

การศึกษาจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่พบ ณ สนามมวยและสถานบันเทิง ในเขตกรุงเทพมหานคร ของประเทศไทย

พิไลลักษณ์ อัคคไพบูลย์ โอภาตะ¹ สิริภาภรณ์ ผุยกัน¹ สิทธิพร ปานเม่น¹ ธนัสภา ธนเดชากุล¹ สิริชล กาละ¹
วันดี มีฉลาด¹ พัทธกาญจน์ ทนไชย¹ ภากร ภิมย์ทอง¹ วราวรรณ วงษ์บุตร¹ รัตนา ตาเจริญเมือง¹ สุนทรียา วัชรเจริญ¹
มาลินี จิตตกานต์พิชัย² บัลลังก์ อุปพงษ์¹ และโอภาส การย์กวินพงศ์³

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ³กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สถานการณ์การติดเชื้อ Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ในประเทศไทย
ตั้งแต่พบผู้ป่วยยืนยันรายแรกซึ่งเดินทางมาจากประเทศจีน เมื่อวันที่ 8 มกราคม 2563 จนกระทั่งช่วงต้นเดือนมีนาคม 2563
พบผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ซึ่งคาดว่าจะเกิดการแพร่กระจายเชื้อในแหล่งสถานบันเทิงและสนามมวยในเขตกรุงเทพมหานคร
การศึกษานี้รายงานรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยสัญชาติไทย 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสถาน
บันเทิงและกลุ่มสนามมวยในประเทศไทย จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลโดยใช้ข้อมูลทั้งจีโนม
ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยพบว่า เชื้อจากทั้ง 2 แหล่งจัดอยู่ใน clade S โดยมีสายสัมพันธ์
ใกล้เคียงกับเชื้อจากเกาหลีใต้และฮ่องกงในรูปแบบ sister lineage และสายพันธุ์เชื้อจากประเทศสเปนและเม็กซิโกในรูปแบบ
basal lineage ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ใน clade L ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากประเทศจีนในช่วงแรก
ของการระบาดของโรคโควิด-19 ในประเทศไทย ผลจากการวิเคราะห์สามารถอนุมานได้ว่าเชื้อ SARS-CoV-2 จากทั้ง 2 แหล่ง
ที่พบในประเทศไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากเชื้อต้นกำเนิดที่เป็นศูนย์กลางการระบาดในประเทศจีน

คำสำคัญ: เชื้อ SARS-CoV-2, โควิด-19, สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Corresponding author E- mail: pilailuk.o@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020

Revised: 18 August 2020

Accepted: 2 September 2020

บทนำ

สถานการณ์ระบาดของโรคติดต่อทางเดินหายใจจากไวรัสโคโรนา 2019 ครั้งแรกที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ ประเทศจีน และพบผู้ป่วยอีกหลายเมืองของประเทศจีน รวมถึงต่างประเทศ เช่น ประเทศไทย ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และเกาหลีใต้ เป็นต้น โดยผู้ป่วยที่พบในต่างประเทศยังมีความเชื่อมโยงกับเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน จากรายงานผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตที่เพิ่มขึ้น และพบในหลายพื้นที่ ตลอดจนมีรายงานการติดต่อระหว่างคนสู่คนภายในประเทศ องค์การอนามัยโลก ประกาศให้สถานการณ์แพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เป็นภาวะฉุกเฉินด้านสาธารณสุขระหว่างประเทศ (Public health Emergency of international Concern) เมื่อวันที่ 30 มกราคม 2563 และ เมื่อวันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2563 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศแจ้งชื่อโรคติดเชื้อและชื่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่อย่างเป็นทางการ คือ โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease; COVID-19) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)⁽¹⁾

การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 มีแนวโน้มเข้าสู่ภาวะวิกฤตด้านสาธารณสุขในหลายภูมิภาคของโลก นักวิจัยทั้งในจีนและอีกหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ออกรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างผู้ป่วย 2 รายแรกที่พบในประเทศไทย และพบว่าจีโนมมีความคล้ายคลึงกับจีโนมของผู้ป่วยชาวจีนเมืองอู่ฮั่น ทั้งนี้ผู้ป่วย 2 ราย ไม่มีความเกี่ยวข้องกันและไม่เคยไปที่ตลาดอาหารทะเลหัวหนาน ซึ่งคาดว่าเป็นแหล่งเริ่มต้นของเชื้อ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อ SARS-CoV-2 ได้แพร่กระจายอยู่ในเขตพื้นที่ประเทศจีนก่อนสัปดาห์แรกของเดือนมกราคม 2563 หรือก่อนหน้า⁽²⁾

เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 จัดอยู่ในจีนัสเบต้าโคโรนาไวรัส (Betacoronavirus) มีขนาด 60–140 นาโนเมตร หุ้มด้วยชั้นไขมัน มีสารพันธุกรรมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว แบบสายบวก (positive single-stranded RNA) ขนาดจีโนม 27–32 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วยยีน ORF (open reading frame; ORF1a, ORF1ab), RdRp (RNA-dependent RNA polymerase gene), S (spike protein gene), E (envelope protein gene), M (membrane protein gene), N (nucleocapsid protein gene)^(3, 4) Roujian Lu และคณะ ได้ศึกษาระบาดชีววิทยาระดับโมเลกุลและจำแนกเชื้อไวรัสโคโรนาตามจีโนมิกส์ พบว่าเชื้อ SARS-CoV-2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส bat-derived severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronaviruses, bat-SL-CoVZC45 และ bat-SL-CoVZXC21 ซึ่งเก็บตัวอย่างในเมือง Zhoushan ประเทศจีน เมื่อปี 2018 ร้อยละ 88 (identity) แต่มีระดับความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการห่างจากเชื้อ SARS-CoV (79% identity) และ MERS-CoV (50% identity) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้าน homology modelling พบว่าเชื้อ SARS-CoV-2 มีคุณสมบัติของโครงสร้าง receptor-binding domain ที่คล้ายคลึงกับเชื้อ SARS-CoV ถึงแม้จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับอะมิโนในบางตำแหน่ง^(5, 6) การศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเชื้อ SARS-CoV-2 โดย Phan T ได้ศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 86 สายพันธุ์ พบว่าในสารพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสหลายสายพันธุ์เกิดการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์กว่า 93 ตำแหน่ง โดยส่วนใหญ่อยู่บนตำแหน่งของยีน non-structural และ structural protein ยีน ORF1ab polyprotein และยีน spike protein ตามลำดับ⁽⁷⁾ จากการเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีความหลากหลาย GISAID ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสากลได้มีการกำหนดรูปแบบสายพันธุ์ออกเป็น 6 รูปแบบ (clade) โดยอาศัยพื้นฐานของ marker mutation ดังนี้ 1) clade “S” 2) clade “L” ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในระยะแรก จากนั้นมีการจำแนก clade “L” เป็น 3) clade “V” และ 4) clade “G” ในระยะต่อมามีการจำแนก clade “G” เป็น 5) clade “GH” และ 6) clade “GR” เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งทำให้เกิดระบาดทั่วโลกได้อย่างเป็นระบบและสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงตามระบบสากล⁽⁸⁾

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่พบในประเทศไทย จะสามารถติดตามวิวัฒนาการและการกลายพันธุ์ของเชื้อ เป็นประโยชน์ต่องานด้านการแพทย์และสาธารณสุข ทั้งด้านการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรค และพัฒนาวัคซีนในการป้องกันและรักษาโรค COVID-19 ในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ช่วยสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรค

วัสดุและวิธีการ

การแยกเชื้อไวรัส

เตรียมตัวอย่างสารคัดหลั่ง ได้แก่ Nasopharyngeal swab และ/หรือ Throat swab ของผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน กลุ่มสถาบันบันเทิงและกลุ่มสนามมวยจำนวน 16 ตัวอย่าง ที่แช่ใน Viral Transport Media (VTM) โดยเขย่าตัวอย่างให้เข้ากันนาน 15 วินาที ดูดตัวอย่างลงใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (มล.) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส (°C) ด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 45 นาที เก็บส่วนใสใส่งในหลอดที่เตรียมไว้ในน้ำแข็ง

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cell, Elabscience, USA) เลี้ยงไว้ในที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C ที่มี 5% CO₂ ที่มีความสมบูรณ์อายุประมาณ 1-2 วัน ถ่าย growth medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่เติม Phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งปราศจาก Mg²⁺ (PBS (-)) ที่มีส่วนผสมของ NaCl, KCl, Na₂HPO₄ และ KH₂PO₄ ปริมาตร 5 มล. ลงในขวดเพื่อล้างเซลล์ให้ทั่ว จากนั้นดูดสารละลาย PBS (-) ที่ทิ้ง และดูดตัวอย่างสารคัดหลั่งที่เตรียมไว้ประมาณ 0.5 มล. ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C ที่มี 5% CO₂ นาน 1 ชั่วโมง โดยทุก 15 นาที ให้นำขวดเลี้ยงเซลล์ออกมาจากตู้เลี้ยงขวดไปมาเพื่อให้ตัวอย่างสัมผัสกับเซลล์ทั่วทั้งขวดนานประมาณ 6 วินาที แล้วนำเข้าไปในตู้อีกครั้งเมื่อครบเวลาบ่ม 1 ชั่วโมง เติม maintenance medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM, Gibco, USA) ที่มี 2% FBS ปริมาตร 5 มล. และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C ที่มี 5% CO₂ นาน 5-7 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ cytopathic effect (CPE) ทุกวัน ภายใต้กล้อง Inverted Microscope เมื่อพบ CPE > 3+ ของเซลล์ทั้งหมด (หมายถึง เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ 75%) ให้ดูดเซลล์พร้อมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ใส่หลอด 15 มล. แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 2,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสเก็บใส่หลอดสำหรับแช่แข็ง (Cryotube) และนำไปตรวจยืนยันซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี real-time RT-PCR ก่อนนำเก็บที่อุณหภูมิ < -70 °C

การเตรียม DNA library

สกัด RNA จากเชื้อโคโรนาไวรัส 2019 (SARS-CoV-2) ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยชุดสกัด Nucleospin® RNA Virus-kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) และวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยชุดน้ำยา QUANT-iT RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้น RNA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียม DNA Library ด้วยชุดน้ำยา NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, USA) ความเข้มข้นเริ่มต้นของ dsRNA สำหรับการเตรียม DNA library เท่ากับ 10-100 ng เมื่อเตรียมได้ DNA library แล้วตรวจสอบผลผลิตโดยการทำ 2% Agarose gel electrophoresis อ่านตำแหน่งชิ้นส่วน DNA เปรียบเทียบกับ DNA marker และ First Bead/Second Bead: 0.45/0.20 positive control ขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เหมาะสมในการทำ Library ประมาณ 300 bp วัดความเข้มข้นของ DNA Library ด้วยชุดน้ำยา QUANT-iT DNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้น DNA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Next-Generation Sequencing

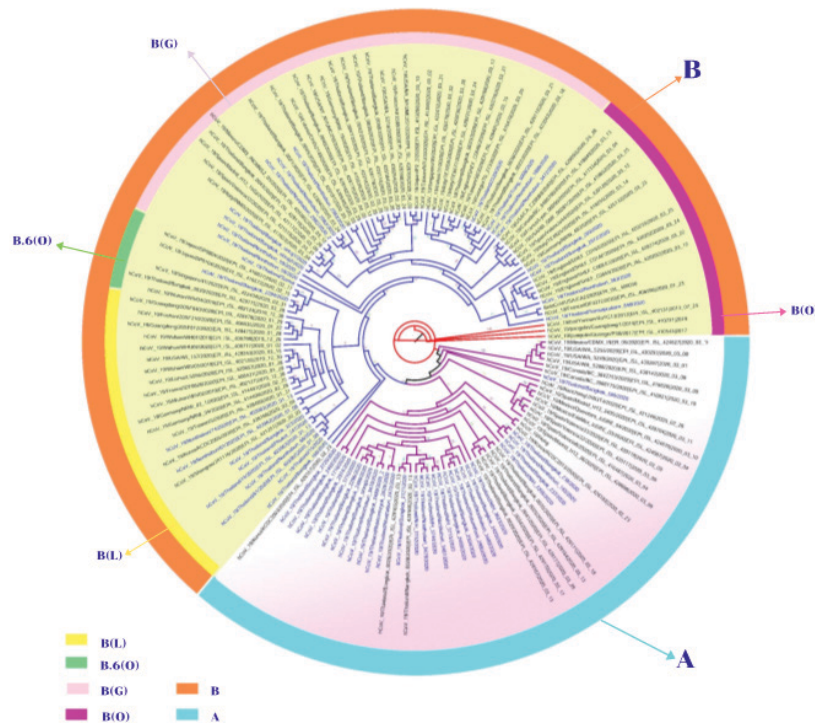
ปรับความเข้มข้นของตัวอย่าง DNA Library ที่เตรียมได้ในแต่ละหลอดด้วยน้ำ Nuclease-free water ให้ได้ความเข้มข้นที่ 2 nM แล้วนำตัวอย่างทุกหลอดมาผสมกันได้ความเข้มข้น 2 nM mix solution เติม 0.2 N NaOH 10 ไมโครลิตร (μl) ไปยัง 2 nM mix solution 10 μl ผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 nM เติม HT1 Hybridization Buffer (Illumina, USA) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C 980 μl เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 20 pM ดูดสารละลายความเข้มข้น 20 pM 300 μl ไปยังหลอด 1.5 มล. ที่สะอาด และเติม HT1 Hybridization Buffer ที่อุณหภูมิ 2-8 °C 700 μl ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 6 pM ดูดสารละลายความเข้มข้น 6 pM ปริมาตร 600 μl ใส่ลงใน cartridges (MiSeq v2 reagent kit, 300-cycle (Illumina, USA) สำหรับเป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (Illumina MiSeq platform) ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ

ข้อมูลที่ได้จากเครื่อง Miseq sequencer อยู่ในรูปของไฟล์นามสกุล R1_001.fastq และ R2_001.fastq นำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CLC genomics workbench 12 (CLC bio, Aarhus, Denmark) และวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาทำ DNA sequence alignments เพื่อสร้าง DNA substitution matrix โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime version 2020.2 (Biomatters, New Zealand) จากนั้นนำ DNA substitution matrix มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลภายใต้อัลกอริทึม (algorithm) ของวิธีวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม RaxML ภายใต้ระบบ CIPRES portal⁽⁹⁾ ในการคำนวณความน่าจะเป็นของข้อมูลภายใต้โมเดลทางวิวัฒนาการแบบ GTRGAMMA และทำการทดสอบความเชื่อมั่นของ Clade โดยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Bootstrapping analysis จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผล

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย โดยวิธีวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood ภายใต้โมเดลทางวิวัฒนาการแบบ Generalised time-reversible (GTR) พบว่าเชื้อไวรัสจัดแบ่งได้เป็น 2 clades ได้แก่ clade S พบ 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วย กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย และ clade L พบ 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาสามารถจำแนกเชื้อไวรัสได้เป็น 2 clades ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ภายในกลุ่มอย่างชัดเจน ทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสที่กระจายอยู่ในประเทศไทยในกลุ่มผู้ป่วยสถานบันเทิงและสนามมวยมีความสัมพันธ์กัน และมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ในรูปแบบ sister lineage ที่ระบาดในเกาหลีใต้และฮ่องกง โดยมีสายพันธุ์ที่มาจากประเทศสเปนและเม็กซิโกใกล้เคียงรองลงมาในรูปแบบ basal lineage ดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวยมีความแตกต่างจากจีโนมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เดินทางมาจากประเทศจีนในช่วงแรกของการระบาดใน clade L ซึ่งเป็นศูนย์กลางการระบาดของเชื้อในประเทศจีน



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจีโนมของไวรัส SARS-CoV-2 โดยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ค่า bootstrap ที่ 1,000 replications

ความเหมือนของข้อมูลจีโนมของเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม พบมีความใกล้เคียงกันมากโดยเฉพาะจากกลุ่มสถาบันบันเทิง (S) และกลุ่มสนามมวย (S) มีความใกล้เคียงกัน 100% และระหว่างกลุ่มสถานบันเทิง สนามมวย (S) และผู้ที่เดินทางมาจากจีน (L) มีค่าเท่ากับ 99.99% นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมพบว่าเกิดรูปแบบความแตกต่าง 9 ตำแหน่ง ประกอบด้วยตำแหน่งที่ 841(A/G), 2888(C/T), 4336(G/T), 8728(C/T), 9544(C/T), 20080(T/A), 23993(A/G), 27823(G/T) และ 28090(C/T) ดังแสดงในภาพที่ 2

Consensus Variants	1	2,500	5,000	7,500	10,000	12,500	15,000	17,500	20,000	22,500	25,000	27,500	29,816
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020_(S) 2	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2489/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2489/2020_(S) 2	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Nakhonnayok_2829/2020	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2420/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Phatumthani_2980/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2488/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2504/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2492/2020_(S)	G	T	T		T	T			T		A		TC
hCoV-19/Thailand/Bangkok_168/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/Bangkok_323/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/Phuket_247/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/61/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/74/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_68/2020_(L)	A	C	G		C	C			G		G		GT

ภาพที่ 2 ค่า Consensus Variant จากผู้ป่วยกลุ่มสถานบันเทิง สนามมวย (S) และผู้ที่เดินทางมาจากจีน (L) มีความแตกต่างกันของลำดับพันธุกรรม 9 ตำแหน่ง ประกอบด้วยตำแหน่งที่ 841(A/G), 2888(C/T), 4336(G/T), 8728(C/T), 9544(C/T), 20080(T/A), 23993(A/G), 27823(G/T) และ 28090(C/T)

ตารางที่ 1 รายชื่อสายพันธุ์ไวรัส SARS-CoV-2 และข้อมูลอื่นๆ ของแต่ละสายพันธุ์

Virus Name	แหล่งที่มา	Accession ID	Sample type	Genome	Lineage
				Size (nt)	(GISAID clade)
hCoV-19/Thailand/NIH-2492/2020	สถาบันเทว	EPI_ISL_430841	Oropharyngeal swab	29,911	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/NIH-2980/2020	สถาบันเทว	EPI_ISL_434707	Oropharyngeal swab	29,874	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020	สัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วยยืนยัน COVID ที่สนามมวย	EPI_ISL_455605	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/NIH-2489/2020	สัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วยยืนยัน COVID ที่สนามมวย	EPI_ISL_434703	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Nakhonnayok_2829/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455587	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2420/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455604	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_2472/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455605	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2488/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455606	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2489/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455607	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_2504/2020	สนามมวย	EPI_ISL_455608	Oropharyngeal swab	29,891	A.6 (S)
hCoV-19/Thailand/61/2020	เดินทางมาจากจีน	EPI_ISL_403962	Oropharyngeal swab	29,848	B (L)
hCoV-19/Thailand/74/2020	เดินทางมาจากจีน	EPI_ISL_403963	Oropharyngeal swab	29,859	B (L)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_168/2020	เดินทางมาจากจีน	EPI_ISL_450196	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)
hCoV-19/Thailand/Nonthaburi_68/2020		EPI_ISL_447910	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)
hCoV-19/Thailand/Phuket_247/2020		EPI_ISL_447914	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)
hCoV-19/Thailand/Bangkok_323/2020		EPI_ISL_447916	Oropharyngeal swab	29,891	B (L)

วิจารณ์

ปัจจุบันเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) ซึ่งเป็นการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการบ่งชี้ชนิดของเชื้ออุบัติใหม่ เช่น เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 อีกทั้งมีประโยชน์ในการติดตามการกลายพันธุ์ของเชื้อ โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของกรดนิวคลีอิกทั้งชนิดดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ทำให้ทราบข้อมูลที่เป็นปัจจุบันซึ่งนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรค ยารักษาโรค และวัคซีนป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(10, 11)

เชื้อ SARS-CoV-2 ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 6 รูปแบบ (clade) ได้แก่ clade S, L, V, G, GH และ GR อ้างอิงตามฐานข้อมูลสากล GISAID โดยอาศัยตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม 9 ชนิด (genetic markers)⁽⁸⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย พบว่าเชื้อไวรัสที่กระจายตัวในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 clades ได้แก่ clade S ประกอบด้วย กลุ่มสถานบันเทิงและกลุ่มสนามมวย และ clade L ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยที่เดินทางจากประเทศจีน โดยเชื้อไวรัสที่กระจายอยู่ในประเทศไทยในกลุ่มผู้ป่วยสถานบันเทิงและสนามมวยมีความสัมพันธ์กัน และมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ระบาดในเกาหลีใต้และฮ่องกง และสายพันธุ์ที่มาจากประเทศสเปนและเม็กซิโกตามลำดับ แต่มีความแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยที่เดินทางมาจากประเทศจีนในช่วงแรกของการระบาดซึ่งจัดอยู่ใน clade L ในขณะที่ในประเทศอิตาลี พบผู้ป่วย 2 รายแรก ในช่วงเดือนมกราคม 2563 ซึ่งเป็นนักท่องเที่ยว โดยเชื้อไวรัสที่พบจัดอยู่ใน clade V ในระยะต่อมา (เดือนกุมภาพันธ์) พบว่าเชื้อไวรัสที่แพร่กระจายและทำให้เกิดการติดเชื้อ คือ clade G การแพร่ระบาดในสหภาพยุโรปนี้คาดว่าเกิดจากการนำเข้าเชื้อของนักท่องเที่ยวชาวจีนที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการของโรคหรืออยู่ในสภาวะที่ตรวจไม่พบเชื้อ (partially undetected)⁽¹²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mercatelli D และคณะ ซึ่งพบว่า clade G เป็นรูปแบบสายพันธุ์ที่มีความชุกสูงในยุโรปโดยการกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 614 (D614G) จาก Aspartic Acid (D) เป็น Glycine (G) โดยการกลายพันธุ์นี้เกิดในตำแหน่งของยีน spike protein⁽¹³⁾ การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งของยีน spike protein นี้ อาจส่งผลให้เชื้อไวรัสใช้ spike protein ในการเกาะติดกับตัวรับบนผนังเซลล์ของโฮสต์ (host angiotensin-converting enzyme 2; ACE2) ได้ดีขึ้น มีผลทำให้เชื้อมีความสามารถในการติดเชื้อเพิ่มขึ้น⁽¹⁴⁾ จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 ขึ้นกับภูมิศาสตร์⁽¹⁵⁾ และการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (asymptomatic SARS-CoV-2 infection)⁽¹⁶⁾ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคไปในหลายพื้นที่ทั่วโลก

สรุป

การถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ มีความสำคัญต่อการศึกษาวิวัฒนาการของไวรัส (Genetic evolution) ทำให้ทราบต้นกำเนิดและที่มาของเชื้อที่ระบาดในแต่ละเหตุการณ์และความเชื่อมโยงทางด้านระบาดวิทยาโมเลกุล ข้อมูลจากการศึกษาดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์ต่อการวางมาตรการควบคุม ป้องกันโรคติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 รวมถึงการพัฒนาและการเลือกใช้สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัคซีนขึ้นใช้ในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจทุกท่าน ที่ทุ่มเท มุ่งมั่น ตั้งใจปฏิบัติหน้าที่ เป็นกำลังสำคัญของหน่วยงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สอบสวนโรค กรมควบคุมโรค ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ในการสนับสนุนงบประมาณ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. [online]. 2020; [cited 2020 Mar 1]; [1 screen]. Available from: URL: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
2. Okada P, Buathong R, Phuygun S, Thanadachakul T, Parnmen S, Wongboot W, et al. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Euro Surveill* 2020; 25(8): 2000097. (5 pages).
3. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci* 2020; 21(7): 2657. (19 pages).
4. มาลินี จิตตกานต์พิชัย. ปฐมบท COVID-19. ว กรรมวิทย พ. [วารสารออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 10 เมษายน 2563]; 62(1): [5 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://drive.google.com/file/d/1qcVr-2ekz0P-utd-D8EPqL5OjAdMPTPin/view>.
5. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395(10224): 565-74.
6. Marra MA, Jones SJM, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YSN, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003; 300(5624): 1399-404.
7. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol* 2020; 81: 104260. (3 pages).
8. GISAID. Clade and lineage nomenclature. [online]. 2020; [cited 2020 Mar 1]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.gisaid.org/references/statements-clarifications/clade-and-lineage-nomenclature-aids-in-genomic-epidemiology-of-active-hcov-19-viruses/>
9. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. [online]. 2010; [cited 2020 Apr 10]; [7 screens]. Available from: URL: https://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf.
10. Cleemput S, Dumon W, Fonseca V, Karim WA, Giovanetti M, Alcantara LC, et al. Genome detective coronavirus typing tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. *Bioinformatics* 2020; 36(11): 3552-5.
11. Maurier F, Beury D, Fléchon L, Varré JS, Touzet H, Goffard A, et al. A complete protocol for whole-genome sequencing of virus from clinical samples: application to coronavirus OC43. *Virology* 2019; 531: 141-8.
12. Bartolini B, Rueca M, Gruber C, Messina F, Carletti F, Giombini E, et al. SARS-CoV-2 phylogenetic analysis, Lazio Region, Italy, February-March 2020. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(8): 1842-5.
13. Mercatelli D, Giorgi FM. Geographic and genomic distribution of SARS-CoV-2 mutations. *Front Microbiol* 2020; 11: 1800. (13 pages).



14. Shah M, Ahmad B, Choi S, Woo HG. Sequence variation of SARS-CoV-2 spike protein may facilitate stronger interaction with ACE2 promoting high infectivity. Research Square. [online]. 2020; [cited 2020 Apr 10]; [21 screens]. Available from: URL: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-16932/v1/manuscript.pdf>.
 15. Brufsky A. Distinct viral clades of SARS-CoV-2: implications for modeling of viral spread. J Med Virol 2020; 92: 1386-90.
 16. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection a narrative review. Ann Intern Med 2020; 173(5): 362-7.
-

SARS-CoV-2 : PUB and Boxing Stadium in Bangkok, Thailand

Pilailuk Akkapaiboon Okada¹ Siripaporn Phuygun¹ Sitthiporn Parnmen¹
Thanutsapa Thanadachakul¹ Sirichol Kala¹ Wandee Meechalard¹ Hathaikan Thanchai¹
Pakorn Piromtong¹ Warawan Wongboot¹ Ratana Tacharoenmuang¹
Sunthareeya Waicharoen¹ Malinee Chittaganpitch² Ballang Uppapong¹
and Opart Karnkawinpong³

¹National Institute of Health, ²Medical Sciences Technical Office, ³Department of Medical Sciences
Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Thailand was firstly confirmed on January 8, 2020 from the patient travelling from China, and the widespread infection of COVID-19, originally from a boxing stadium and pubs in Bangkok, has rapidly occurred in March. This study was to investigate the entire genome of SARS-CoV-2 from the two groups of patients with Thai nationality. Phylogenetic analysis was performed based on whole genome sequences of isolated SARS-CoV-2 derived from clinical samples of patients. Viral genotyping for both groups revealed that the virus infection was caused by clade S with a sister lineage to the strains from South Korea and Hong Kong and a basal lineage to the strains from Spain and Mexico. Our findings showed differences from clade L that was isolated from the Chinese patient during the initial COVID-19 outbreak in Thailand. It suggested that the genetic evolution of SARS-CoV-2 in Thailand was different from that in the epicenter of the outbreak in China.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, Phylogenetic analysis