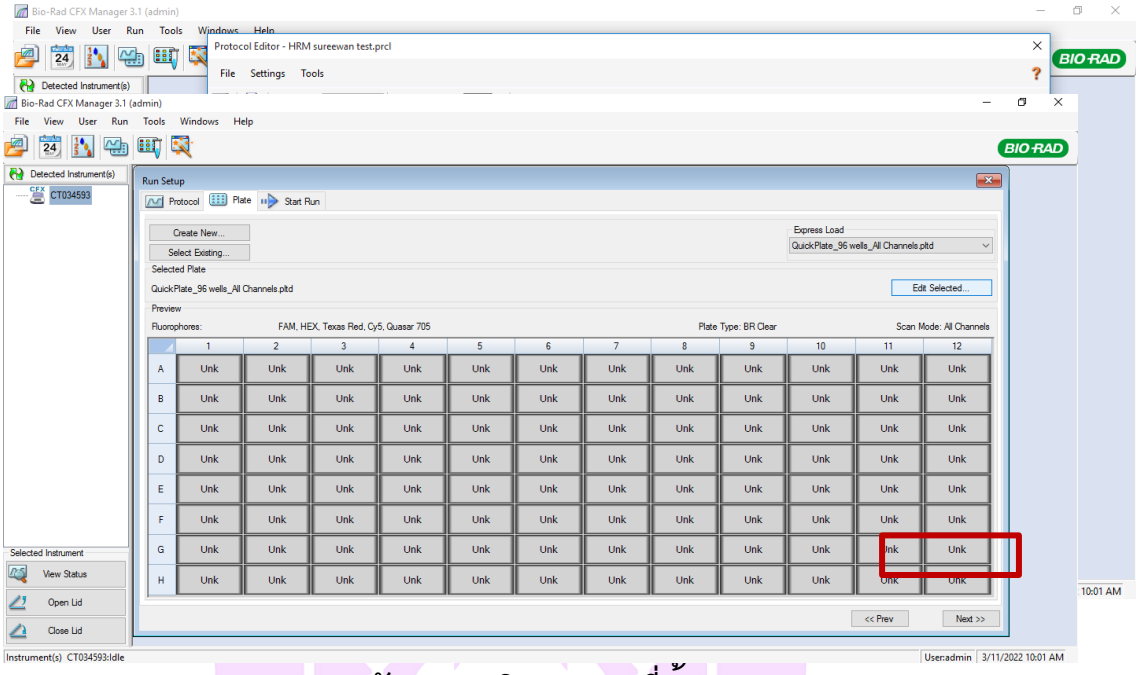
เข้าหน้าโปแกรมแล้วกดกากบาท



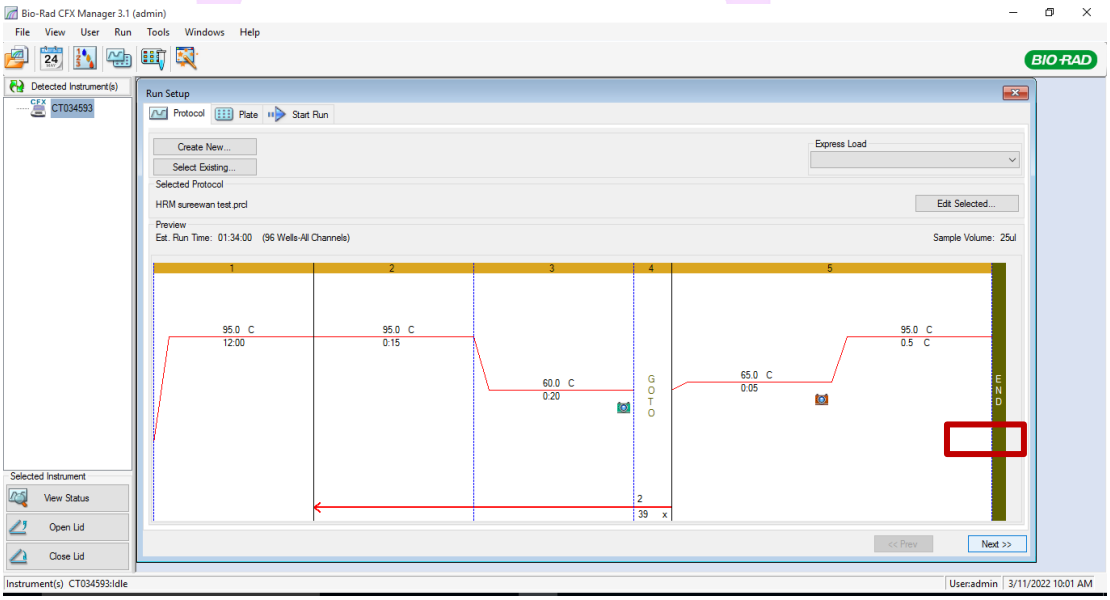
กดคำสั่ง File เลือก open เลือก Protocol



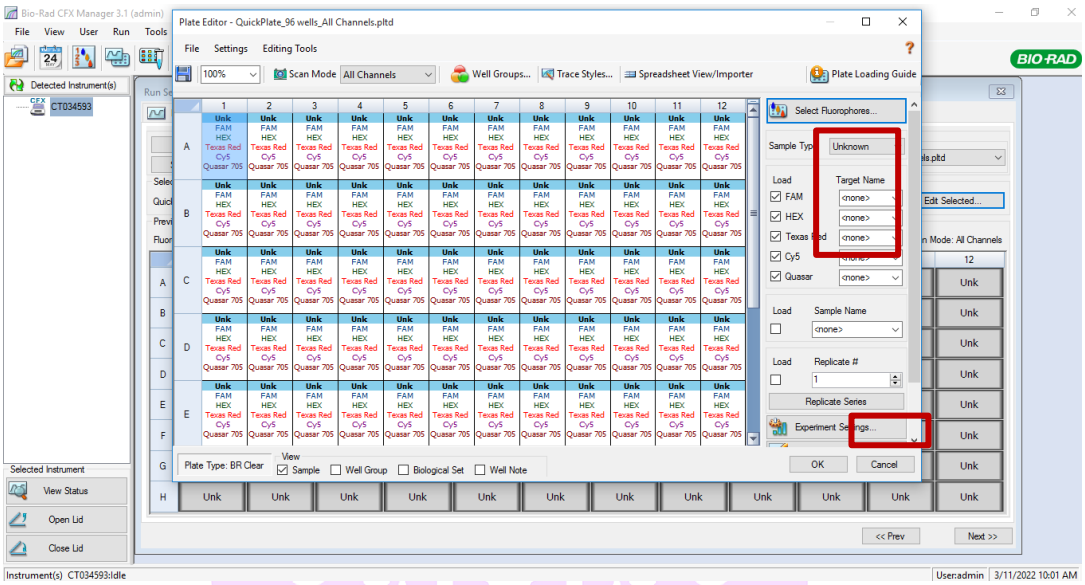
เปิด File ที่ทำการตั้งค่า



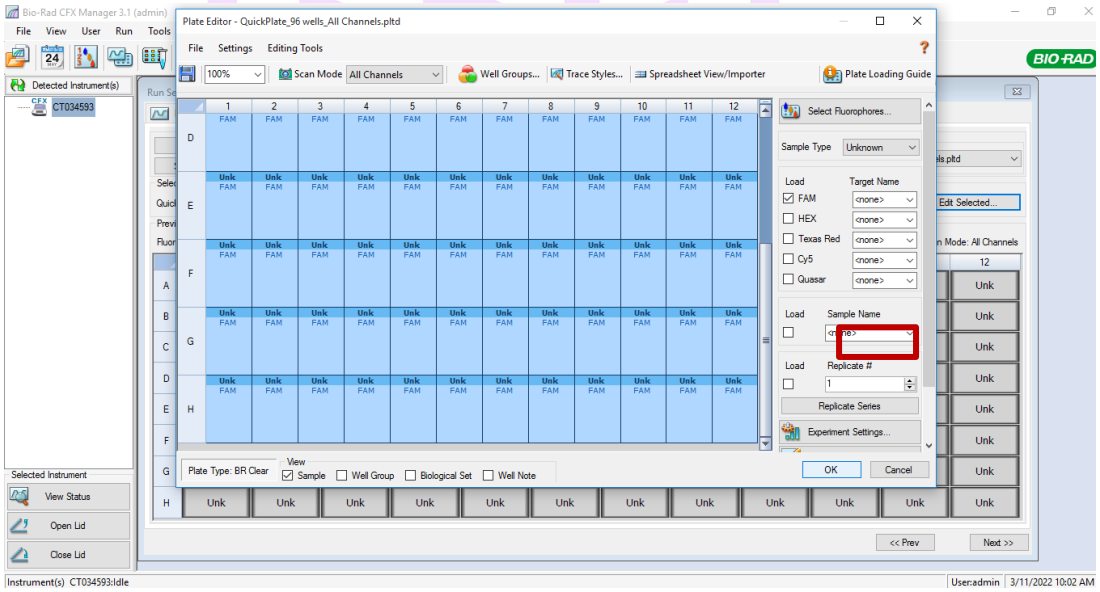
ปรับอุณหภูมิ และเวลาที่ต้องการ



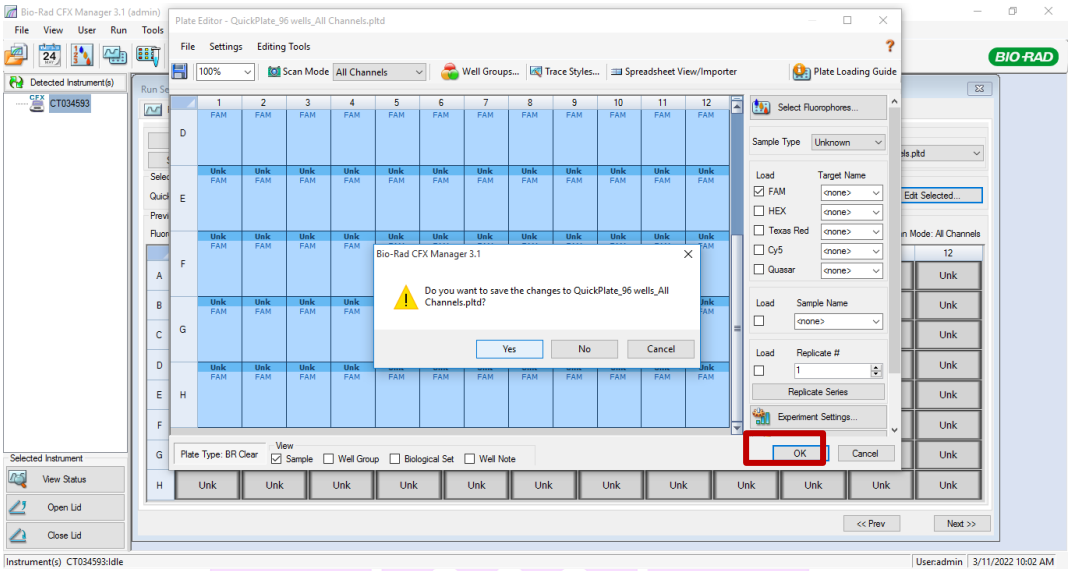
กด Next



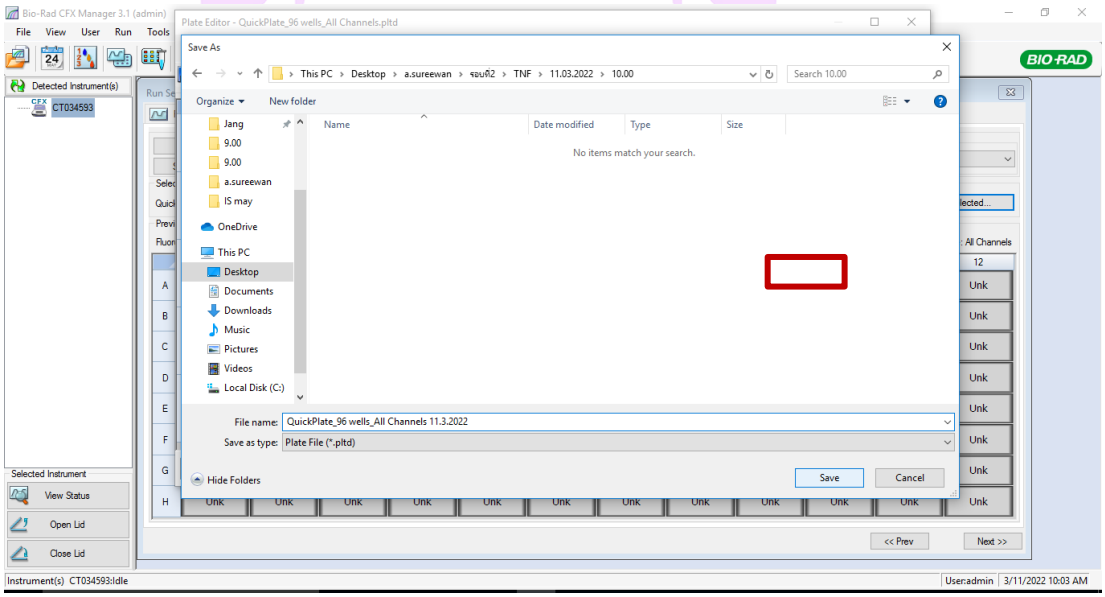
กด Edit Selected



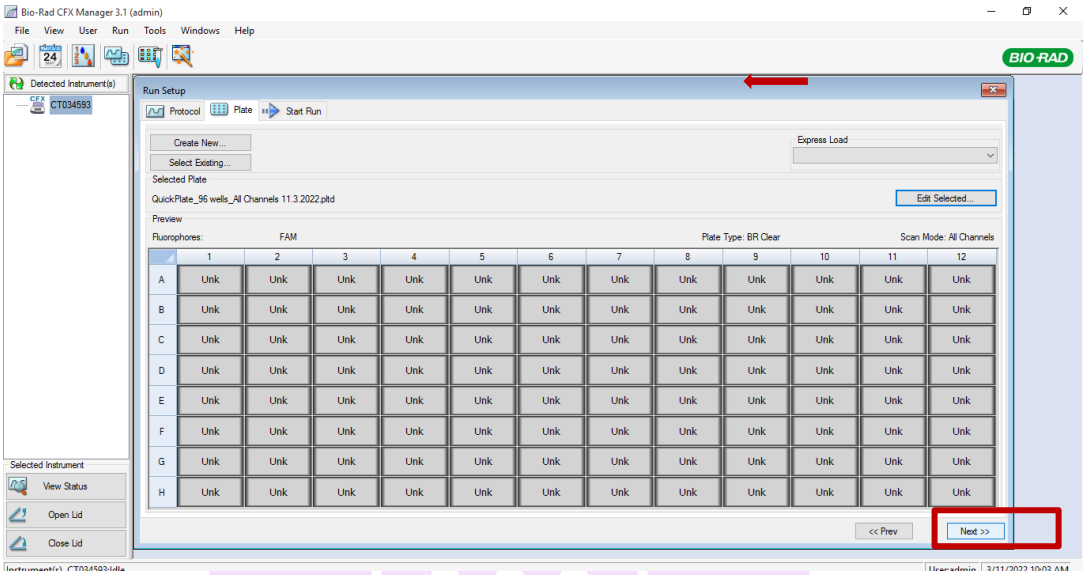
กดคลุมดำ แล้วเลือกคำสั่ง FAM



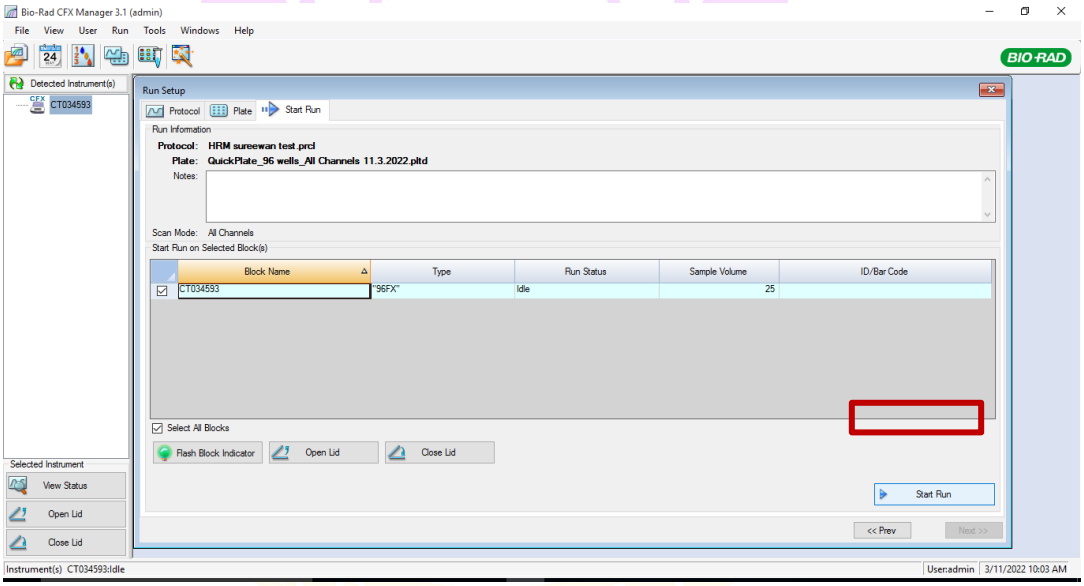
กดคำสั่ง Yes และกดคำสั่ง OK



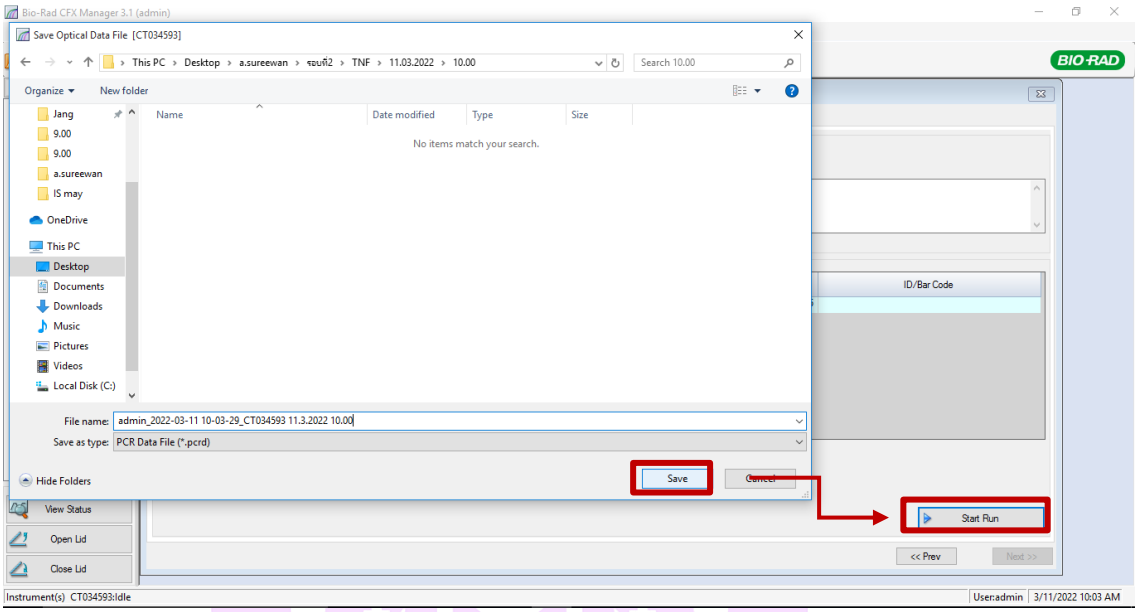
กด Save



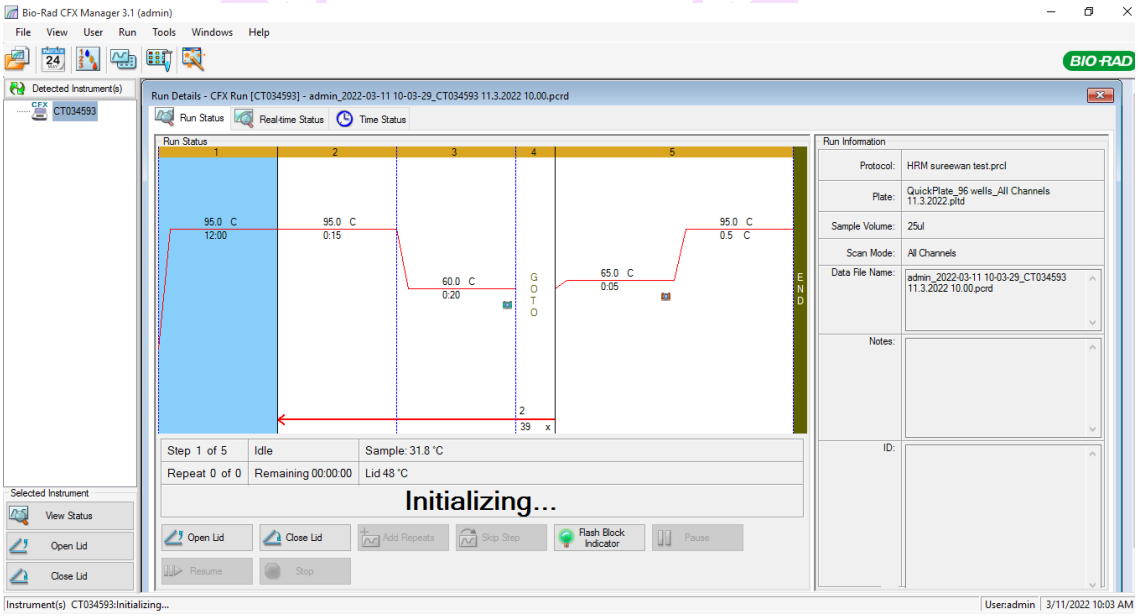
กด Next



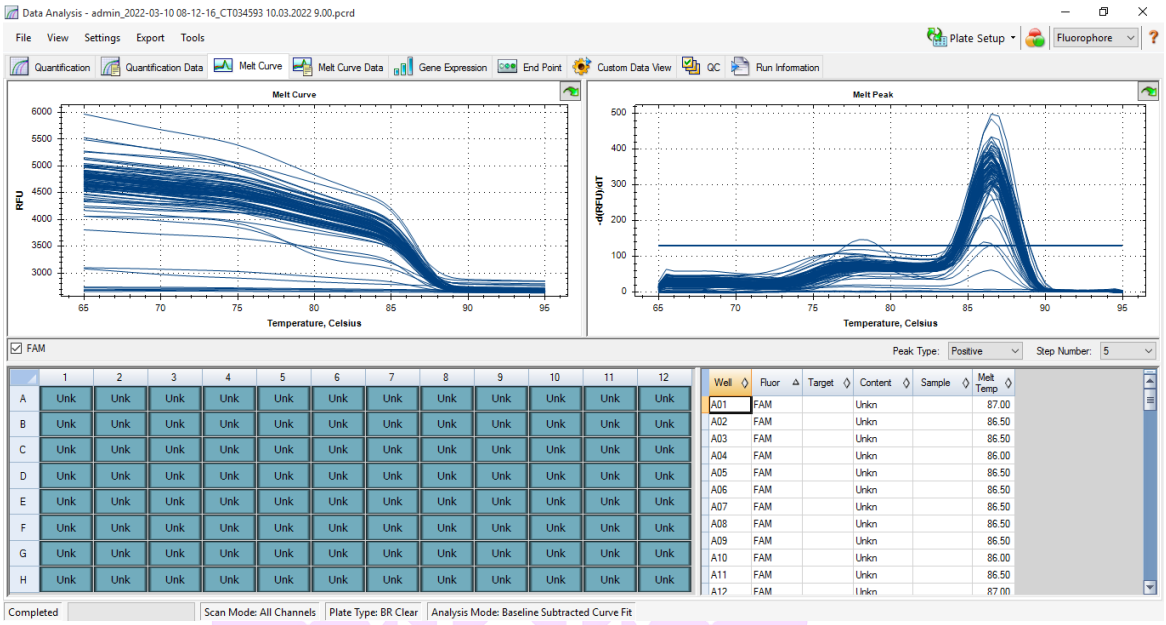
กด Star Run



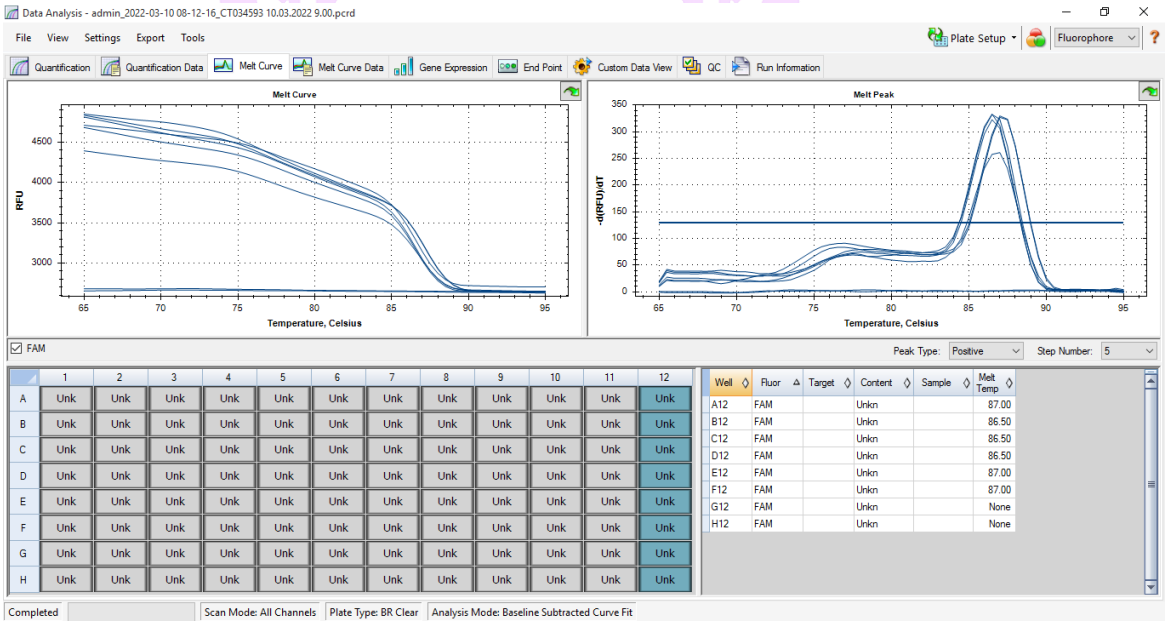
กด Save และกด Star Run



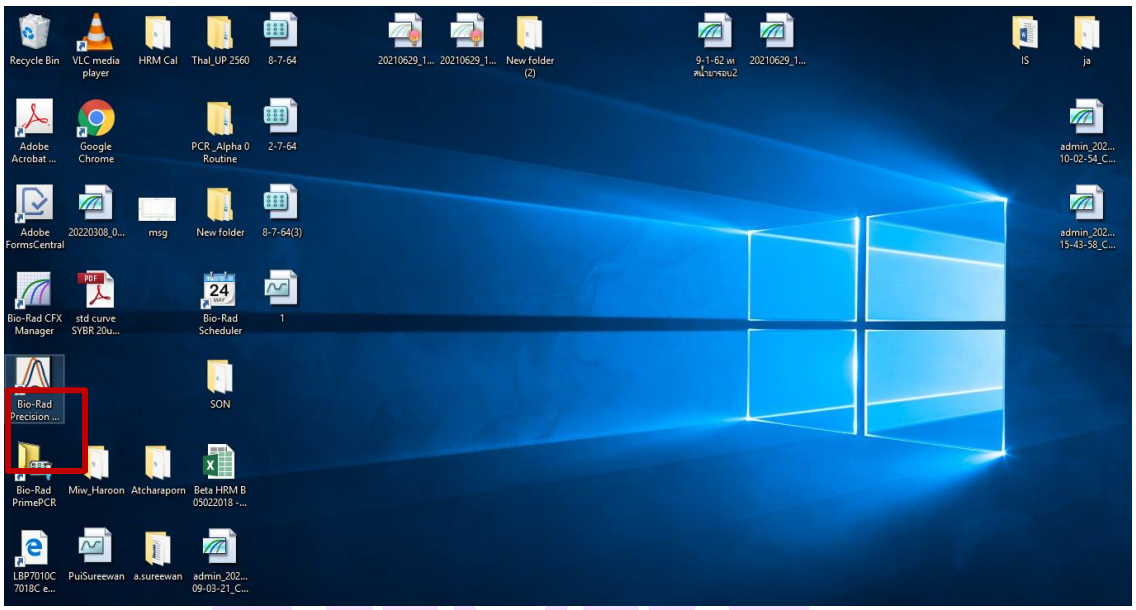
รอผล



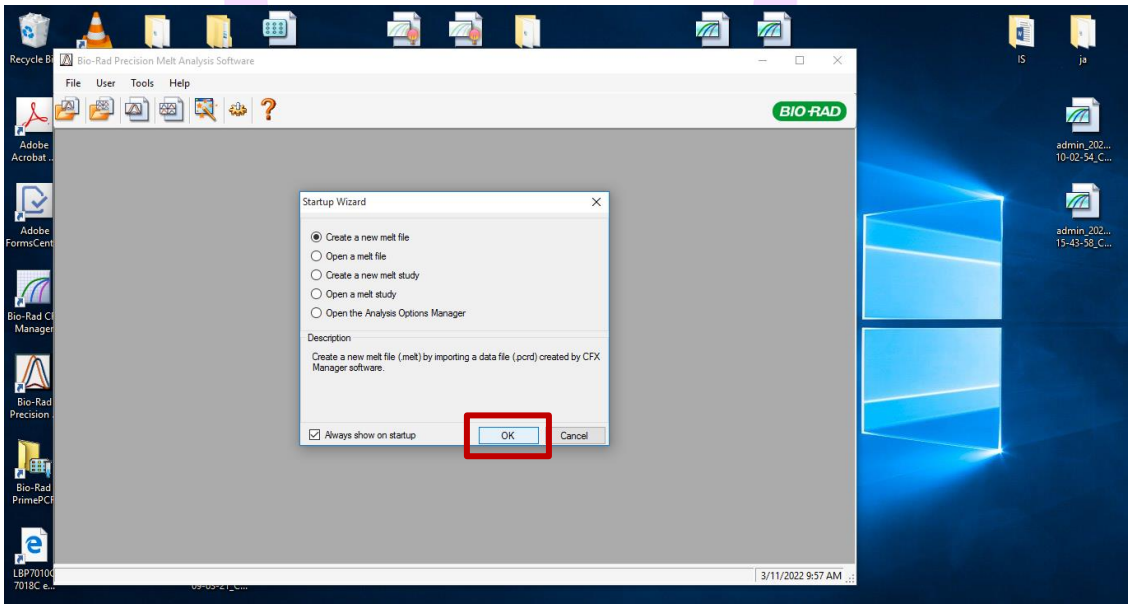
หลังจาก Run เสร็จหน้าจอแสดงผลของตัวอย่าง



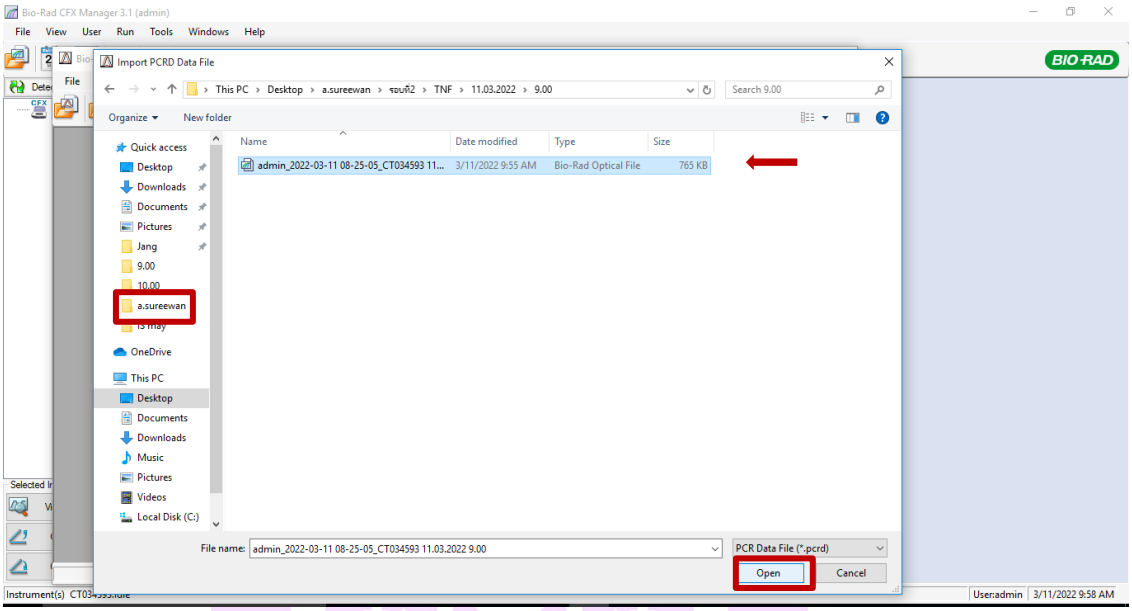
หน้าจอแสดงผลของ Positive และ Negative



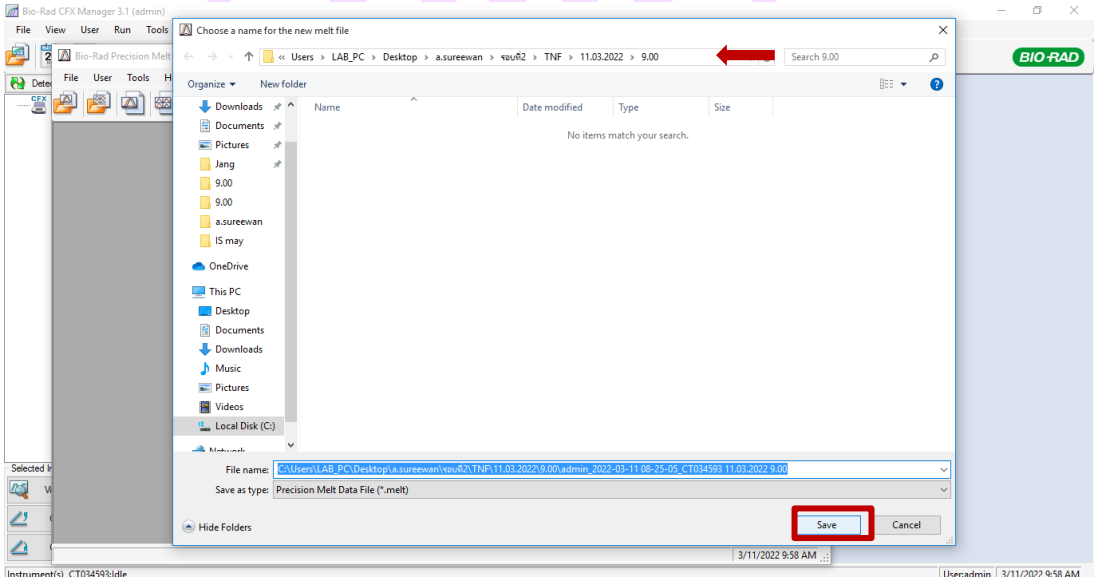
เปิดโปรแกรม Bio– Red Precision



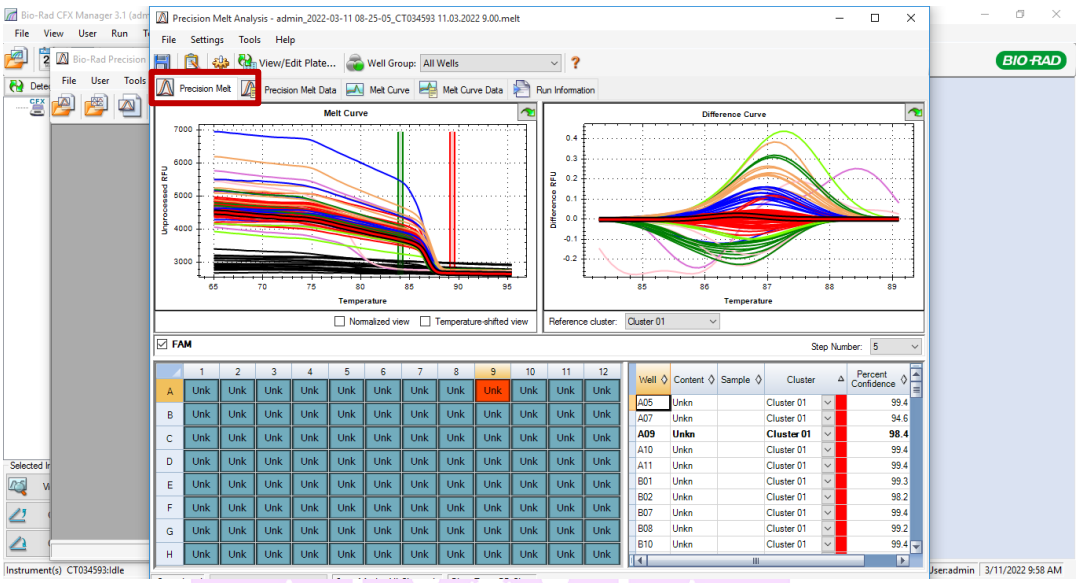
กด OK



เปิด File ที่ต้องการ กด open



กด save



อ่านค่ากราฟ Precision Melt

ภาคผนวก ค แบบสอบถาม

No.....

แบบสัมภาษณ์อาสาสมัคร ในโครงการเรื่อง การสร้างฐานข้อมูลพันธุกรรมและการตรวจวินิจฉัยโรคโดยใช้การแพทย์แม่นยำของประชากร ต.แม่กาและโรงพยาบาลพะเยา ในจังหวัดพะเยา

จังหวัดพะเยา อำเภอ.....ตำบล.....หมู่บ้าน.....บ้านเลขที่.....
ถนน.....
ชื่อ-สกุล..... โทรศัพท์..... E-mail.....

โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ลงในช่อง ☐ หรือกรอกข้อมูลที่ตรงกับข้อมูลของผู้ให้การสัมภาษณ์

<u>ตอนที่ 1</u> ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

1. เพศ ☐ 1. ชาย ☐ 2. หญิง
2. อายุ .....ปี
3. การศึกษาสูงสุด

☐ 1. ไม่ได้เรียน ☐ 2. ประถมศึกษา ☐ 3. มัธยมศึกษา/ปวช ☐ 4. อนุปริญญา/ปวส.
☐ 5. ปริญญาตรีหรือสูงกว่า ☐ อื่น.....

4. อาชีพ

☐ 1. ไม่ได้ประกอบอาชีพ ☐ 2. เกษตรกร ☐ 3. รับจ้างทั่วไป
☐ 4. ทำงานบริษัทเอกชน/โรงงาน ☐ 5. ค้าขาย/ประกอบอาชีพส่วนตัว ☐ 6. ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ
☐ 7. ข้าราชการบำนาญ ☐ 8.นักเรียน/นักศึกษา ☐ อื่น.....

5. รายได้ต่อเดือน

☐ 1. ไม่มีรายได้ ☐ 2. 1-1000 บาท ☐ 3. 1001-3000 บาท
☐ 4. 3001-5000 บาท ☐ 5. 5001-10000 ☐ 6. 10001-30000 บาท
☐ 7. มากกว่า 300000 บาท ☐ อื่น.....

6. จำนวนบุตร ☐ ไม่มี ☐ 1 คน ☐ 2 คน ☐ 3 คน ☐ 4 คน ☐ 5 คน ☐ อื่นๆ.....
7. ท่านแต่งงานแล้วหรือยัง ☐ 1. ยังไม่แต่ง ☐ 2. แต่งแล้ว ☐3. อื่นๆระบุ
8. สถานะภาพสมรสปัจจุบันของท่านเป็นอย่างไร

☐ 1. โสด ☐ 2. ไม่โสด อยู่ด้วยกัน ☐ 3. หย่า ☐ 4. แยกกันอยู่ ☐ 5. อื่นๆระบุ .....

9. ความสัมพันธ์ในครอบครัวอยู่ในเกณฑ์

☐ 1. ดีมาก ☐ 2. ดี ☐ 3. ปกติ ☐ 4. ทะเลาะเบาแว้ง ☐ 5. อื่นๆระบุ .....

<u>ตอนที่ 2</u> ประเมินสุขภาพและความเสี่ยงด้านสุขภาพในปัจจุบัน

1. ส่วนสูง.....เซนติเมตร 2.น้ำหนัก.....กิโลกรัม 3. เส้นรอบเอว.....นิ้ว

2. ความดันโลหิต ตัวบน.....mmHg ตัวล่าง.....mmHg

3. ท่านใช้สิทธิการประกันสุขภาพแบบใด

☐ 1. ไม่มี ☐ 2. บัตรทอง ☐ 3. ประกันสังคม ☐ 4. เอกชนทั่วไป ☐ 5. ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ ☐ 6. อื่นๆ ระบุ .....

4.โรคประจำตัว ☐1. ไม่มี ☐ 2. มีระบุ.....

☐ 1. มะเร็ง ระบุ..... ☐ 2. ความดันโลหิตสูง ระบุ.....☐ 3. โรคหัวใจ ระบุ.....

☐ 4. โรคหลอดเลือด.....☐ 5. เบาหวาน ระบุ.....☐ 6. โรคกระเพาะ ระบุ.....

☐ 7. ซึมเศร้า ระบุ.....☐ 8. โรคทางพันธุกรรม ระบุ.....☐ 9. อื่นๆ ระบุ.....

5. บุคคลในครอบครัวเคยเป็น**<u>โรคมะเร็ง</u>** หรือไม่ ☐ 1. ไม่เคย ☐ 2. เคย ระบุ ชนิดของมะเร็ง..... ใครเป็น..... ญาติฝ่ายใด..... ปัจจุบันยังมีชีวิตอยู่หรือไม่.....ระยะการเป็นโรคมะเร็งนานแค่ไหน.....

6.บุคคลในครอบครัวเคยเป็น**<u>โรคอื่นๆ</u>** หรือไม่ ☐ 1. ไม่เคย ☐ 2. เคย ระบุ ชนิดของโรค..... ใครเป็น..... ญาติฝ่ายใด..... ปัจจุบันยังมีชีวิตอยู่หรือไม่.....ระยะการเป็นโรคนานแค่ไหน .....เป็นโรคทางพันธุกรรมหรือไม่ โปรดระบุ.....

<u>ตอนที่ 3</u> แบบสำรวจสุขภาวะทางกาย

1. ท่านเคยออกกำลังกาย

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

2. ท่านออกกำลังกายต่อเนื่องอย่างน้อย 30 นาทีต่อครั้ง

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

3. ท่านรับประมานผลไม้สด เช่น .....

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

4. ท่านรับประทานผักชนิดต่าง ๆ เช่น .....

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

5. ท่านทำอาหารกินเอง เช่น.....

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

6. ท่านออกไปกินนอกบ้าน เช่น.....

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

7. ท่านกินอาหารที่มีไขมันมาก เช่น .....

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

8.ท่านกินอาหารหมักดอง เช่น .....

☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3.อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐4.อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

12. ท่านใช้ช้อนกลางในการับประทานอาหาร ☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3. อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐ 4. อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

13. ท่านใช้แก้วน้ำร่วมกับผู้อื่น หรือไม่ ☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3. อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐ 4 .อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

14. ท่านอาบน้ำวันละกี่ครั้ง ☐ 1. ไม่ ☐ 2. อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง ☐ 3. อาทิตย์ละ3-4 ครั้ง ☐ 4. อาทิตย์ละ 5-7ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

15. ท่านแปรงฟัน วันละกี่ครั้ง ☐ 1. ไม่แปรง ☐ 2. 1-2 ครั้ง ☐ 3. 3-4 ครั้ง ☐ อื่นๆ.....

16.ท่านคิดว่าน้ำในใช้ในครัวเรือนสะอาดเพียงพอหรือไม่ ☐ 1. สะอาดเพียงพอ ☐ 2. ยังไม่สะอาด ☐ 3. สกปรก ☐ 4. ต้องปรับปรุง ☐ อื่นๆ.....

17.ท่านดื่มน้ำผ่านการต้มหรือกรองหรือไม่ ☐ 1. ใช่ ☐ 2. ไม่ ☐ อื่นๆ.....

18.ท่านซื้อน้ำดื่มหรือไม่ ☐ 1. ใช่ ☐ 2. ไม่ ☐ อื่นๆ.....

19.ท่านใช้น้ำประปาแปรงฟันหรือไม่ ☐ 1. ใช่ ☐ 2. ไม่ ☐ อื่นๆ.....

<u>ตอนที่ 4</u> ประวัติของโรคและอาการเจ็บป่วย

1. ท่านเคยป่วยหรือไม่ และไปพบแพทย์บ่อยแค่ไหน ☐ 1. ไม่ ☐ 2. เคย ระบุ

☐ 1. 1-7 วัน ☐ 2. 8-14 วัน ☐ 3. 2-4 สัปดาห์ ☐ 4. 1-2 เดือน ☐ 5. 3-4 เดือน

☐ 6. ช่วง1 ปี ☐ 7. 1-2 ปี ☐ 8. 3-4 ปี ☐ 9. 5-10 ปี ☐ 10.10-15 ปี ☐ 11. อื่นๆ ระบุ .....

2. ท่านเป็นโรคประจำตัว หรือไม่ ☐ 1. ไม่เคย ☐ 2. เคย ระบุชื่อโรค .....

3. ท่านเป็นโรคนี้นานแค่ไหน ☐ 1. 1-7 วัน ☐ 2. 8-14 วัน ☐ 3. 2-4 สัปดาห์ ☐ 4. 1-2 เดือน ☐ 5. 3-4 เดือน ☐ 6. มากกว่า 1 ปี ☐ 7. อื่นๆ ระบุ .....

4. เมื่อท่านเป็นโรค ท่านเจ็บมากขึ้นในทุกๆวัน หรือไม่ ☐ 1. ไม่ ☐ 2. เจ็บมากขึ้น ระบุความเจ็บ .....

5. เมื่อท่านเป็นโรคท่านไปพบแพทย์หรือไม ☐ 1. ไม่ ☐ 2. เคย ระบุสถานที่ .....

6. เมื่อเป็นโรคแล้วกลับมาเป็นซ้ำหรือไม่ ☐ 1. ไม่เป็นซ้ำ ☐ 2. เป็นซ้ำ ระบุ

☐ 1. 1-7 วัน ☐ 2. 8-14 วัน ☐ 3. 2-4 สัปดาห์ ☐ 4. 1-2 เดือน ☐ 5. 3-4 เดือน ☐ 6. มากกว่า 1ปี ☐ 7. อื่นๆ ระบุ .....

7. ท่านรู้สึกว่าโรคของท่านรบกวนการดำเนินชีวิตประจำวันของท่านหรือไม่ ☐ 1. ไม่รบกวน ☐ 2. รบกวน ระบุ .....

8. เวลาท่านเจ็บป่วยท่านไปรักษาพยาบาลที่ใด

☐ 1. โรงพยาบาล ☐ 2. สถานีอนามัย ☐ 3. หมอชุมชน ☐ 4. คลินิก ☐ 5. หมอตำแย ☐ 6. อื่นๆ ระบุ .....

9. เวลาท่านเจ็บป่วยท่านใช้เวลาในการเดินทางไปรักษาพยาบาลนานเท่าใด

☐ 1. 5-10 นาที ☐ 2. 11-30 นาที ☐ 3. 1/2-1 ชั่วโมง ☐ 4. 1-3 ชั่วโมง ☐ 5. 4-6 ชั่วโมง ☐ 6. อื่นๆ ระบุ .....

10. ท่านพอใจกับการรักษาของแพทย์หรือสถานพยาบาลมากแค่ไหน

☐ 1. พอใจมาก ☐ 2. พอใจ ☐ 3. ไม่ พอใจ ☐ 4. เฉยๆ ☐ 5. อื่นๆระบุ .....

11. หลังการรักษาอาการของท่านหายหรือไม่ ☐ 1. ไม่หาย ☐ 2. หาย เพราะ .....

12. ท่านมีความสะดวกสบายในการเดินทางไปรักษาพยาบาลหรือไม่ ☐ 1. ไม่สะดวก ☐ 2. สะดวก เพราะ .....

13. ถ้าแพทย์นัดตรวจติดตาม ท่านมีความสะดวกในการเดินทางไปรักษาพยาบาลตามนัดหรือไม่

☐ 1. ไม่สะดวก 2. สะดวก เพราะ .....

14. ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปพบแพทย์ ประมาณราคาเท่าใด ต่อครั้ง

☐ 1. ไม่มีค่าใช้จ่าย ☐ 2. 100–200 บาท ☐ 3. 201–300 บาท ☐ 4. 301–500 บาท

☐ 5. 501–1000 บาท ☐ 6. มากกว่า 1000 บาท ☐ 7. อื่นๆระบุ .....

15. ค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล ประมาณราคาเท่าใด ต่อครั้ง

☐ 1. ไม่มีค่าใช้จ่าย ☐ 2. 100–200 บาท ☐ 3. 201–300 บาท ☐ 4. 301–500 บาท

☐ 5. 501–1000 บาท ☐ 6. มากกว่า 1000 บาท ☐ 7. อื่นๆระบุ .....

16. ถ้าเทียบกับการรักษาด้วยวิธีปัจจุบัน แล้วเปลี่ยนมาใช้วิธีใหม่ที่ดีกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ท่านจะเลือกวิธีเดิมหรือเปลี่ยนวิธีใหม่

☐ 1. วิธีเดิม 2. วิธีใหม่ เพราะ .....

17.ถ้าเทียบกับการรักษาด้วยวิธีปัจจุบัน แล้วเปลี่ยนมาใช้วิธีใหม่ที่ดีกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ท่านสามารถจ่ายได้ประมาณเท่าใด ต่อครั้ง

☐ 1. ไม่สามารถจ่ายได้ ☐ 2. 100–200 บาท ☐ 3. 201–300 บาท ☐ 4. 301–500 บาท

☐ 5. 501–1000 บาท ☐ 6. มากกว่า 1000 บาท ☐ 7. อื่นๆระบุ .....

<u>ตอนที่ 5</u> ประวัติของการดื่มแอลกอฮอร์

1. ท่านเคยดื่มแอลกอฮอร์ ☐ 1. ไม่เคย ☐ 2. เคย

2. ท่านดื่มแอลกอฮอร์ประเภทใด ☐ 1. เบียร์ ☐ 2. ไวน์ ☐ 3. เหล้าสี ☐ 4. เหล้าขาว ☐ 5. บรั่นดี ☐ 6. สไปร์

☐ 6. อื่นๆระบุ .....

3. ท่านดื่มแอลกอฮอร์ถี่แค่ไหน

☐ 1. สัปดาห์ละ 1–2 ครั้ง ☐ 2. สัปดาห์ละ 3–4 ครั้ง ☐ 3. สัปดาห์ละ 5–7 ครั้ง ☐ 4. สองสัปดาห์ต่อครั้ง

☐ 5. หนึ่งเดือนต่อครั้ง ☐ 6. มากกว่า 1 เดือนต่อครั้ง ☐ 7. มากกว่า 1 ปีต่อครั้ง ☐ 8. อื่นๆ

ระบุ .....

5. ท่านดื่มแอลกอฮอร์ปริมาณแค่ไหนต่อวัน.....ระบุจำนวน..... มิลลิลิตร

☐ 1. แก้วน้ำปกติ..... มิลลิลิตร ☐ 2. แก้วน้ำปกติ.....มิลลิลิตร ☐ 3. แก้วน้ำปกติ.....มิลลิลิตร

☐ 4. หนึ่งขวด.....มิลลิลิตร ☐ 5. สองขวด .....มิลลิลิตร ☐ 6. มากกว่า 2 ขวด .... มิลลิลิตร

☐ 7. อื่นๆระบุ .....

<u>ตอนที่ 6</u> ประวัติของการสูบบุหรี่

1. ท่านเคยสูบบุหรี่ ☐ 1. ไม่เคย ☐ 2. เคย

2. คนในครอบครัวของท่านสูบบุหรี่หรือไม่ บ่อยแค่ไหน ☐ 1. ไม่สูบ ☐ 2. สูบ

☐ 1. 1–7 วัน ☐ 2. 8–14 วัน ☐ 3. 2–4 สัปดาห์ ☐ 4. 1–2 เดือน

☐ 5. 3–4 เดือน ☐ 6. มากกว่า 1 ปี ☐ 7. อื่นๆระบุ .....

3. ท่านสูบบุหรี่ ถี่แค่ไหน

☐ 1. สัปดาห์ละ 1–2 ครั้ง ☐ 2. สัปดาห์ละ 3–4 ครั้ง ☐ 3 สัปดาห์ละ 5–7 ครั้ง ☐ 4. สองสัปดาห์ต่อครั้ง

☐ 5. หนึ่งเดือนต่อครั้ง ☐ 6. มากกว่า 1เดือนต่อครั้ง ☐ 7. มากกว่า 1 ปีต่อครั้ง ☐ 8. อื่นๆ ระบุ .....

4. ท่านสูบบุหรี่ ปริมาณแค่ไหนต่อวัน ☐ 1. 1–2 มวน ☐ 2. 3–4 มวน ☐ 3. 5–6 มวน ☐ 4. 6–10 มวน

☐ 5. 11–20 วัน ☐ 6. 21–40 มวน ☐ 7. อื่นๆ ระบุ .....

ตอนที่ 7 แบบคัดกรองความเครียด กรมสุขภาพจิต (ST5)

1. มีปัญหาการนอน นอนไม่หลับหรือนอนมาก ? ☐ แทบไม่มี ☐เป็นบางครั้ง ☐บ่อยครั้ง ☐เป็นประจำ
2. มีสมาธิน้อยลง ? ☐ แทบไม่มี ☐เป็นบางครั้ง ☐บ่อยครั้ง ☐เป็นประจำ
3. หงุดหงิด/กระวนกระวาย/ว้าวุ่นใจ ? ☐ แทบไม่มี ☐เป็นบางครั้ง ☐บ่อยครั้ง ☐เป็นประจำ
4. รู้สึกเบื่อ เซ็ง ? ☐ แทบไม่มี ☐เป็นบางครั้ง ☐บ่อยครั้ง ☐เป็นประจำ
5. ไม่อยากพบปะผู้คน ? ☐ แทบไม่มี ☐เป็นบางครั้ง ☐บ่อยครั้ง ☐เป็นประจำ

เกณฑ์ปกติที่กำหนด คะแนน 0–4 เครียดน้อย / คะแนน 5–7 เครียดปานกลาง / คะแนน 8–9 เครียดมาก / คะแนน 10–15 เครียดมากที่สุด

ตอนที่ 8 แบบคัดกรองภาวะซึมเศร้า รพ.ศรีธัญญา

แบบคัดกรองโรคซึมเศร้า 2 คำถาม (2Q)

1. ใน 2 สัปดาห์ที่ผ่านมา รวมวันนี้ ท่านรู้สึก หดหู่ เศร้า หรือท้อแท้สิ้นหวัง หรือไม่ ☐ มี ☐ ไม่มี
2. ใน 2 สัปดาห์ที่ผ่านมา รวมวันนี้ท่านรู้สึก เบื่อ ทำอะไรก็ไม่เพลิดเพลิน หรือไม่ ☐ มี ☐ ไม่มี

การแปรผล ถ้าคำตอบ ไม่มี ทั้ง 2 คำถาม ถือ ว่า ปกติ ไม่เป็นโรคซึมเศร้า ถ้าคำตอบ มี ข้อใดข้อหนึ่งหรือทั้ง 2 ข้อ (มีอาการใดๆ ในคำถามที่ 1 และ 2) หมายถึง “เป็นผู้มีความเสี่ยง” หรือ “มีแนวโน้มที่จะเป็นโรคซึมเศร้า” ให้ประเมินต่อด้วยแบบประเมิน โรคซึมเศร้า 9Q

ในช่วง 2 สัปดาห์ที่ผ่านมารวมทั้งวันนี้ ท่านมีอาการเหล่านี้บ่อยแค่ไหน

1. เบื่อ ไม่สนใจอยากทำอะไร ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
2. ไม่สบายใจ ซึมเศร้า ท้อแท้ ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
3. หลับยากหรือหลับๆตื่นๆหรือหลับมากไป ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐ เป็นทุกวัน (3)
4. เหนื่อยง่ายหรือไม่ค่อยมีแรง ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
5. เบื่ออาหารหรือกินมากเกินไป ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
6. รู้สึกไม่ดีกับตัวเอง คิดว่าตัวเองล้มเหลวหรือครอบครัวผิดหวัง
   ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
7. สมาธิไม่ดี เวลาทำอะไร เช่น ดูโทรทัศน์ ฟังวิทยุ หรือทำงานที่ต้องใช้ความ ตั้งใจ
   ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
8. พูดช้า ทำอะไรช้าลงจนคนอื่นสังเกตเห็นได้หรือกระสับกระส่ายไม่สามารถ อยู่นิ่งได้เหมือนที่เคยเป็น
   ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)
9. คิดทำร้ายตนเอง หรือคิดว่าถ้าตายไปคงจะดี
   ☐ไม่มีเลย (0) ☐เป็นบางวัน 1–7 วัน (1) ☐ เป็นบ่อย>7วัน (2) ☐เป็นทุกวัน (3)

คะแนนรวม การแปรผล

< 7 ไม่มีอาการของโรคซึมเศร้าหรือมีอาการของโรคซึมเศร้าระดับน้อยมาก

7–12 มีอาการของโรคซึมเศร้า ระดับน้อย

13–18 มีอาการของโรคซึมเศร้า ระดับปานกลาง

≥ 19 มีอาการของโรคซึมเศร้า ระดับรุนแรง

ท่านอยากให้หน่วยงานของรัฐช่วยเหลืออะไรเพิ่มเติม

.....

.....

.....

.....

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	สุธิดา พงษ์ภักดีสกุล
วัน เดือน ปี เกิด	12 กันยายน 2540
สถานที่เกิด	ศูนย์แม่และเด็กราชบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 วท.บ.(จุลชีววิทยา),มหาลัยพะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	99/2 ม.1 ต.ท่าเคย อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี 70180
ผลงานตีพิมพ์	Human Oncogenic Epstein–Barr Virus in Water and Human Blood Infection of Communities in Phayao Province, Thailand Journals MDPI Water 2023, 15(2)