



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาเชิงสำรวจความชุกและจีโนไทป์ของ
ไวรัสตับอักเสบบีในสุกรของประเทศไทย

โดย

น.สพ.ดร.วิทวัช วิริยะรัตน์ และคณะ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พฤษภาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาเชิงสำรวจความชุกและจีโนไทป์ของ ไวรัสตับอักเสบบีในสุกรของประเทศไทย

น.สพ. ดุสิต เลาสินณรงค์ หัวหน้าโครงการปีที่ 1
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

น.สพ.ดร.วิฑูรย์ วัชรรัตน์ หัวหน้าโครงการปีที่ 2
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร.เอื้อมพร สิริปัญญาภิบาล ผู้ร่วมวิจัย
ศูนย์ความร่วมมือการวิจัยโรคติดต่ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำระหว่างประเทศไทย
กับประเทศญี่ปุ่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาในครั้งนี้ ตลอดจนบุคลากรที่เกี่ยวข้องทุกท่านจากหน่วยงานต้นสังกัดของผู้วิจัย และฟาร์มสุกรที่อนุญาตให้ผู้วิจัยเข้าไปทำการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DIG5180009

การศึกษาเชิงสำรวจความชุกและจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบอีในสุกรของประเทศไทย

ดุสิต เลหาสินณรงค์¹ วิทวัช วิริยะรัตน์¹ เอ็มพร สิริปัญญาภิญโญ²

¹ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ² ศูนย์ความร่วมมือการวิจัยโรคติดต่ออุบัติใหม่และ
อุบัติซ้ำระหว่างประเทศไทยกับประเทศญี่ปุ่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

E-mail: vswwr@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

ไวรัสตับอักเสบอีเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันในคน พบการระบาดได้ในหลายประเทศของทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกา ติดต่อผ่านทางอาหารและน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนอุจจาระของผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย ไวรัสตับอักเสบอีถือว่าเป็นโรคสัตว์สู่คนเมื่อมีการรายงานการติดเชื้อจากการกินเนื้อสุกรป่า ในประเทศไทยเคยมีรายงานการพบไวรัสตับอักเสบอีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบอี แต่ไม่มีรายงานการสำรวจโรคจากพื้นที่อื่นๆของประเทศ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงทำการสำรวจโรคไวรัสตับอักเสบอีในสุกรเพิ่มเติมให้ครอบคลุมพื้นที่มากขึ้น โดยทำการเก็บตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในภาคต่างๆ แล้วนำมาตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Semi-nested reverse transcription PCR พบอัตราการการพบเชื้อไวรัสตับอักเสบอีจากมูลสุกรสูงสุดคือฟาร์มในเขตภาคกลางตอนบน (52%) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน (29.1%) ภาคตะวันตก (28.1%) ภาคเหนือตอนบน (20%) ตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง (18.5%) และภาคกลาง (14.5%) ตามลำดับ และจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆจำนวน 482 ตัวอย่างให้ผลบวก 106 ตัวอย่างคิดเป็น 21.9% นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสตับอักเสบอีที่พบในมูลสุกรในการศึกษานี้เป็นไวรัสตับอักเสบอีจีโนไทป์ 3 ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์ที่ติดต่อมาสู่คนได้ ดังนั้นจากผลของการศึกษาบ่งบอกว่าประเทศไทยมีความเสี่ยงสูงที่จะพบผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบอีเพิ่มสูงขึ้น ผ่านทางการบริโภคเนื้อสุกรที่ไม่ผ่านการปรุงสุกที่ปนเปื้อนเชื้อ หรือได้รับเชื้อผ่านทางน้ำดื่มที่ปนเปื้อนของเสียจากสุกรที่ติดเชื้อ โดยของเสียที่ไม่ได้รับการบำบัดอย่างเพียงพอแล้วปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมหรือแหล่งน้ำที่ประชาชนใช้บริโภค

คำสำคัญ ไวรัสตับอักเสบอี สุกร ความชุก จีโนไทป์ ประเทศไทย

Abstract

Project Code : DIG5180009

The Survey Study on Prevalence and Genotype of Swine Hepatitis E Virus in Thailand

Dusit Laohasinnarong¹ Witthawat Wiriyarat¹ Uamporn Siripanyaphinyo²

¹Faculty of Veterinary Science, Mahidol University , ²Thailand-Japan Research
Collaboration Center on Emerging and Re-emerging Infections

E-mail: vswwr@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Hepatitis E virus (HEV) is one of a major cause of acute hepatitis in humans. The outbreaks could be found in several countries of Asia, Africa and North Americas. The major transmitting route is food or drinking water contaminating with feces of infected human or animal. HEV is considered as zoonotic diseases according to previously report of human cases which were infected from eating infected wild boar meat. In Thailand, the recently reports show high positive rate of pigs in West area were infected with HEV but the data from other areas of the country are not present. Therefore, the aim of this study is to perform HEV survey in pig farm for more information of this pathogen spreading situation in Thailand. The fecal specimen were collected from pig farms in various regions for HEV RNA detection by Semi-nested reverse transcription PCR. The study result showed the high positive rate of HEV infection in pig from several region as following; 52% in Upper central, 29.1% in Upper Northeast, 28.1% in West, 20% in Upper North, 18.5% in Lower Northeast and 14.5% in Central. Overall, 106 of 482 (21.9%) samples were positive. Only hepatitis E genotype 3, which is zoonotic pathogen, was found in this study. Therefore, the results indicated that Thailand has a high-risk to meet hepatitis E outbreak in human via eating contaminated raw pork or via drinking water which contaminated by infected pig wastes that did not receive adequate treatment distributed to the environment or water reservoir.

Keywords: Hepatitis E Virus, Pig, Prevalence, Genotype, Thailand

บทนำ

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นสมาชิกหนึ่งเดียวของสกุล *Hepevirus* ในวงศ์ *Hepeviridae* มี 4 จีโนไทป์ (genotype) ได้แก่ จีโนไทป์ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคตับอักเสบบีแบบเฉียบพลันในคน พบการระบาดได้ในหลายประเทศของทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกา จากข้อมูลทางระบาดวิทยา พบว่าปี ค.ศ.1955 (พ.ศ.2498) เกิดการระบาดครั้งใหญ่ที่เมืองนิวเดลี ประเทศอินเดีย ซึ่งมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 29,000 คน (แต่ในขณะนั้นเข้าใจว่าเป็นการระบาดของไวรัสตับอักเสบบีเอ) ปี ค.ศ.1976 (พ.ศ.2519) พบการระบาดในประเทศไทย มีผู้ติดเชื้อประมาณ 20,000 คน

การติดต่อของไวรัสตับอักเสบบีเป็นการติดเชื้อผ่านทางอาหารและน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนอุจจาระของผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย อาการที่พบมักเป็นแบบเฉียบพลันและหายป่วยเองได้ในคนกลุ่มเสี่ยงคือผู้ที่อายุระหว่าง 15 – 40 ปี อัตราการตายประมาณร้อยละ 1 – 2 ซึ่งสูงกว่าอัตราการตายในกรณีของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเอ (ประมาณร้อยละ 0.4) ในหญิงตั้งครรภ์ หากติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะพบอัตราการตายสูงขึ้นประมาณร้อยละ 15 – 25 ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาสำคัญของการสาธารณสุข

Meng และคณะ(1997) รายงานการพบไวรัสตับอักเสบบีในลูกสุกรที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งถือว่าเป็นรายงานแรกที่พบไวรัสตับอักเสบบีในสัตว์ ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาไวรัสตับอักเสบบีถูกเฝ้าระวัง เนื่องจากไวรัสที่เพาะได้จากสุกรมีความคล้ายคลึงกับไวรัสตับอักเสบบีที่เพาะได้ในคน ประเทศกรีซมีรายงานการสำรวจในสุกรปกติพบความชุกของภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 76 (Siochu, et al., 2006) ในประเทศไทยรายงานครั้งแรกพบว่าสุกรขุนมีภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีร้อยละ 40.00 โดยพบในสุกรที่มีอายุมากกว่า 2 เดือน (Meng, et al., 1999) อย่างไรก็ตามรายงานล่าสุดซึ่งเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสุกรมีภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 50.41 ซึ่งสูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ ที่สำคัญเป็นรายงานแรกของประเทศไทยที่พบภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีในสุกรอายุ 1-2 เดือน (Laohasinnarong, et al., 2007)

นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีได้ในสัตว์หลายชนิดที่ประเทศอินเดีย อาทิ สัตว์ฟันแทะ สุนัข และโค (Arankalle, et al., 2001) สำหรับการสำรวจในคนพบว่าในประเทศไทยผู้ปฏิบัติงานในฟาร์มสุกรมีภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีร้อยละ 100 ขณะที่ประเทศไทยพบประมาณร้อยละ 71 (Meng, et al., 1999) อีกรายงานหนึ่งเป็นการสำรวจเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร พบว่ามีภูมิคุ้มต่อไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 51.1 ซึ่งมักจะเป็นเกษตรกรที่มีประวัติทำงานในส่วนของแม่สุกรโดยเฉพาะขณะแม่สุกรคลอดลูก (Drobeniuc, et al., 2001) อย่างไรก็ตามจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีมีความสำคัญต่อความสามารถในการติดต่อระหว่างสัตว์และคน โดยพบว่าจีโนไทป์ 1 และ 2 มักพบในคน ขณะที่จีโนไทป์ 3 และ 4 พบในสัตว์และคน ในประเทศไทยพบจีโนไทป์ 3 (Cooper, et al., 2005) ทว่ารายงานการสำรวจในประเทศไทย

ไวรัสตับอักเสบบีได้รับการยอมรับว่าเป็นโรคสัตว์สู่คนเมื่อมีการรายงานการติดเชื้อจากการกินเนื้อสัตว์ โดยพบผู้ป่วยตับอักเสบบีแบบเฉียบพลันหลังจากกินเนื้อสุกรป่า (Masuda, et al., 2005) ซึ่งความชุกของไวรัสตับอักเสบบีในสุกรป่าในประเทศญี่ปุ่นประมาณร้อยละ 9 (Sonoda, et al., 2004) อีกรายงานเป็นการติดเชื้อจากสุกรป่าเช่นเดียวกัน โดยพบว่าไวรัสตับอักเสบบีนั้นเป็นจีโนไทป์ 3 (Li, et al., 2005) ซึ่งเป็นรายงานแรกที่พบว่าไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 3 ติดต่อสู่คนได้ ทำให้ไวรัสตับอักเสบบีถือว่าเป็นโรคสัตว์สู่คน

เนื่องจากความสำคัญของไวรัสตับอักเสบบีทวีมากขึ้น แม้ว่าในประเทศไทยจะมีการสำรวจและรายงานไปบ้างแล้ว แต่ยังสำรวจไม่มากนัก โดยครั้งแรกสำรวจหลายภูมิภาค (Meng, et al., 1999) แต่พบความชุกของภูมิกัมต่อไวรัสตับอักเสบบีน้อยกว่าครึ่งล่าสุด ซึ่งสำรวจเฉพาะภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครปฐมและราชบุรี ซึ่งถือว่าเป็นจังหวัดที่มีการเลี้ยงสุกรมากที่สุด (Laohasinnarong, et al., 2007) นอกจากนี้มีรายงานพบไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 1 จากสุกรที่ประเทศกัมพูชา (Caron, et al., 2006) กอปรกับความสำคัญในแง่ของโรคสัตว์สู่คน จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสำรวจให้มากขึ้น เพื่อให้ทราบสถานภาพที่ใกล้เคียงความเป็นจริงของประเทศไทย เพื่อจะได้นำความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้มาประยุกต์ใช้เพื่อการวางแผนควบคุมป้องกันโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสำรวจความชุกของโรคตับอักเสบบีในสุกรของประเทศไทย
2. เพื่อทราบสถานภาพของโรคตับอักเสบบีในสุกรของประเทศไทย
3. เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีที่พบในสุกรของประเทศไทย
4. เพื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาประยุกต์ใช้เพื่อการวางแผนการป้องกันการติดต่อกับสัตว์สู่คน

วิธีการทำการทดลอง

1. ตัวอย่างมูลสุกรเพื่อตรวจหาไวรัสตับอักเสบบี

ผู้วิจัยได้ทำการประสานงานติดต่อเพื่อขอเก็บตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มสุกรที่ยินดีให้ผู้วิจัยเข้าไปทำการเก็บตัวอย่างได้ จากภาคต่างๆของประเทศไทย คือ ภาคเหนือตอนบน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและตอนล่าง ภาคกลาง ภาคกลางตอนบน ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก ตัวอย่างมูลสุกรที่เก็บมาจะถูกเจือจางใน Phosphate-buffered saline (PBS) ให้ได้ 10% w/v และเก็บโดยแช่เย็นไว้จนกระทั่งส่งถึงห้องปฏิบัติการ

2. การเตรียมตัวอย่าง

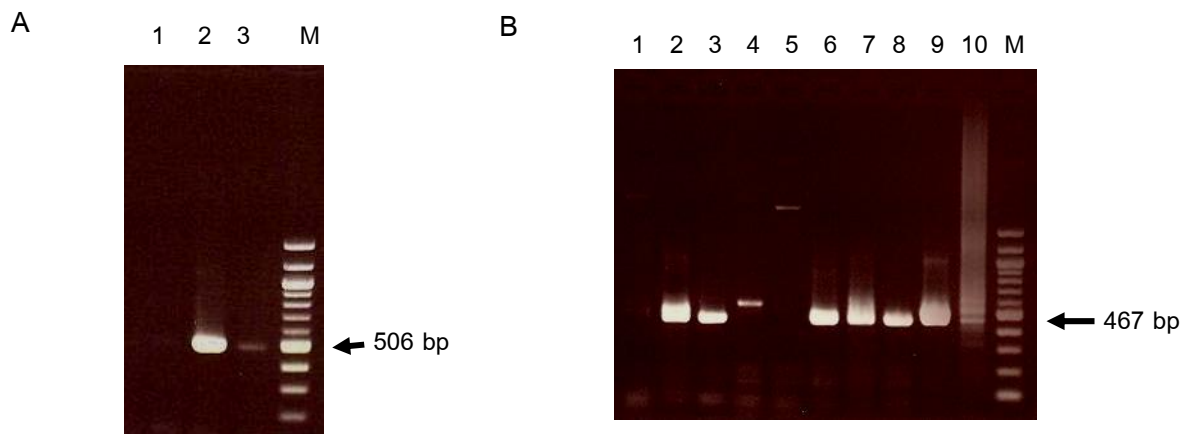
ตัวอย่างมูลสุกรที่เก็บใน Phosphate-buffered saline (PBS) จะถูกนำมาเขย่าเพื่อให้มูลสุกรละลาย จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 2000x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4C นำ Supernatant ที่ได้จะนำไปสกัด RNA ทันที หรือแช่แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจโดยวิธี RT-PCR ต่อไป

3.การสกัด RNA จากตัวอย่างและกระบวนการ Semi-nested RT-PCR เพื่อตรวจหา HEV

นำสารละลายที่ได้จากการปั่นตกตะกอน 250 µl มาทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด RNA สำเร็จรูป (TRIzol LS, Invitrogen; Carlsbad, CA) จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาละลายในน้ำที่ปราศจาก RNase ในปริมาณ 100 µl และนำไปเข้าสู่กระบวนการ Reverse transcription และ PCR รอบแรกโดยใช้ One step RT-PCR kit (QIAGEN; Valencia, CA) โดยในสารละลาย PCR ประกอบไปด้วย 5XQIAGEN OneStep RT-PCR buffer จำนวน 10 µl deoxynucleotide triphosphate (dNTP) mixture (containing 10 mM of each dNTP) จำนวน 2 µl reverse primer HE040 (20 pmol/ml) จำนวน 1.5 µl forward primer HE044 (20 pmol/ml) จำนวน 1.5 µl QIAGEN OneStep RT-PCR enzyme mix จำนวน 2 µl, RNase OUT RNA inhibitor (40 U/µl; Invitrogen) จำนวน 1 µl template RNA จำนวน 5 µl, และ RNase-free water จำนวน 27 µl โดยใช้ PCR condition ดังนี้ reverse transcription 30 นาทีที่อุณหภูมิ 50C จากนั้นเริ่มขั้นตอน initial PCR activation 15 นาทีที่อุณหภูมิ 95C จากนั้นเข้าสู่วงจรกระบวนการปฏิกิริยา PCR คือ 94C 30 วินาที 55C 30 วินาที 72C 75 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 72C 7 นาที ในรอบสุดท้าย นำ PCR product ที่ได้ไปใช้เป็น template DNA ในการทำ PCR รอบที่สอง โดยในสารละลาย PCR รอบที่สองประกอบไปด้วย PCR product จากรอบแรก ปริมาณ 5 µl

10X PCR buffer ปริมาณ 4 µl dNTP mixture ปริมาณ 1 µl reverse primer HE041 (20 pmol/µl) ปริมาณ 1 µl forward primer HE044 (20 pmol/µl) ปริมาณ 1 µl TaKaRa Ex Taq (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) ปริมาณ 0.5 µl และน้ำกลั่นปริมาณ 33.5 µl โดยใช้ ขั้นตอน initial PCR activation 12 นาทีที่อุณหภูมิ 94C และวงจรกระบวนการปฏิกิริยา PCR คือ 94C 30 วินาที 55C 30 วินาที 72C 60 วินาที จำนวน 25 รอบและ 72C 7 นาที ในรอบสุดท้าย

อ่านผล PCR โดยการนำ PCR product ทั้งจากรอบแรกและรอบที่ 2 ผ่านกระบวนการ agarose gel electrophoresis ย้อมสี ethidium bromide และ อ่านผลภายใต้แสง UV โดย PCR product รอบแรกต้องมีขนาด 506 base pairs (bp) และ PCR product รอบที่สองต้องมีขนาด 467 bp ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผล Gel electrophoresis เพื่อตรวจหา HEV ในมูลสุกรด้วยวิธี Semi-nested RT-PCR โดยนำ PCR product มาแยกขนาดด้วยไฟฟ้าบนวุ้น 1.5% agarose เปรียบเทียบกับ DNA marker (M) A) แสดงผลที่ได้จากการทำ PCR รอบแรก product ต้องมีขนาด 506 base pairs จากรูปพบผลบวกในแถวที่ 2 และ 3 B) แสดงผล PCR รอบที่สอง โดย PCR product ต้องมีขนาด 467 base pairs จากรูปพบผลบวกในแถวที่ 2 3 6 7 8 และ 9

4. การทำ Nucleotide Sequencing

ผู้วิจัยได้คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพื่อนำมาศึกษาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างนั้นโดยการทำ Nucleotide Sequencing โดย PCR product ที่ได้จากการเพิ่มขยายสารพันธุกรรม โดยวิธี RT-PCR ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Gel electrophoresis and gel extraction จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี Sanger dideoxy-mediated chain-terminator method โดยใช้ dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems; Foster City, CA) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส ABI PRISM 3100XL (Applied Biosystems) ทำการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยนำมาเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน (Nucleotide/protein alignment) โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทาง Bioinformatics เช่น โปรแกรม BioEdit หรือ BLAST เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank

ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างมูลสุกรด้วยวิธี Semi-nested RT-PCR ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มสุกรในเขตภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยได้แก่ ภาคเหนือตอนบน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและตอนล่าง ภาคกลาง ภาคกลางตอนบน ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก พบว่าสามารถพบไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเกือบทุกภูมิภาค ยกเว้นฟาร์มจากภาคตะวันออกเท่านั้นที่ไม่พบผลบวก ดังแสดงในตารางที่ 1 ถึง 7

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคเหนือตอนบน

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	-	-
	1	5	1 (20%)
	2	5	3 (60%)
	3	5	1 (20%)
	4	5	0
	5	5	0
	6	5	1 (20%)
	Sows	-	-
	Boars	-	-
Total		30	6 (20%)

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	-	-
	1	10	1 (10%)
	2	10	0
	3	10	0
	4	10	0
	5	10	5 (50%)
	6	10	0
	Sows	-	-
	Boars	-	-
2	<1	-	-
	1	10	4 (40%)
	2	10	4 (40%)
	3	10	10 (100%)
	4	10	4 (40%)
	5	10	4 (40%)
	6	10	3 (30%)
	Sows	-	-
	Boars	-	-
Total		120	35 (29.1%)

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	0	
	1	10	0
	2	10	0
	3	10	0
	4	10	1 (10%)
	5	10	1 (10%)
	6	10	9 (90%)
	Sows	9	1 (11%)
	Boars	1	1 (100%)
Total		70	13 (18.5%)

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคกลางตอนบน

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	-	-
	1	5	5 (100%)
	2	5	2 (40%)
	3	5	3 (60%)
	4	5	1 (20%)
	5	5	2 (40%)
	6	-	-
	Sows	-	-
	Boars	-	-
Total		25	13 (52%)

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคกลาง

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	-	-
	1	10	5 (50%)
	2	10	2 (20%)
	3	10	3 (30%)
	4	10	2 (20%)
	5	10	2 (20%)
	6	5	1 (20%)
	Sows	2	0
	Boars	-	-
2	<1	10	0
	1	10	0
	2	10	0
	3	10	0
	4	10	2 (20%)
	5	10	0
	6	10	2 (20%)
	Sows	4	0
	Boars	-	-
Total		131	19 (14.5%)

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคตะวันออก

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	-	-
	1	5	0
	2	5	0
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	Sows	8	0
	Boars	2	0
2	<1	-	-
	1	5	0
	2	5	0
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	Sows	3	0
	Boars	2	0
Total		35	0

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจหาไวรัสตับอักเสบอีในตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มในเขตภาคตะวันตก

Farm	Age (months)	No. of samples	No. of positive HEV RNA (%positive)
1	<1	-	-
	1	10	1 (10%)
	2	10	2 (20%)
	3	10	7 (70%)
	4	10	7 (70%)
	5	10	1 (10%)
	6	10	2 (20%)
	Sows	11	0
	Boars	-	-
Total		71	20 (28.1%)

จากการศึกษาพบว่าสามารถพบไวรัสตับอักเสบอีจากมูลสุกรเกือบทุกกลุ่มยกเว้นสุกรที่มีอายุน้อยกว่า 1 เดือน ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างที่น้อย และจากการสำรวจพบว่าพื้นที่ที่พบอัตราการการพบเชื้อไวรัสตับอักเสบอีจากมูลสุกรสูงสุดคือฟาร์มในเขตภาคกลางตอนบน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ภาคตะวันตก ภาคกลาง ภาคเหนือตอนบนและตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ภาพรวมการพบไวรัสตับอักเสบอีในมูลสุกรจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย

เขตพื้นที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบ HEV (%positive)
กลางตอนบน	25	13 (52%)
ตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน	120	35 (29.1%)
ตะวันตก	71	20 (28.1%)
เหนือตอนบน	30	6 (20%)
ตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง	70	13 (18.5%)
กลาง	131	19 (14.5%)
ตะวันออก	35	0
รวม	482	106 (21.9%)

จากนั้นตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 38 ตัวอย่างได้นำมาศึกษาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีโดยการทำ Nucleotide Sequencing เพื่อศึกษาลำดับเบสและนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank พบว่าทั้ง 38 ตัวอย่าง (ดังแสดงในภาคผนวก) เป็นไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 และผู้วิจัยยังไม่พบจีโนไทป์อื่นๆใดในการศึกษาครั้งนี้

บทวิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสุกรในประเทศไทยมีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดีสูงมากในเกือบทุกภูมิภาคของประเทศคือตั้งแต่ 14.5% จนถึง 52% ยกเว้นภาคตะวันออกที่ไม่พบสุกรติดเชื้อ ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างและจำนวนฟาร์มที่ทำการสำรวจในการศึกษานี้มีน้อย อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้แสดงว่าประเทศไทยเป็นพื้นที่การระบาด (Endemic area) ของไวรัสตับอักเสบบีชนิดีในสุกรที่พบว่ามีค่าชุกถึง 21.9% และสามารถพบการติดเชื้อในสุกรที่มีอายุ 1 เดือนขึ้นไปรวมถึงในสุกรพ่อแม่พันธุ์และสุกรขุนที่มีอายุและน้ำหนักถึงเกณฑ์ ส่งขายเข้าสู่ตลาด ผลของการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สุกรจากฟาร์มในเขตตะวันตกของประเทศไทยมีการติดเชื้อ HEV ในอัตรา 7.75% และจีโนไทป์ที่พบคือ จีโนไทป์ 3 เท่านั้น (Siripanyaphinyo et al. 2009) เช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาครั้งนี้

ไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 ถือว่าเป็นไวรัสที่สามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คน (viral zoonosis) ได้ ดังที่เคยมีรายงานในหลายๆประเทศ ที่พบผู้ป่วยตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 ได้แก่ ญี่ปุ่น เกาหลี สหรัฐอเมริกา กรีซ อังกฤษ สเปน อิตาลี อาร์เจนตินา และออสเตรเลีย (Okamoto et al. 2007) สำหรับในประเทศไทยโดยการสำรวจทางซีรัมวิทยาพบว่าอุบัติการณ์ของไวรัสตับอักเสบบีในคนมีอัตราการที่เคยสัมผัสเชื้อ 9 ถึง 22% แต่จำนวนผู้ป่วยที่แสดงอาการป่วยนั้นยังมีอยู่ในระดับต่ำ (Suwannakarn et al. 2010) อย่างไรก็ตามรายงานล่าสุดที่พบผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 2 ราย ในประเทศไทยพบว่าเกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 ซึ่งสันนิษฐานว่า อาจติดเชื้อมาจากสุกร เนื่องจากเชื้อไวรัสที่พบในผู้ป่วยมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 3 ที่พบในสุกร (Suwannakarn et al. 2010, Rianthavorn et al. 2010)

ดังนั้นการที่พบว่าสุกรในประเทศไทยมีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 อยู่ในระดับที่สูงย่อมอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพโดยรวมของผู้บริโภค ผู้ปฏิบัติงานกับสุกร รวมถึงประชาชนที่อาศัยอยู่ใกล้กับฟาร์มสุกร เนื่องจากทางในการติดต่อที่สำคัญของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั้นเกิดจากทางการกินอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ เมื่อประชาชนมีสุขลักษณะที่ดีไม่เพียงพอเช่น กินเนื้อสุกรดิบ การขายซากสุกรที่ชำแหละอย่างไม่ถูกสุขลักษณะแล้วเกิดการปนเปื้อนเชื้อจากมูลสุกร การดื่มและใช้น้ำจากแหล่งน้ำที่ปนเปื้อน ต่างๆเหล่านี้อาจทำให้จำนวนผู้ป่วยด้วย โรคนี้ในอนาคตอาจเพิ่มสูงขึ้น จนเป็นปัญหาทางการสาธารณสุขและส่งผลต่อ

เอกสารอ้างอิง

- Arankalle, V.A., Joshi, M.V., Kulkarni, A.M., Gandhe, S.S., Chobe, L.P., Rautmare, S.S., Mishra, A.C., and Padbidri, V.S. 2001. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral Hepat.* 8:223-227.
- Caron, M., Enouf, V., Than, S.C., Dellamonica, L., Buisson, Y., and Nicand, E. 2006. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J. Clin. Microbiol.* 44:3440-3442.
- Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C.D., Bezanilla, J.C., Toth, T.E., and Meng, X.J. 2005. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J. Clin. Microbiol.* 43:1684-1688.
- Drobeniuc, J., Favorov, M.O., Shapiro, C.N., Bell, B.P., Mast, E.E., Dadu, A., Culver, D., Iarovoi, P., Robertson, B.H., and Margolis, H.S. 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184:1594-1597.
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D.K., Huang, F.F., Thomas, P.J., Meng, X.J., and Halbur, P.G. 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J. Clin. Microbiol.* 42:5047-5052.
- Laohasinnarong, D., Kaeoket, K., Siripanyapinyo, U., Kameoka, M., Ikuta, K., and Nishimune, Y. 2007. Preliminary survey study of antibody to swine hepatitis E virus in the western part of Thailand. *Proceedings of the 3rd congress of the Asian pig veterinary society. Wuhan, China. April 22-25.*

- Li, T.C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., and Miyamura, T. 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1958-1960.
- Masuda, J., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., and Kohno, S. 2005. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol. Res.* 31:178-183.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., and Emerson, S.U. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:9860-9865.
- Meng, X.J., Dea, S., Engle, R.E., Friendship, R., Lyoo, Y.S., Sirinrumit, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D., Yoo, D., Zhang, Y., Purcell, R.H., and Emerson, S.U. 1999. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J. Med. Virol.* 59:297-302.
- Rianthavorn P, Thongmee C, Limpaphayom N, Komolmit P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2010 . The entire genome sequence of hepatitis E virus genotype 3 isolated from a patient with neuralgic amyotrophy. *Scand J Infect Dis May*;42(5):395-400.
- Siochu, A., Alexopoulos, C., Tzika, E.D., Kyriakis, S.C., Froesner, G., and Sossidou, E.N. 2006. Prevalence of anti-hepatitis E virus IgG in swine in Greece. *Proceedings of the 3rd congress of the Asian pig veterinary society. Wuhan, China. April 22-25.*
- Siripanyaphinyo, U., Laohasinnarong, D., Siripanee, J., Kaeoket, K., Kameoka, M., Ikuta, K., Sawanpanyalert, P., 2009, Full-length sequence of genotype 3 hepatitis E virus derived from a pig in Thailand. *J Med Virol* 81, 657-664.
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. 2004. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42:5371-5374.
- Suwannakarn K, Tongmee C, Theamboonlers A, Komolmit P, Poovorawan Y. 2010. Swine as the possible source of hepatitis E virus transmission to humans in Thailand. *Arch Virol Oct*;155(10):1697-9.

Wibawa ID, Suryadarma IG, Mulyanto, Tsuda F, Matsumoto Y, Ninomiya M, Takahashi M, and Okamoto H. 2007. Identification of genotype 4 hepatitis E virus strains from a patient with acute hepatitis E and farm pigs in Bali, Indonesia. *J. Med. Virol.* 79:1138-1146.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

กำลังดำเนินการ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

● **เชิงพาณิชย์**

ไม่มี

● **เชิงนโยบาย**

ไม่มี

● **เชิงสาธารณะ**

กลุ่มผู้วิจัยได้เริ่มสร้างเครือข่ายความร่วมมือภายในประเทศในการ
สำรวจโรคตับอักเสบอีในสัตว์ป่า ผ่านทางการดำเนินงานของศูนย์เฝ้าระวังและ
ติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล นอกจากนี้ยังเข้าร่วมเครือข่าย Thailand One Health ที่เกิดขึ้น
จากบุคลากรจากหน่วยงานด้านสุขภาพ ด้านปศุสัตว์ ด้านงานอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม
และนักวิจัยในมหาวิทยาลัย เพื่อประสานข้อมูล องค์ความรู้ และประสบการณ์ที่แต่ละ
หน่วยงานมีมาใช้ประโยชน์ในการทำให้สุขภาพของคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม มีความ
มั่นคงปลอดภัยยิ่งขึ้น โดยผ่านทางกิจกรรมของเครือข่าย Thailand One
Health นี้

3. อื่นๆ

ผู้วิจัยได้นำข้อมูลจากการศึกษานำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ
Asian Pig Veterinary Society 2009 เมืองซูบะ ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 26-28 ตุลาคม
พ.ศ. 2552

ภาคผนวก

แสดงข้อมูลลำดับ Nucleotide ในส่วน ORF2 ที่ได้จากการศึกษา

1_6_041

TTGAGACATCGGGTGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTCTGTATCCACGG
CTCCCCTGTAACTCCTATACTAACACACCCTACACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTTGCGC
TCGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGAACACTAACACCCGTGTGTCCCGTTATACTAGC
ACAGCCCCGGCACCCTTTGCGTCGTGGTGCCGATGGGACAGCCGAGCTCACGACCACTGCGGCC
ACACGTTTTATGAAGGATTTGCACTTCACCGGGACAAATGGCGTTGGTGAGGTAGGTCGCGGCAT
AGCCCTAACGTTATTTAATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGTTGCCGACAGAATTGATTTCTGC
GGCTGGAGGTCAGCTGTTCTACTCCCG

1_6_044

TCAGGCTTGTTATGCTCTGTATCCACGGCTCCCCTGTAACTCCTATACTAACACACCCTACACC
GGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTTGCGCTCGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGAACA
CTAACACCCGTGTGTCCCGTTATACTAGCACAGCCCGGCACCCTTTGCGTCGTGGTGCCGATGG
GACAGCCGAGCTCACGACCACTGCGGCCACACGTTTTATGAAGGATTTGCACTTCACCGGGACA
AATGGCGTTGGTGAGGTAGGTCGCGGCATAGCCCTAACGTTATTTAATCTTGCTGATACACTTCT
CGGCGGGTTGCCGACAGAATTGATTTCTCGGCTGGAGGTCAGCTGTTCTACTCCCG

2_4_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTAAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTG
CGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

2_4_044

GCTTGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTAAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGG
CATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAAC
ACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGGGACG
GCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGG
CGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCG
GGCTGCCGACAGAATTGATTTCTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

2_10_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTTGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

2_10_044

CTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGC
ATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACA
CCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGTGACGGGACGG
CCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGC
GTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTTGCGGG
GCTGCCGACAGAATTGATTCGTGCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_1_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCAACTG

3_1_044

ATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATAC
CGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAAC
ACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGTGACG
GGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGAC
AAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTC
TCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGTGCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_2_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC

ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCAACT

3_2_044

TCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACC
GGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACA
CTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGG
GACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAA
ACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTC
GGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGTGCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_4_041

TCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACC
GGGGCATTGGGGCTCCTTGACTTTGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACAC
TAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGGG
ACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAA
CGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCG
GCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGTGCGGCTGGAGG

3_4_044

AGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACA
GCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACA
CGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCgTGGTATAGC
CCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGTGCG
CTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_5_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCAACTGT

3_5_044

TCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACC
GGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACA

CTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGG
GACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAA
ACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTC
GGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTTCGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_6_041

TTGAGACATCCGGCGTGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCCGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTTCG
CGGCTGGAGgCCAACCTGTTTC

3_6_044

CTTGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGC
ATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCCGGGAACACTAACA
CCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGG
CCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGC
GTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGG
GCTGCCGACAGAATTGATTTTCGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_8_041

TTGAGACATCCGGCGTGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCCGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGAT

3_8_044

TTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCC
TCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCCGGGAACACTAACACCCGTGTATCC
CGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACA
ACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGT
AGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAG
AATTGATTTTCGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_10_041

TTGAGACATCCGGCGTGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCCGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTG
CGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

3_10_044

GGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCCGGAACA
CTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGG
GACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAA
ACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTC
GGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

4_2_041

TTGAGACATCGGGTGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCCTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAACACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTTCTTGATTTTGA
CGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGAACACTAATACCCGAGTGTCCCGCTATACCAGCA
CAGCCCGACACCGTTTGCCTCGTGGTGCCGATGGGACAGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCAC
ACGTTTTATGAAGGATTTGCATTTACCGGGACAAATGGTGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAG
CCCTAACGCTATTTAATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTG
GCTGGAGGTCAACTGT

4_2_044

TGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAACACGCCCTATACCGGGGCAT
TGGGGCTTCTTGATTTTGA
CGACTCGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGAACACTAATACCC
GAGTGTCCCGCTATACCAGCACAGCCCGACACCGTTTGCCTCGTGGTGCCGATGGGACAGCCG
AGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGATTTGCATTTACCGGGACAAATGGTGTT
GGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCT
GCCGACAGAATTGATTTCTGTCGGCTGGAGGTCAACTGTTCTACTCCCG

4_3_041

TTGAGACATCCGGCGTGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT

AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTTCGT
CGGCTGGAGGCCAACTGT

4_3_044

TTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACGGGGCA
TTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACAC
CCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGC
CGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCG
TTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGG
CTGCCGACAGAATTGATTTTCGTTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

4_6_041

TTGAGACATCCGGCGTGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTTCGT
CGGCTGGAGGCCAACT

4_6_044

CTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACGGGGC
ATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACAC
CCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGG
CCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGC
GTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGG
GCTGCCGACAGAATTGATTTTCGTTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

4_7_041

TTGAGACATCCGGCGTGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTTCGT
CGGCTGGAGGCCAACTGT

4_7_044

TTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCA
TTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACAC
CCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGC
CGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCG
TTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGG
CTGCCGACAGAATTGATTCGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

4_8_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCAA

4_8_044

GCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGG
CATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAAC
ACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACG
GCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGG
CGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCG
GGCTGCCGACAGAATTGATTCGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

4_9_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

4_9_044

GGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGG
GCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAA
CACCCGTGTATCCCGTTACACCAGCACAGCCCGACACCGTCTACGCCGTGGTGCTGACGGGACG
GCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGG

CGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCG
GGCTGCCGACAGAATTGATTCGTCTGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG

5_6_041

TTGAGACATCGGGTGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCCTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTAGTTCCTATACCAACACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTTCTTGATTTTGCAC
CGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGGAACACTAATACCCGAGTGTCCTCGCTATACCAGCA
CAGCCCGACACCGTTTGCCTCGTGGTGCCGATGGGACAGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCAC
ACGTTTTATGAAGGATTTGCATTTACCGGGACAAATGGTGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAG
CCCTAACGCTATTTAATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTCG
GCTGGAGGTCAACTGT

5_6_044

TATACCAACACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTTCTTGATTTTGCACCTCGAGCTTGAATTTAG
AAATTTGACCCCCGGGAACACTAATACCCGAGTGTCCTCGCTATACCAGCACAGCCCGACACCGTT
TGCTCGTGGTGCCGATGGGACAGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGA
TTTGCATTTACCGGGACAAATGGTGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTA
ATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTCGGCTGGAGGTCAACTG
TTCTACTCCCG

6_1_041

TTGAGACATCGGGTGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCCTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAACACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTTCTTGATTTTGCAC
CGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGGAACACTAATACCCGAGTGTCCTCGCTATACCAGCA
CAGCCCGACACCGTTTGCCTCGTGGTGCCGATGGGACAGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCCAC
ACGTTTTATGAAGGATTTGCATTTACCGGGACAAATGGTGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAG
CCCTAACGCTATTTAATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTTCTCG
GCTGGAGGTCAACTG

6_1_044

CCTGGTTATGCTTTGTATCCATGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAACACGCCCTATACCGGGGC
ATTGGGGCTTCTTGATTTTGCACCTCGAGCTTGAATTTAGAAATTTGACCCCCGGGAACACTAATAC
CCGAGTGTCCTCGCTATACCAGCACAGCCCGACACCGTTTGCCTCGTGGTGCCGATGGGACAGC
CGAGCTTACAACCACTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGATTTGCATTTACCGGGACAAATGGTG
TTGGTGAGGTAGGCCGTGGTATAGCCCTAACGCTATTTAATCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGG
CTGCCGACAGAATTGATTTCTCGGCTGGAGGTCAACTGTTCTACTCCCG

6_9_041

TTGAGACATCCGGCGTGGCCGAGGAGGAGGCGACATCAGGCTTGGTTATGCTTTGTATCCATGG
TTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCGCAC
TCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACCAGC
ACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCAGCC
ACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTGGTAT
AGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTCGT
CGGCTGGAGGCCA

6_9_044

TGGTTCCCCTGTTAATTCCTATACCAATACGCCCTATACCGGGGCATTGGGGCTCCTCGACTTCG
CACTCGAGCTTGAATTTAGAACTTGACCCCTGGGAACACTAACACCCGTGTATCCCGTTACACC
AGCACAGCCCGACACCGTCTGCGCCGTGGTGCTGACGGGACGGCCGAGCTTACAACCACTGCA
GCCACACGTTTTATGAAGGACCTGCATTTTACCGGGACAAACGGCGTTGGTGAGGTAGGCCGTG
GTATAGCCCTAACGCTATTTAACCTTGCTGATACACTTCTCGGCGGGCTGCCGACAGAATTGATTT
CGTCGGCTGGAGGCCAACTGTTCTACTCCCG