

ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในผู้ป่วย
เด็กไทยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง



นางสาวหทัยพันธ์ รวบรวมพรรณพงศ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

MOLECULAR CLASSIFICATION OF HUMAN PARAINFLUENZA VIRUSES IN THAI
CHILDREN WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION.

Miss Hathaiphan Ruampunpong



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ
	อีวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติด
	เชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง
โดย	นางสาวหทัยพันธ์ รอมพรรณพงศ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไชยเดช นภทร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัจชัย พยุงภร)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภัตต์ สำราญสำรวงกิจ)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรพร ชินชัย)

หทัยพันธ์ รวมพรรณพงศ์ : ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ
 ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ
 ส่วนล่าง. (MOLECULAR CLASSIFICATION OF HUMAN PARAINFLUENZA
 VIRUSES IN THAI CHILDREN WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION.)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.
 ดร. สัญชัย พยงภร, 66 หน้า.

โรคติดเชื้อไวรัสเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในเด็กวัยแรกเกิดจนถึง 6 ปี และส่วนใหญ่
 มักพบในเด็กก่อนวัยเรียน บางครั้งเป็นถึงปีละหลายครั้ง โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจที่เกิดจาก
 เชื้อไวรัส อาจมีความรุนแรงแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของไวรัส และภูมิคุ้มกันของเด็กด้วย
 ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและ
 ส่วนล่างในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เป็นเชื้อที่มีความหลากหลาย สามารถจัดจำแนกทางชีวโมกุลได้
 4 สายพันธุ์ คือ HPIV-1 HPIV-2 HPIV-3 และ HPIV-4 ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษา
 ระบาดวิทยาเชิงชีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV โดยศึกษาจากตัวอย่างในระบบทางเดินหายใจ
 ครอบคลุมในภาคกลางของประเทศไทย ระยะเวลาที่ทำการศึกษเป็นเวลา 4 ปีกับข้อมูลของ
 การศึกษาระบาดของเชื้อ HPIV เชิงชีวโมเลกุลทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ตัวอย่างที่ทำการศึกษา
 ครั้งนี้ทั้งสิ้น 650 ตัวอย่าง ในระหว่างปี 2010-2013 โดยใช้วิธี multiplex semi-nested PCR ใน
 การคัดกรอง ผลการศึกษาพบว่า 4.76% (31/650) ของตัวอย่างให้ผลบวกต่อเชื้อ HPIV และมีการ
 ติดเชื้อร่วมของ HPIV กับไวรัสอื่นๆ ที่พบเป็นจำนวน 5 ตัวอย่าง ส่วนการจัดจำแนกสายพันธุ์ใน
 ระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV ด้วยการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ที่ควบคุม
 การสร้างโปรตีน HN พบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HPIV มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้าย
 กับ HPIV strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล ลำดับสายวิวัฒนาการของ HPIV ถูกแยกออก เป็น
 สองกลุ่มหลัก แต่ละกลุ่มได้รับการจำแนกออกเป็นกิ่งย่อย โดย HPIV ทั้ง 4 สายพันธุ์ ถูกแยกออก
 จากกันอย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่า % sequence
 identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ในสายพันธุ์เดียวกัน
 ของ HPIV นั้น มีค่าตั้งแต่ 84.4-100% แม้ว่าอัตราการระบาดของเชื้อ HPIV มีอัตราการระบาดที่
 ต่ำ แต่เป็นภาระทางการเงินของระบบสาธารณสุขของประเทศ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จาก
 การศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับข้อมูลการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคนี ใน
 อนาคต

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5574206030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HUMAN PARAINFLUENZA VIRUS (HPIV) CLASSIFICATION THAILAND
 EPIDEMIOLOGY HEMAGGLUTININ-NEURAMINIDASE GENE

HATHAIPHAN RUAMPUNPONG: MOLECULAR CLASSIFICATION OF HUMAN PARAINFLUENZA VIRUSES IN THAI CHILDREN WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION.. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, 66 pp.

Respiratory tract infections (RTIs) affecting the sinus, throat, airways or lungs are usually caused by viruses or bacteria. The one of viral contributors to childhood RTIs are Human Parainfluenza Viruses (HPIVs). This virus can be categorized into 4 types including HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3 and HPIV-4. To classify the isolations of human parainfluenza virus (HPIVs) circulating in the central part of Thailand, 650 samples were obtained from the lower respiratory tract of patients from two pediatric wards during 2010 to 2013. The multiplex semi-nested PCR was used to amplify the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of HPIV. The results showed that 4.76% (31/650) of the samples were positive for HPIV. 5 of 31 samples were co-infected with other respiratory viruses. Phylogenetic analysis of HPIV are split into two main groups, each group is divided into four branches. When compared with other strain of the same species the value of % nucleotide similarity matrix showed 84.4 to 100 %. Although HPIV infections in the central part of Thailand are very low, it still poses a financial burden on the healthcare system. There is currently no vaccine or effective treatment available to the patients. The knowledge gained from this study will provide useful information for surveillance and prevent the spread of this disease in the future.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต ในห้องปฏิบัติการที่เปรียบพร้อมทันสมัย และกรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ พร้อมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนคำปรึกษาอันมีประโยชน์ต่องานวิจัยครั้งนี้ พร้อมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ทุกท่าน สำหรับความรู้อันมีประโยชน์อย่างยิ่ง สำหรับประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ รวมไปถึงการชี้แนะความคิดและคุณธรรมสำหรับนักวิจัยที่ดี

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.นพ.ปกรัฐ หังสสุต ที่กรุณาช่วยเหลือ ในการให้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิกทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลตั้งแต่แรกเข้าจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เหน็ดเหนื่อยให้โอกาสในการศึกษาต่อ รวมทั้งสนับสนุน ให้กำลังใจ จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	6
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	6
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	8
ไวรัสวิทยาของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	8
ลักษณะทั่วไปของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	10
ลักษณะจำเพาะของยีนต่างๆบนจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	10
วงจรชีวิตของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	12
พยาธิกำเนิดของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	14
การแพร่กระจายของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	14
การเจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยง.....	15

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเชื้อ HPIV	16
วงจรชีวิตของไวรัสที่เป็นเป้าหมายสำหรับยาต้านเชื้อไวรัส.....	17
การป้องกันและการรักษา.....	18
ความแตกต่างระหว่าง Influenza virus และ Parainfluenza virus	18
หลักการและเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม	19
องค์ประกอบพื้นฐานและสถานะต่างๆที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม.....	21
เทคนิคของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
รูปแบบการวิจัย.....	26
ระเบียบวิธีการวิจัย.....	26
กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา.....	26
อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง.....	27
สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลอง.....	28
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	30
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	41
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	43
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
1. ผลการทดสอบ Positive control ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส.....	44
2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค multiplex semi-nested PCR.....	45
- ความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์ (specificity).....	45
- ความไวของการตรวจวิเคราะห์ (sensitivity)	46
3. ผลการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลู เอนซาไวรัสในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง	48
3.1 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH	48
3.2 ผลการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HPIV.....	49
- ผลการวิเคราะห์การติดเชื้อ HPIV ในแต่ละสายพันธุ์	50

- ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ HPIV วิเคราะห์ตามช่วงอายุของผู้ป่วย	51
- ผลการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV ตามฤดูกาล	52
- ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV.....	53
3.3 ผลการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPIVs และไวรัสชนิดอื่นในระบบทางเดินหายใจ	56
4.ผลการจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลและการหาความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการบนยีน HN ด้วยวิธี Phylogenetic analysis.....	56
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง.....	58
รายการอ้างอิง	63
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	74

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	หน้าที่ของโปรตีนของไวรัส HPIV.....	9
ตารางที่ 2	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH.....	33
ตารางที่ 3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH	33
ตารางที่ 4	สภาวะที่ใช้ทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน GAPDH.....	33
ตารางที่ 5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HPIV.....	34
ตารางที่ 6	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ multiplex semi nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV รอบที่ 1	35
ตารางที่ 7	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ multiplex semi nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV รอบที่ 2.....	36
ตารางที่ 8	สภาวะที่ใช้ทำ multiplex Semi-Nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV ด้วย PCR รอบที่ 1	36
ตารางที่ 9	สภาวะที่ใช้ทำ multiplex Semi-Nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV ด้วย PCR รอบที่ 2	37
ตารางที่ 10	ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ multiplex semi nested PCR.....	37
ตารางที่ 11	ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาแบ่งตามช่วงอายุ.....	51
ตารางที่ 12	แสดงลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV.....	54
ตารางที่ 13	แสดงลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV (ต่อ).....	55
ตารางที่ 14	ผลการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPIVs และไวรัสชนิดอื่นในระบบทางเดินหายใจอื่น	56
ตารางที่ 15	ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ของเชื้อ HPIV ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ HPIV สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank.....	57

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 ขอบเขตของการวิจัย 5

รูปที่ 2 แสดงองค์ประกอบของไวรัส 9

รูปที่ 3 แสดงจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 3 12

รูปที่ 4 แสดงจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 2 และ ชนิดที่ 4 12

รูปที่ 5 แสดงการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อ Human parainfluenza virus..... 13

รูปที่ 6 แสดงธรรมชาติของการติดเชื้อ HPIV 15

รูปที่ 7 แสดงภาพของ guinea pig และ ferret 15

รูปที่ 8 แสดงภาพของวงจรชีวิตของไวรัสที่เป็นเป้าหมายสำหรับยาด้านเชื้อไวรัส 17

รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR..... 20

รูปที่ 10 แสดงหลักการทำ nested PCR 25

รูปที่ 11 แสดงวิธีการเก็บน้ำล้างโพรงจมูก..... 30

รูปที่ 12 แสดงวิธีการเก็บ tracheal & endotracheal suction 31

รูปที่ 13 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 44

รูปที่ 14 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BLAST..... 45

รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ..... 46

รูปที่ 16 ผลการตรวจวิเคราะห์ความไวของเทคนิค multiplex semi-nested PCR 48

รูปที่ 17 ตัวอย่างผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH..... 49

รูปที่ 18 ตัวอย่างผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HPIV..... 50

รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการระบาดของเชื้อ HPIVs กับฤดูกาลในช่วงระยะเวลาที่
ทำการศึกษา..... 52

รูปที่ 20 Phylogenetic analysis แสดงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPIVs โดยเส้นตรงแสดงได้ภาพ
แทนจำนวน nucleotide substitution per site 58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ARTI	Acute Respiratory Tract Infection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ET suction	Endotracheal suction
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EV	Enterovirus
F protein	Fusion protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HCoV	Human Corona virus
HPIV	Human Parainfluenza Virus
HRV	Human Rhinovirus
L protein	Large protein
LRI	Lower Respiratory tract infection
MPV	Metapneumovirus
M protein	Matrix protein
MEGA	Molecular Evolutionary Genetic Analysis
μl	Microlitre (10 ⁻⁶ L)
ml	Millilitre (10 ⁻³ L)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nucleotide
NP protein	Nucleoprotein
NP suction	Nasopharyngeal suction
NPA	Nasopharyngeal aspirate
P protein	Phosphoprotein
PCR	Polymerase Chain Reaction

RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RNA	Ribonucleic Acid
Sequin	DNA Sequence Submission and Update Tool
Tm	Melting Temperature



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อีวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส เป็นไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง โดยสามารถพบการติดเชื้อได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายไขกระดูกอีกด้วย (1) สำหรับปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ได้แก่ ภาวะทุพโภชนาการ (Malnutrition) การขาดวิตามินเอ (vitamin A deficiency) รวมถึงการอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เต็มไปด้วยมลพิษ เป็นต้น (2)

ไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อได้โดยการได้รับละอองไอจากในอากาศ (airborne) เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะใช้ระยะเวลาในการฟักตัวประมาณ 1-7 วัน สำหรับอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ มีดังนี้ คือ อาการเจ็บคอ มีไข้ ซึ่งเป็นลักษณะอาการเบื้องต้น สำหรับอาการอื่นๆ ที่เกิดขึ้นกับทั้งระบบทางเดินหายใจส่วนบนและระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง คือ การอักเสบเฉียบพลันบริเวณกล่องเสียง และหลอดลมใหญ่ (acute laryngotracheobronchitis or croup) หลอดลมปอดอักเสบ (bronchitis) ปอดบวม (pneumonia) หลอดลมคอและหลอดลมปอดอักเสบ (tracheobronchitis) ซึ่งอาการเหล่านี้ยังสามารถพบได้ทั่วไปหากเกิดการติดเชื้อของไวรัสในระบบทางเดินหายใจ (3)

HPIV สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ (3) จำแนกโดยอาศัยข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic) และความแตกต่างของแอนติเจนของเชื้อไวรัส (antigenic variation) (4) โดยไวรัสทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวภาพคล้ายคลึงกัน การติดเชื้อ HPIV จะเกิดขึ้นในเด็กเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันยังทำงานได้ไม่เต็มที่ (5) และสามารถเกิดการติดเชื้อซ้ำได้ตลอดชีวิต (6) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV แต่ละสายพันธุ์จะมีอาการที่แตกต่างกันออกไป ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV-1 ส่วนใหญ่เป็นเด็กตั้งแต่อายุ 7 เดือนถึง 3 ปี โดยจะพบการระบาดทุกๆ 2 ปี ในช่วงฤดูใบไม้ร่วง (3) หลังจากเกิดการระบาดของ HPIV-1 จะพบการระบาดของเชื้อ HPIV-2 ตามมาเสมอ โดยสาเหตุของปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV-2 ส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี (6) นอกจากนี้จำนวน 2 ใน 3 ของเด็กที่ติดเชื้อ HPIV จะพบสายพันธุ์ HPIV-3 เป็นส่วนมาก โดยการระบาดของ HPIV-3 จะเกิดขึ้นในช่วงฤดูใบไม้ผลิไปจนถึงฤดูร้อนของทุกปี การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า HPIV-3 เป็นสาเหตุของการเกิดหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) และปอดบวม (pneumonia) นอกจากนี้ HPIV3 ยังเป็นสาเหตุของปอดอักเสบในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนปอดและมี

รายงานความสัมพันธ์กับการต่อต้านการปลูกถ่ายอวัยวะแบบเฉียบพลัน (acute allograft rejection) และเกิดเป็น bronchiolitis obliterans (7, 8) สำหรับสายพันธุ์สุดท้ายคือ HPIV-4 สามารถแบ่งออกได้เป็น 4A และ 4B (3, 9-11) สายพันธุ์นี้สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้อาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่สร้างไกลโคโปรตีนที่ชื่อว่า Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) โดยวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (12-14) สาเหตุที่ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของ HN gene เนื่องมาจากโปรตีน HN เป็นเป้าหมายสำหรับการกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายชนิด Humoral immunity นอกจากนี้การศึกษาส่วนใหญ่ในปัจจุบัน มีการนำข้อมูลส่วนนี้มาใช้อย่างกว้างขวางในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะการระบาดของเชื้อ HPIV

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV ที่ผ่านมามีพบว่าเชื้อ HPIV type 1 และ type 3 แพร่กระจายเป็นส่วนมากในแถบ จีน ญี่ปุ่น มาเลเซีย และบราซิล (4, 15, 16) ขณะที่ HPIV type 2 และ type 4 มีการระบาดเป็นส่วนมากในแถบอเมริกาเหนือและแคนาดา (17) อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถทำการเปรียบเทียบความชุกของ HPIV ชนิดที่ 4 ในประเทศใกล้เคียงได้เนื่องจากการศึกษาน้อยมากรวมไปถึงยังไม่มีรายงาน subtype ของ HPIV ชนิดที่ 4 (10, 18, 19)

เนื่องด้วยการติดเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสจะก่อโรคได้ในอัตราที่ต่ำ แต่ก็ส่งผลกระทบรุนแรงต่อผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ ในขณะที่เดียวกันความชุกของเชื้อในแต่ละท้องถิ่นก็มีความแตกต่างกัน ความชื้นที่ต่ำสามารถเพิ่มอัตราการแพร่เชื้อไวรัสได้ เนื่องจากอากาศแห้งทำให้ละอองไวรัสกระจายไปไกลขึ้นและอยู่ในอากาศนานขึ้น ซึ่งผลกระทบเหล่านี้จะส่งผลถึงขนาดและวิธีการให้ยาที่แตกต่างกันตามความเหมาะสมของการรักษาผู้ป่วย การติดเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะสามารถรักษาได้แต่ยังไม่มียาต้านฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสตัวใดที่ยืนยันได้ว่ามีประสิทธิภาพต่อการต้านเชื้อไวรัสชนิดนี้แม้จะมีงานวิจัยขั้นต้นบางชิ้นที่ศึกษาพบว่าอาจมีประโยชน์ก็ตาม นอกจากนี้ในประเทศที่กำลังพัฒนาพบว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเอชไอวีมีอัตราการป่วยและการเสียชีวิตสูงขึ้นหากติดเชื้อ HPIVs ร่วมด้วย (20) สำหรับในประเทศไทยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย

ดังนั้นวัตถุประสงค์การวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาถึงระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Human Parainfluenza virus (HPIV) ตั้งแต่ปี 2010 ถึง ปี 2013 โดยใช้ตัวอย่างสารคัด

หลังจากระบบทางเดินหายใจของเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีด้วยวิธี multiplex semi nested PCR และ DNA sequencing ในส่วนของยีน HN โดยคาดหวังว่าความรู้ที่ได้จะช่วยให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาและสายพันธุ์ของเชื้อ HPIV ในประเทศไทยมากขึ้น นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคต่อไปในอนาคต

คำถามงานวิจัย

1. ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสระหว่างปี 2010-2013 ในประเทศไทยเป็นอย่างไร มีความแตกต่างจากข้อมูลของประเทศอื่นๆ หรือไม่ อย่างไร
2. สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ที่พบในช่วงที่ทำการศึกษามีสายพันธุ์อะไรบ้าง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสระหว่างปี 2010-2013 ในประเทศไทย
2. เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสที่พบในประเทศไทยกับข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศ

สมมติฐานของการวิจัย

1. ตรวจพบการติดเชื้อของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสและนำนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน HN แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ
2. พบการติดเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ในผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรคระบบทางเดินหายใจ เปรียบเทียบข้อมูลของระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสระหว่างปี 2010-2013 ได้
3. สายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสที่พบในประเทศไทยและสายพันธุ์ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศ ถ้ามีความแตกต่างกันและข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปศึกษาหาความสัมพันธ์ของยีน HN

ข้อตกลงเบื้องต้น ไม่มี

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

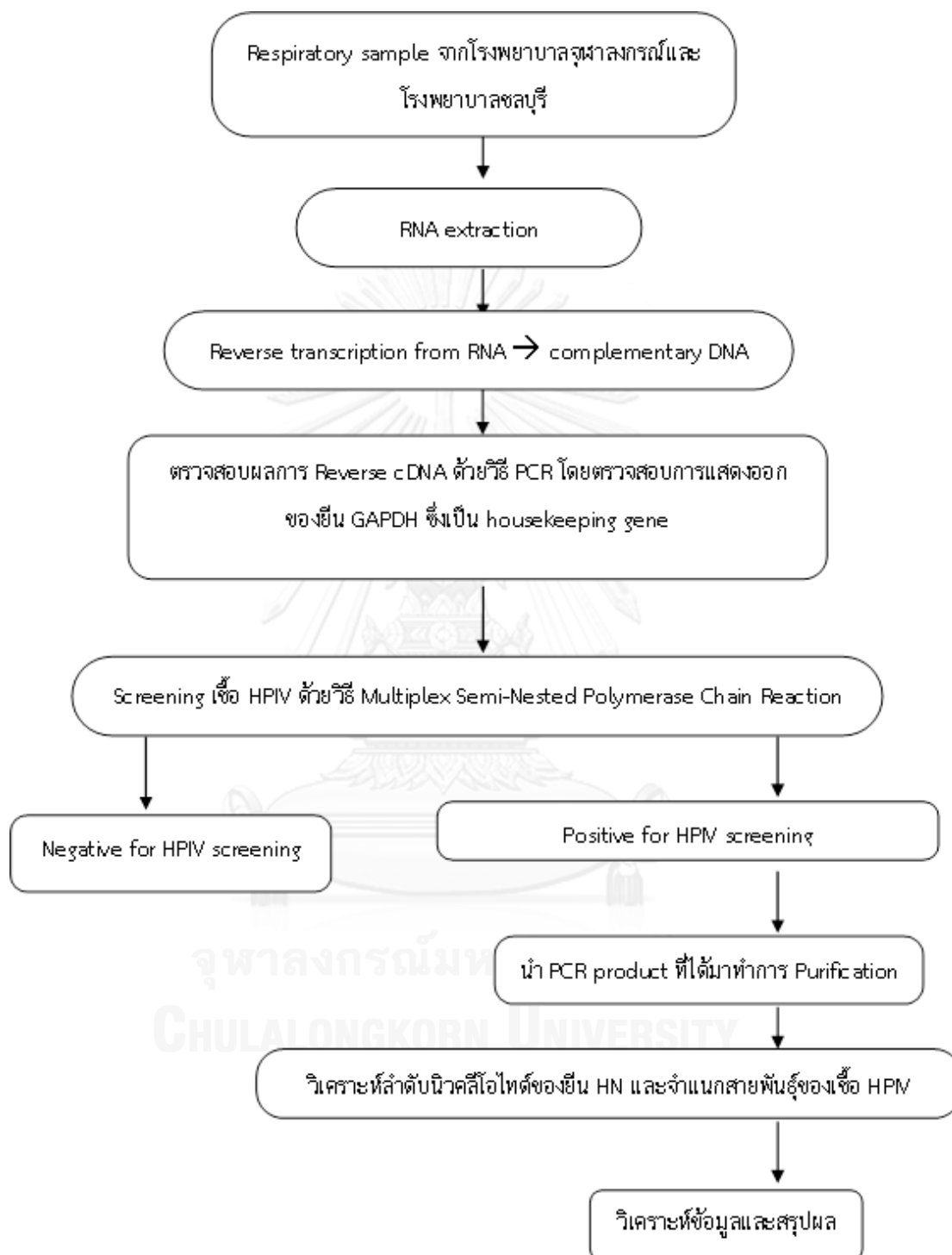
Type คือ การจัดจำแนก HPIV ออกเป็นสายพันธุ์โดยอาศัยข้อมูลทาง genetic analysis ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3, HPIV-4 ทั้งนี้ในงานวิจัยอื่นๆ อาจใช้คำที่แตกต่างกัน เช่น subtype

Strain คือ HPIV ที่จัดอยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย บนยีน HN ทำให้การวิเคราะห์ Phylogenetic tree มีรูปแบบการจัดกลุ่มที่แตกต่างกัน

คำสำคัญ

Human Parainfluenzavirus (HPIV), Classification, Thailand, Epidemiology

ขอบเขตของการวิจัย



รูปที่ 1 ขอบเขตของการวิจัย

ข้อจำกัดของงานวิจัย

1. การใช้ตัวอย่างที่เหลือจากโครงการอื่นนั้นสารพันธุกรรมของไวรัสในสารตัวอย่างอาจมีไม่เพียงพอจึงต้องทำการสกัดใหม่ในบางตัวอย่าง
2. การเก็บตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูกในเด็ก อาจส่งผลให้เกิดการระคายเคือง (invasive) ต่อผู้ป่วย จึงมีตัวอย่างการศึกษาค่อนข้างจำกัด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบาดวิทยาและสายพันธุ์ของ HPIV ที่พบในประเทศไทย และสามารถนำข้อมูลนี้มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันควบคุมโรค ในอนาคตต่อไปได้
2. ฝึกการคิดแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการทดลองได้
3. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่องหรือตีพิมพ์ผลงานในวารสารที่เกี่ยวกับด้านไวรัสวิทยาหรือโรคอุบัติใหม่
4. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะถูกเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. นำตัวอย่าง Respiratory samples ที่เก็บได้จากผู้ป่วย ใส่ลงใน viral transport media เก็บรักษาและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
2. ทำการสกัด RNA ที่ได้จากตัวอย่าง Respiratory samples ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป
3. ศึกษาระบาดของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในประเทศไทย
 - 3.1 ทำการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน HN ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ทั้ง 4 สายพันธุ์
 - 3.2 ปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อ โดยวิธี multiplex semi nested PCR สำหรับการหานิวคลีโอไทด์บนยีน HN
 - 3.3 เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ในส่วนของยีน HN โดยวิธี multiplex semi nested PCR

3.4 ตรวจสอบหาความไวและความจำเพาะ (sensitivity and specificity) ของการตรวจวิเคราะห์

4. ศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ที่สามารถตรวจพบได้ในกลุ่มตัวอย่าง
- 4.1 ข้อมูลที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้สำหรับทำ Phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

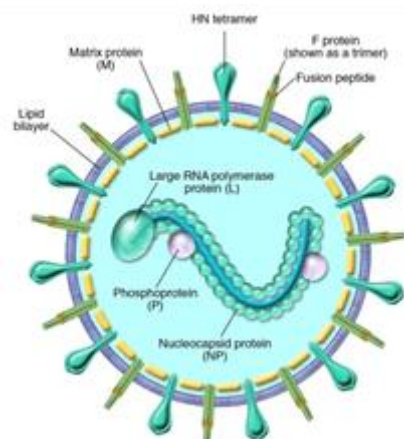
1. ศึกษาระบาดวิทยาและอัตราในการก่อโรคของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ในระหว่างปี 2010-2013 โดยคำนวณระบาดวิทยาของเชื้อ เพื่อหาความสัมพันธ์ในการก่อโรคของเชื้อไวรัส
2. หาความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการบนยีน HN ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้เคียงและแตกต่างกัน

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสวิทยาของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

เชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสมีรายงานการพบเชื้อครั้งแรกในปี 1950 โดยสามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากเด็กที่มีการติดเชื้อบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เนื่องจากมีการ shared antigenic sites คือ มีส่วนโมเลกุลบนแอนติเจนบางส่วนร่วมกับ Influenza virus ในปี 1959 จึงมีการตั้ง เกณฑ์และแยกไวรัสชนิดนี้ เป็น new taxonomic group และตั้งชื่อว่า Parainfluenza viruses ซึ่งอาจถูกเรียกชื่อแตกต่างกันออกไปตามสิ่งมีชีวิตที่พบการติดเชื้อ เช่น หากพบการติดเชื้อในมนุษย์ เรียกว่า ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส (Human Parainfluenza Virus : HPIV) เป็นต้น เชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสเป็นไวรัสที่มีขนาดของอนุภาคตั้งแต่ 150-300 นาโนเมตร จัดเป็นไวรัสขนาดกลาง สารพันธุกรรมของไวรัสชนิดนี้เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวมีหัวเป็นลบ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสเป็นไวรัสที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ (family) *Paramyxoviridae* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 genus คือ *Respirovirus* และ *Rubulavirus* และสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ โดยในสกุล *Respirovirus* จะมีสมาชิกคือ HPIV-1 และ HPIV-3 สำหรับ HPIV-2 และ HPIV-4 ซึ่งแบ่งออกได้เป็น HPIV-4A และ HPIV-4B ถูกจัดอยู่ในสกุล *Rubulavirus* จีโนมของไวรัสชนิดนี้มีขนาดประมาณ 15,000 นิวคลีโอไทด์ โดยมีการเรียงตัวของยีน จากด้าน 3' ไปจนถึงส่วนปลาย 5' ดังนี้ N P M F HN และ L ซึ่งสามารถแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของไวรัสได้ 6 ชนิด คือ Nucleocapsid protein , Phosphoprotein , Membrane protein , Fusion protein , Hemagglutinin-Neuraminidase และ Large protein (รูปที่ 1) โดยหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 1 (3)



รูปที่ 2 แสดงองค์ประกอบของไวรัส (21)

ตารางที่ 1 หน้าที่ของโปรตีนของไวรัส HIV

Protein	Function
Hemagglutinin-neuraminidase	ช่วยในการเกาะกับ Host cell receptors
Fusion protein	ช่วยให้สารพันธุกรรมของไวรัสเข้าสู่ Host cell ได้โดยการรวม envelop ของไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์และเป็นผลให้เกิดการ Hemolysis ของเซลล์
Nucleoprotein	ทำหน้าที่เป็น nucleocapsid คอยห่อหุ้มเพื่อปกป้องสารพันธุกรรมของไวรัส
Phosphoprotein	เป็นองค์ประกอบของ Polymerase complex
Large protein	เป็นองค์ประกอบของ Polymerase complex
Matrix protein	ช่วยในการรวมสารพันธุกรรมและโปรตีนต่างๆ ของไวรัสเป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่

ลักษณะทั่วไปของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

เชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสจัดอยู่ใน family *Paramyxoviridae* เชื้อไวรัสจะมีสารพันธุกรรมแบบ single stranded of negative sense RNA ซึ่งจะ envelope ล้อมรอบ capsid เรียกว่า นิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) โดย envelope ของไวรัสจะมีส่วนประกอบเป็น plasma membrane derived lipid bilayer ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ชนิดที่ 1 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 3 จัด อยู่ใน genus *Respirovirus* ส่วนฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 2 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 4 จัดอยู่ใน genus *Rubulavirus* เชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสแต่ละชนิดประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 15,500 นิวคลีโอไทด์ มีหน้าที่สร้างโปรตีนต่างๆ ได้แก่ transmembrane surface proteins (F และ HN), matrix protein (M) และ nucleocapsid proteins (N, P และ L) ส่วน surface fusion (F) และ HN glycoprotein (HN) เป็นส่วนของไวรัสที่สามารถกระตุ้นการสร้าง neutralizing antibody และทำให้เกิดปฏิกิริยา hemagglutination inhibition (HI) ส่วนประกอบนี้จึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีน

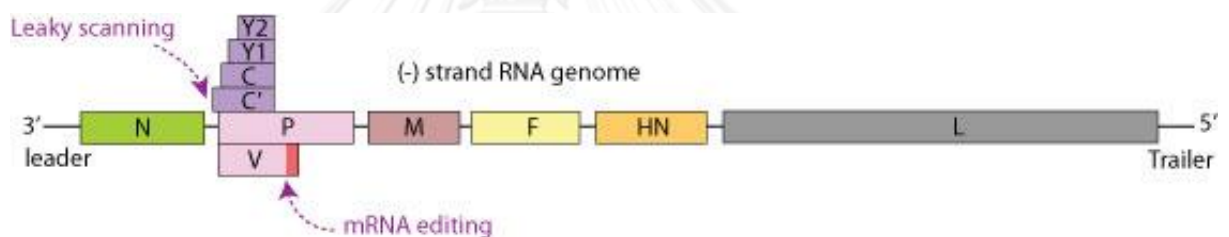
ลักษณะจำเพาะของยีนต่างๆบนจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

- **N(P) gene** เป็นยีนที่อยู่ทางด้านปลาย 3' ของจีโนมไวรัส จัดเป็นยีนที่มีความเสถียร (conserved) ระหว่าง ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในแต่ละสายพันธุ์ โดย N(P) gene จะมีขนาด 1,641-1,850 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลรหัสได้เป็น nucleoprotein 515 amino acid
- **P gene** เป็นยีนที่มีความเป็น multicistronic โดย P gene จะมีส่วนของยีน (cistron) ที่สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ต่อเนื่อง (continuous), ส่วนไม่ต่อเนื่อง (discontinuous) และส่วนที่เหลื่อมล้ำกัน (overlapping) เนื่องจาก P gene เป็นยีนที่มีความเป็น multicistron ทำให้สามารถแปลรหัสเป็น phosphoprotein และแบ่งเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกได้แก่ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสสายพันธุ์ที่ 1 และฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสสายพันธุ์ที่ 3 โปรตีนที่ถอดรหัสได้จาก P gene จะเป็นส่วนของ continuous P cistron สามารถแปลรหัสได้ 500-600 amino acid จากรูปที่ 3 แสดงจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 1 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 3 พบว่า Leaky scanning เป็นปรากฏการณ์การควบคุมการแปลรหัสในยูคาริโอตโดยลำดับเบสที่อยู่หน้า start codon

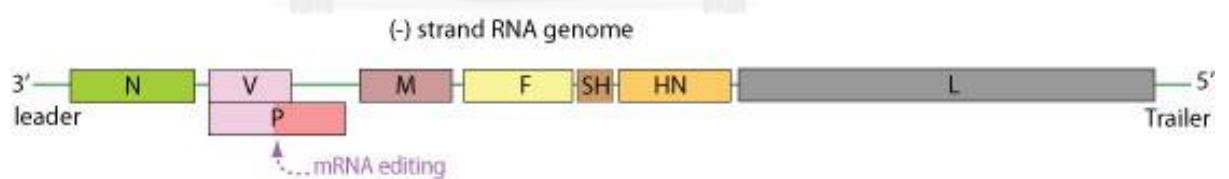
(AUG) การที่จะเกิดการแปลรหัสได้นั้น small ribosome จะเข้าจับเกาะและหา start codon (AUG) ซึ่งเมื่อพบจะทำการกระตุ้นให้มีการแปลรหัสขึ้น ถ้าบริเวณจดจำของ small ribosome ไม่ดีพอ small ribosome จะเพิกเฉยต่อ AUG แรกที่เรียกว่า leaky scanning จะทำให้ได้โปรตีนที่ใกล้เคียงกันที่มาจาก mRNA เดียวกัน นอกจากนี้ที่กล่าวข้างต้นแล้ว การควบคุมการแปลรหัสในยูคาริโอตโดยลำดับเบสที่อยู่หน้า start codon ยังพบว่าถูกควบคุมโดย open reading frame ที่อยู่ระหว่างปลาย 5' กับ mRNA ซึ่งถ้า small ribosome อ่าน open reading frame ผิดไป จะทำให้เบส 3 ตัวแรกแทนที่จะอ่านเป็น AUG ก็อ่านเป็นอย่างอื่น ซึ่งการที่ small ribosome อ่าน open reading frame ไม่ถูกต้อง จะทำให้ไม่เกิดการถอดรหัสขึ้น กลุ่มที่สอง ได้แก่ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสสายพันธุ์ที่ 2 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสสายพันธุ์ที่ 4 โดยการถอดรหัสจาก P gene จะเกิดกระบวนการ mRNA editing โดย P mRNA สามารถทำให้เกิดการแปลรหัสของ nonstructural V protein โดย P protein และ V protein เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน 64 amino acid บริเวณตำแหน่ง terminal ซึ่งโปรตีนนี้มีความสำคัญทางชีวภาพของไวรัส จากรูปที่ 4 แสดงจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 2 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 4 RNA editing คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในโมเลกุล mRNA เช่น การเพิ่มนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เข้าไปในโมเลกุล mRNA หรือการขจัดนิวคลีโอไทด์บางตัวออกไปจากโมเลกุล mRNA หรือการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในโมเลกุล mRNA ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เกิดกระบวนการตัดแปลงโมเลกุล mRNA

- **M gene** จัดเป็นยีนที่มีความ conserved ระหว่างไวรัสในกลุ่ม paramyxoviruses และเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการประกอบชิ้นส่วนของไวรัส (assembly) M gene สามารถแปลรหัสได้เป็น matrix protein
- **F gene** เป็นยีนที่มีขนาดความยาวประมาณ 1,845-1,851 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนได้เป็น fusion protein โดยโปรตีนชนิดนี้จะอยู่บริเวณ envelope ของไวรัส ช่วยให้ไวรัสสามารถบุกรุก (penetrate) เข้าสู่ host cell ได้

- **HN gene** สามารถแปลรหัสได้เป็น HN glycoprotein มีหน้าที่คือ Hemagglutinin ทำหน้าที่ในการจับกับ receptor site บนผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย และ Neuraminidase จะทำหน้าที่ย่อย glycoprotein ซึ่งเป็น receptor site บนผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสเป็นอิสระจากเซลล์ โมเลกุลของ glycoprotein นี้พบได้ในเมือกที่ปกคลุมทางเดินหายใจด้วย เมื่อเมือกจับไวรัสไว้ ไวรัสจะใช้ enzyme ย่อยทำให้เมือกใสขึ้น ไวรัสจึงหลุดออกไปบุกเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจที่อยู่ลึกลงไป
- **Large gene** เป็นยีนที่อยู่ทางด้านปลาย 5' ของจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส จัดเป็นยีนที่มีความยาวมากที่สุด มีขนาดความยาวถึง 5,799 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ large gene สามารถแปลรหัสได้เป็น large protein ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญใน polymerase complex



รูปที่ 3 แสดงจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 1 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 3 (http://education.expaty.org/images/Respirovirus_genomes.jpg)



รูปที่ 4 แสดงจีโนมของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 2 และ ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสชนิดที่ 4 (http://education.expaty.org/images/Rubulavirus_genomes.jpg)

วงจรชีวิตของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

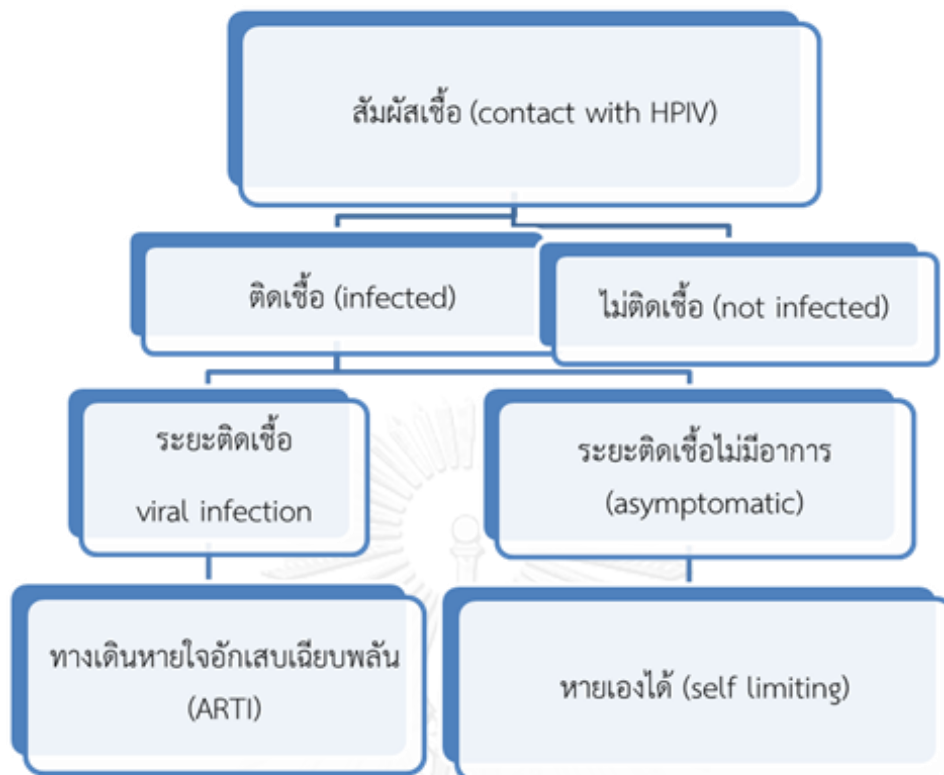
การเพิ่มจำนวนของฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมของ Host cell โดยขั้นแรกอนุภาคของเชื้อไวรัสจะเกาะกับ Host cell receptors กระบวนการนี้เกิดขึ้นผ่าน HN glycoprotein จากนั้น envelope ของไวรัสจะเกิดการรวมตัวกับเซลล์เมมเบรนของโฮสต์เซลล์โดย

พยาธิกำเนิดของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะคล้ายกับการติดเชื้อ Respiratory Syncytial Virus (RSV) พยาธิสภาพที่ทางเดินหายใจและปอดในผู้ป่วย ที่เป็นหลอดลมฝอยอักเสบและปอดอักเสบน่าจะเป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสโดยตรงต่อเซลล์ เยื่อบุร่วมกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ ทำให้เกิดเซลล์ตาย เกิดการบวมและการหลั่งของเอนไซม์ตามมา (22) การเกิด croup พบว่ามีการเพิ่มของ mononuclear cells หลังการติดเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสร่างกายจะหลั่งแอนติบอดีชนิดต่างๆ เช่น IgG และ IgA เมื่อเวลาผ่านไประดับของแอนติบอดีจะลดต่ำลง (23) นอกจากนี้ยังพบว่า IgE ในสารคัดหลั่งของผู้ป่วยโรคหลอดลมฝอยอักเสบมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ (24) การเกิด croup จากการติดเชื้อของฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสมีความรุนแรงน้อยกว่าเชื้อ RSV และจะไม่ค่อยเกิดภาวะการหายใจล้มเหลว ผู้ป่วยที่มีปัญหาภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่กำเนิด สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ หากติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ อาจมีอาการที่รุนแรงมากหรือเสียชีวิตได้ (24-28)

การแพร่กระจายของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

เชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสพบเฉพาะในมนุษย์เท่านั้น การแพร่กระจายของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสสามารถแพร่กระจายโดยการสัมผัสโดยตรงกับน้ำมูกที่ปนเปื้อนเชื้อหรือสัมผัสทางอ้อมกับสิ่งของเครื่องใช้ที่ปนเปื้อนเชื้อ ไวรัสชนิดนี้สามารถอยู่บนพื้นผิวที่ปนเปื้อนได้นานหลายชั่วโมง จึงเป็นสาเหตุให้พบการแพร่กระจายของเชื้อ ในโรงพยาบาลโดยเฉพาะในหอผู้ป่วยเด็กได้ (29) เชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสพบที่สามารถทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในโรงพยาบาลเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีปัญหาภูมิคุ้มกันบกพร่อง (29-32) ผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสชนิดนี้มาแล้วอาจจะติดเชื้อซ้ำอีกได้ แต่ส่วนมากในเด็กโตหรือผู้ใหญ่ที่ไม่มีโรคประจำตัวมักจะไม่มีอาการหรือมีอาการไม่รุนแรง (33) รูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงธรรมชาติของการติดเชื้อ HPIV (3)

การเจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยง

Primary cell line และ secondary cell line ที่ช่วยให้เชื้อ HPIV เจริญเติบโตมีหลายชนิด โดยส่วนใหญ่ที่ใช้จะเป็น LLC-MK2, VERO, CV-1, Primary Cynomolgous และ Rhesus monkey kidney นอกจากนี้เชื้อ HPIV ยังสามารถเพิ่มจำนวนใน organ culture จากสัตว์ได้ เช่น หนู, guinea pig, ferret (รูปที่ 7) และ human fetal respiratory epithelium (34)



รูปที่ 7 แสดงภาพของ guinea pig และ ferret

(<http://netmarketing-123.com/wp-content/uploads/2013/11/Guinea-pig.jpg>)

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/32/Ferret_2008.png)

สำหรับ primary monkey kidney tissue culture นั้น มีความไวต่อเชื้อ HPIV มาก เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อเป็นอย่างยิ่งโดยเชื้อ HPIV สามารถแยกได้โดยง่ายจาก epithelial cell lines ได้ดีกว่า fibroblast cell lines นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการ culture HPIV คือ exogenous protease (trypsin) เนื่องจาก trypsin ทำให้เชื้อ HPIV สามารถปรับสภาพภายใน cell culture ได้ (34)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเชื้อ HPIV

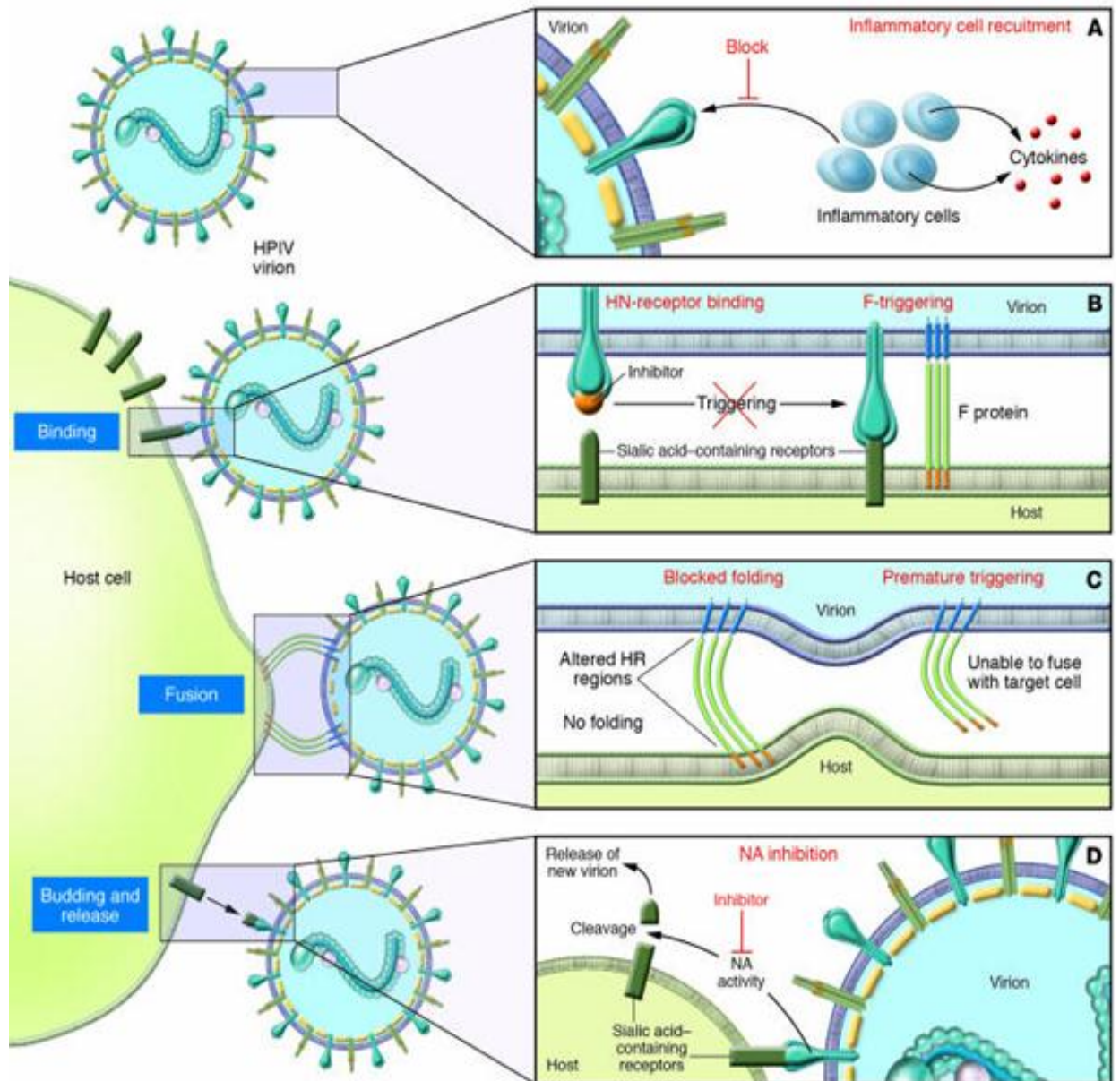
สำหรับกลไกการป้องกันเชื้อ HPIV โดยส่วนใหญ่ภูมิคุ้มกันของร่างกาย จะตอบสนองต่อไกลโคโปรตีนสองตัวบนผิวไวรัส (surface glycoprotein) คือ โปรตีน HN และโปรตีน F (35, 36) เด็กส่วนใหญ่จะสร้าง neutralizing แอนติบอดีต่อ HPIV ทั้งสี่สายพันธุ์ โดยระดับแอนติบอดีเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ในระหว่างการติดเชื้อครั้งแรก และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 6 เดือน HPIV-3 ติดเชื้อประมาณสองในสามของ เด็กในช่วงขวบปีแรกที่มีการติดเชื้อ ในความเป็นจริงแล้วเด็กทุกคนเมื่ออายุ 3 ปีจะแสดงให้เห็นถึงการเคยติดเชื้อ HPIV มาก่อน จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อทั้ง โปรตีน HN หรือ โปรตีน F สามารถป้องกันการติดเชื้อ HPIV-3 ได้ (36) นอกจากนี้การป้องกันการติดเชื้อ HPIV โดยแอนติบอดีเพียงอย่างเดียวอาจไม่ได้ป้องกันการก่ออย่างเต็มที่ จาก Lower respiratory infection (35) การติดเชื้อซ้ำมักจะเกิดก่อนที่จะมีการจดจำได้ของระบบภูมิคุ้มกัน

ส่วนใหญ่การตอบสนองของแอนติบอดีจะเป็น IgG1 แต่ 30% ของผู้ใหญ่ มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ IgG3, IgG4, IgA และ IgM (37) ในระหว่างหรือหลังจากการติดเชื้อ HPIV เฉียบพลันพบว่าเด็กก่อนวัยเรียนส่วนใหญ่แสดงให้เห็นถึงการผลิตแอนติบอดี IgM (38) นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันต่อ HPIV สายพันธุ์ที่ 1 และ 2 มีแนวโน้มของการพัฒนาช้ากว่า ภูมิคุ้มกันต่อ HPIV สายพันธุ์ที่ 3 โดยภูมิคุ้มกันต่อ HPIV-3 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงปีที่สอง และปีที่สามของชีวิต

IgA มีบทบาทสำคัญ ในการป้องกันการติดเชื้อ HPIV หลังจากที่มีการติดเชื้อ HPIV เด็กส่วนใหญ่ และผู้ใหญ่ จะมีพัฒนาของแอนติบอดีชนิดนี้ (24, 39-41) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการป้องกันโรคในผู้ใหญ่ (40, 42) อย่างไรก็ตามในทารกแรกเกิด IgA ไม่ได้ มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านการติดเชื้อ HPIV (41) การตอบสนองของ เซลล์ T-lymphocyte ดูเหมือนจะเป็น สิ่งสำคัญในการต้านการติดเชื้อของ ไวรัสจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ในระหว่างการติดเชื้อด้วย HPIV -3 และ

mouse PIV -1 (43-45) ปรากฏว่า Alpha beta T cell มีบทบาทสำคัญ ในการตอบสนองด้านเซลล์ (cell-mediated) ที่มีฤทธิ์กำจัดไวรัสมากกว่า gamma delta T cell หรือ natural killer cell

วงจรชีวิตของไวรัสที่เป็นเป้าหมายสำหรับยาต้านเชื้อไวรัส



รูปที่ 8 แสดงภาพของวงจรชีวิตของไวรัสที่เป็นเป้าหมายสำหรับยาต้านเชื้อไวรัส

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1159152/bin/JCI0525669.f5.jpg>

- (A) Agents ที่สามารถของยับยั้ง โปรตีน HN โดยจะกระตุ้น inflammatory cells ที่ปอดและ กระตุ้นการหลั่ง ไซโตไคน์ตามมา อาจลดการตอบสนองต่อการอักเสบต่อโปรตีน HN และ บรรเทาอาการของโรค
- (B) Agents ที่สามารถจับได้อย่างพอดีกับ HN globular head อาจยับยั้ง HN-receptor binding และ F โปรตีน เมื่อโปรตีน HN ถูกยับยั้งจึงไม่สามารถกระตุ้น F โปรตีน ได้ จึงเป็น การลดการจับกันระหว่างไวรัสและโฮสต์เซลล์
- (C) Agents ที่ออกแบบมาให้คล้ายกับ F โปรตีน มาใช้ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการ refolding ที่ จำเป็นในการ fusion ในระหว่างที่ไวรัสเข้าไปในโฮสต์เซลล์ นอกจากนี้ Agents ที่ออกแบบ มาให้คล้ายกับ F โปรตีน สามารถกลายเป็น โปรตีน F ที่ไร้ความสามารถ ก่อนที่จะถึงเยื่อหุ้ม เซลล์ โฮสต์เป้าหมาย เพื่อป้องกันการ fusion ในระหว่างที่ไวรัสเข้าไปในโฮสต์เซลล์
- (D) โปรตีน HN มี NA activity การยับยั้งที่เฉพาะเจาะจง ของ NA activity อาจป้องกัน virion เข้าสู่เซลล์ ทำให้ไม่ติดเชื้อเพิ่มเติม

การป้องกันและการรักษา

ในเด็กที่มีการติดเชื้อ HPIV ส่วนใหญ่แล้ว จะมีการพัฒนาของแอนติบอดี แต่ในปริมาณที่น้อย จึงสามารถเกิดการติดเชื้อซ้ำได้ตลอดชีวิต (46) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่าแอนติบอดีบาง ชนิดสามารถต้านการติดเชื้อได้ (47) สำหรับการพัฒนาวัคซีนของไวรัสชนิดนี้ โดยให้ทาง intranasal เป็น live attenuated ที่เป็นส่วนประกอบของ bovine PIV-3 กับ Human PIV บริเวณยีน HN และ ยีน F พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของแอนติบอดีต่อไวรัสชนิดนี้สูงขึ้น ในแฮมสเตอร์ และลิงรีซัส (47, 48) แต่การพัฒนาวัคซีนในการป้องกันไวรัสชนิดนี้ยังอยู่ในขั้นทดลอง นอกจากนี้ยัง มีการทดสอบสารที่ใช้ป้องกัน ไวรัสในกลุ่มของ Paramyxoviruses เช่น neuraminidase inhibitors (zanamivir) , protein synthesis inhibitors (puromycin), nucleic acid synthesis inhibitors, ascorbic acid, calcium elenolate (49, 50) แต่ในปัจจุบันยังไม่มียาต้านเชื้อตัวใดที่ให้ผลอย่างมี ประสิทธิภาพสำหรับไวรัสชนิดนี้

ความแตกต่างระหว่าง Influenza virus และ Parainfluenza virus

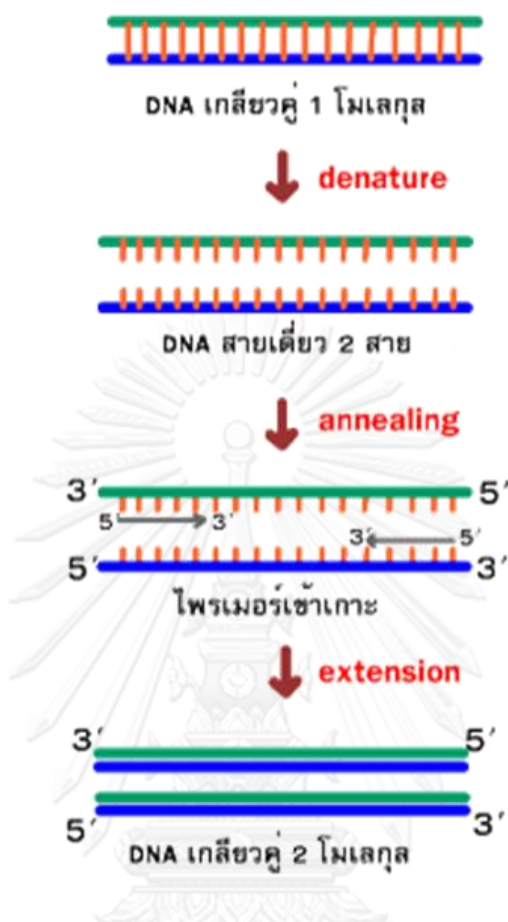
เชื้อ HPIV มีลักษณะอาการทางคลินิกทั่วไปคล้ายกับ Influenza virus หลายประการ (Influenza-like) เนื่องจากอนุภาคของไวรัส (virus particle) ของ HPIV นั้นมีลักษณะคล้าย

Influenza virus โดยมี Hemagglutination และ Neuraminidase activities อย่างไรก็ตามเชื้อ HPIV ยังมีคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างจากเชื้อ Influenza virus เช่น

1. บริเวณที่พบการติดเชื้อ HPIV มีบริเวณที่เหมาะสมอยู่บริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ซึ่งแตกต่างจาก Influenza virus ที่มีบริเวณที่เหมาะสมอยู่บริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากระบบทางเดินหายใจส่วนบนนั้นจะมีอุณหภูมิที่ต่ำกว่าระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของ Influenza virus
2. HPIV ถูกจัดอยู่ใน family *Paramyxoviridae* เป็น RNA virus ที่มีการ replicate บริเวณ cytoplasm ซึ่งแตกต่างจาก Influenza virus ถูกจัดอยู่ใน family *Orthomyxoviridae* จัดเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA เพียงชนิดเดียว ที่มีการ replicate บริเวณ nucleus นอกจากนี้ลักษณะทางชีวโมเลกุลของ Influenza virus ไม่มีส่วนของ nucleotide sequence หรือ amino acid sequence ที่มีความสัมพันธ์กับ HPIV ยกเว้นบริเวณ motif sequence ของ Polymerase protein

หลักการและเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

หลักการพื้นฐานของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหรือที่เรียกกันว่า Polymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็น ต้องอาศัยส่วนประกอบดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่แบบ, thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, oligonucleotide primers, buffer ปฏิกริยาการสังเคราะห์จะดำเนินไปเป็นลำดับ 3 ขั้นตอน (รูปที่ 9) ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-40 รอบ ทำให้ได้ PCR Product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

(<http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/dna/chapter/images/editable/pcr3.gif>)

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ของดีเอ็นเอแม่แบบให้กลายเป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาที่ 45-65 องศาเซลเซียสโดยประมาณ เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยวบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม
3. ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากสายไพรเมอร์ ในทิศทางจากทางด้าน 5' ไปทางด้าน 3' อุณหภูมิในช่วงนี้จะอยู่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบพื้นฐานและสถานะต่างๆที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

ประสิทธิผล (Efficacy) ของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม สามารถวัดได้จากปัจจัยต่างๆ คือ ความจำเพาะ (specificity), ความไว (sensitivity), ผลผลิตที่ได้ (yield) และความถูกต้อง (fidelity) การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะสูงมาก จะทำให้ PCR product เกิดขึ้นจากส่วนของแม่พิมพ์ที่มีความจำเพาะเท่านั้น ในขณะที่การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้ได้ PCR product ในปริมาณที่สูงกว่า โดยใช้จำนวนรอบในการทำน้อยกว่า ส่วนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง ก็จะทำให้ได้ PCR product ที่มีความถูกต้องในลำดับเบสสูง หรือมีความผิดพลาดน้อยมาก นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบและสถานะต่างๆ ที่ส่งผลต่อปัจจัยดังกล่าว โดยทั่วไปพบว่า การปรับองค์ประกอบและสถานะต่างๆของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม เพื่อให้ได้ความจำเพาะและความแม่นยำสูงสุด

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ

คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบมีอิทธิพลอย่างมากต่อประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้วยเหตุนี้การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบจากตัวอย่างจึงเป็นสิ่งสำคัญสิ่งแรกที่ต้องพิจารณา สำหรับปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจะอยู่ในช่วง 10^2 - 10^5 copies

2. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ซึ่งขึ้นกับการเลือกและออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสม มีหลักเกณฑ์ดังนี้

- ไพรเมอร์มีขนาดยาวประมาณ 18-24 เบส
- ประกอบด้วย G+C ประมาณ 40-60%
- ไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เกิดขึ้นในสายของไพรเมอร์
- การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ไม่ควรมีเบสคู่สมกัน (complementary) เพื่อป้องกันการเกิด ไพรเมอร์-ไดเมอร์ (primer-dimers)
- มีค่า T_m อยู่ในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส และค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน

3. Thermostable DNA polymerases

เป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ เอนไซม์มี activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน ในปัจจุบัน มี thermostable DNA polymerases หลายชนิดที่ถูกค้นพบและนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ซึ่งจะขอกกล่าวถึงเอนไซม์บางตัว ดังนี้

- **Taq DNA polymerase** เป็น thermostable DNA polymerase ตัวแรกที่ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม PCR และใช้กันอย่างแพร่หลาย เอนไซม์ชนิดนี้แยกได้จาก thermophilic eubacterium มีชื่อว่า *Thermus aquaticus* สำหรับ Taq DNA polymerase ประกอบด้วยกรดอะมิโน 832 ตัว มีน้ำหนัก 95 KD มี 5'-3' exonuclease แต่ไม่มี 3'-5' exonuclease ซึ่งเป็น proof reading activity
- **Stoffel fragment** เป็น truncated form ของ Taq DNA polymerase ที่ได้จากการตัดยีนส่วนต้นออกไป 867 basepairs ทำให้ประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 544 ตัว และมีน้ำหนัก 62 KD Stoffel fragment จะต่างจาก Taq DNA polymerase โดย
 - ไม่มี 5'-3' exonuclease
 - processivity ต่ำกว่า แต่ fidelity สูงกว่า Taq DNA polymerase
 - ทนความร้อนกว่า
 - ช่วงความเข้มข้น Mg^{2+} ที่เหมาะสำหรับการทำงานกว้างกว่า
- **Pfu และ Pwo DNA polymerases** เป็นเอนไซม์ขนาด ประมาณ 90 KD ที่แยกได้จาก hyper thermophilic archae bacteria ชื่อ *Pyrococcus furiosus* และ *Pyrococcus wosei* ตามลำดับ ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สำหรับตัวเอนไซม์มีคุณสมบัติทนความร้อนสูงมาก เหมาะสำหรับงาน PCR ที่ต้องการความถูกต้องของลำดับเบสใน amplified product สูง เช่น การทำ genomic cloning, การศึกษา polymorphism, การศึกษาการกลายพันธุ์ เป็นต้น

4. บัฟเฟอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

บัฟเฟอร์มาตรฐานสำหรับงาน PCR ที่ใช้ Taq DNA polymerase ประกอบด้วย 50 mM

KCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.3 ที่อุณหภูมิห้อง) และ 1.5 mM MgCl₂

5. ความเข้มข้นของ MgCl₂

Mg²⁺ เป็น cofactor ที่จำเป็นสำหรับการทำงานและ fidelity ของ polymerase รวมถึงมีผลต่อ primer annealing, ความจำเพาะของการทำ PCR และการเกิด primer-dimer ดังนั้นในการทำ PCR เพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุดจึงต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MgCl₂ โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MgCl₂ ที่ใช้ในการทำ PCR จะเท่ากับ 1.5 mM แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละการทดลอง อาจแปรเปลี่ยนขึ้นกับปริมาณของ dNTPs และปริมาณของ primers และดีเอ็นเอแม่แบบ

6. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

ความเข้มข้น ของ dNTPs ทั้งสี่ชนิดในการทำ PCR อยู่ในช่วง 20-200 μM โดย ความเข้มข้น ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ 200 μM ซึ่งเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ amplified product

เทคนิคของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

- Hot start PCR

ในการทำ hot start PCR จะมีความแตกต่างจาก PCR ธรรมดา โดยอุณหภูมิขั้นแรกของการทำปฏิกิริยาจะสูงมากประมาณ 96-98 องศาเซลเซียส เพื่อให้ส่วนประกอบต่างๆ แยกออกจากกัน เกินอุณหภูมิในขั้น annealing การดัดแปลงนี้จะช่วยป้องกันการเกิด PCR product แบบไม่จำเพาะเจาะจงซึ่งเกิดจากการเกาะของ primer เข้ากับดีเอ็นเอแม่แบบไม่จำเพาะในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา ด้วยเหตุนี้ hot start PCR จึงช่วยทำให้ความจำเพาะและประสิทธิภาพของการทำ PCR ดีขึ้น

- RT-PCR

Reverse transcriptase polymerase chain reaction หรือ RNA-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ RNA ที่ประกอบด้วยสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA-cDNA) จากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์

- Multiplex PCR

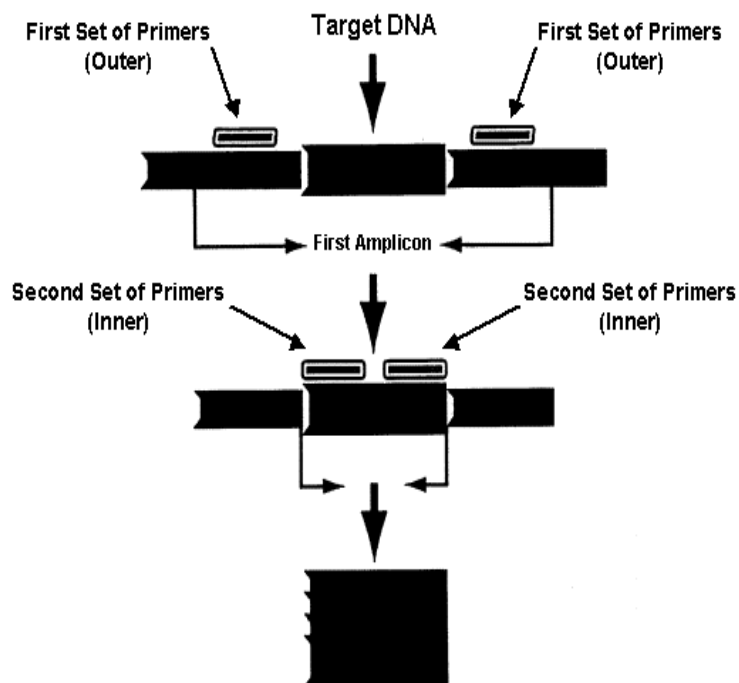
เทคนิค PCR นี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการตรวจวิเคราะห์ยีนหลายชนิดในการทำ PCR เพียงขั้นตอนเดียวและแยกวิเคราะห์สารโดยดูจากขนาดของ PCR product ที่แตกต่างกัน ลักษณะเด่นของเทคนิค multiplex PCR คือ ความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งที่ต้องการ ตรวจวิเคราะห์ เช่น ในการตรวจแยกไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ โดย ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด และผสมเข้าด้วยกัน เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์พร้อมๆ กันได้โดยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมภายในครั้งเดียว

- Nested PCR

เทคนิคการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในบริเวณที่ต้องการ โดยใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR แรกออกเป็น 2 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์คู่แรก (F1, R1) เพื่อคัดเลือกยีนบริเวณที่สนใจ จากนั้น นำ PCR product ที่ได้ มาใช้เป็น DNA template สำหรับการทำ PCR รอบที่สอง และใช้ ไพรเมอร์คู่ที่สอง (F2, R2) ซึ่งจะคัดเลือกยีนบริเวณเดิมเพื่อเพิ่มความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของการตรวจวิเคราะห์ให้สูงขึ้น ดังรูปที่ 10 เทคนิคนี้มีความไวโดยเฉลี่ย $1-10^{-2}$ copies/ μ l

- Semi nested PCR

เทคนิคการทำ PCR ที่ประยุกต์จาก nested PCR โดยใช้จำนวนไพรเมอร์น้อยกว่าการทำ nested PCR โดยใช้การทำ PCR เพื่อคัดเลือกยีนที่ต้องการก่อนในการทำ PCR ครั้งแรกจากนั้นจึงนำ PCR product ไปทำ PCR รอบที่สอง โดยใช้ ไพรเมอร์ใหม่ร่วมกับไพรเมอร์เดิม การเลือกใช้ ไพรเมอร์สามารถเลือกใช้ได้ทั้งสองทิศทาง โดยอาจออกแบบ ไพรเมอร์ ใหม่ในทิศทาง 5'-3' (forward primer) หรือ 3'-5' (reverse primer) ก็ได้ ขึ้นกับความเหมาะสมของบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์หรือตามวัตถุประสงค์



Specific Amplification of the Target DNA

รูปที่ 10 แสดงหลักการทำ nested PCR

(<http://www.ivpresearch.org/images/Nested%20PCR%20Figure%20Power%20Point.gif>)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยที่ใช้ในการศึกษาแบบ Descriptive cross-sectional study

ระเบียบวิธีการวิจัย

โครงการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No.378/56)

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ คือ ตัวอย่างที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เป็นตัวอย่างแช่แข็งที่เหลือเก็บจากงานตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 หรือ Influenza pH1N1 ซึ่งเป็นงานบริการประจำวันของทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ป่วยเด็ก ซึ่งมีอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยมีดังนี้

1. มีไข้มากกว่า 37.8 องศาเซลเซียส ร่วมกับการหายใจเร็ว (ตามช่วงอายุ) ดังนี้
 - อายุน้อยกว่า 2 เดือน มีอัตราการหายใจ ≥ 60 ครั้ง/นาที
 - อายุ 2 เดือนถึง 1 ปี มีอัตราการหายใจ ≥ 50 ครั้ง/นาที
 - อายุ 1 ถึง 5 ปี มีอัตราการหายใจ ≥ 40 ครั้ง/นาที
 - อายุ > 5 ปี มีอัตราการหายใจ ≥ 30 ครั้ง/นาที
2. ตรวจร่างกายพบความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ ที่เข้าได้กับโรคปอดอักเสบ
3. ตรวจเอกซเรย์ปอดพบความผิดปกติที่เข้าได้กับโรคปอดอักเสบ ที่อ่านผลโดยแพทย์รังสี

วินิจฉัย

และกลุ่มตัวอย่างดังนี้

1. ตัวอย่างที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เป็นตัวอย่างที่เหลือจากโครงการ
จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนเรสไพราทอรีซินไซเทียลไวรัสจากแผนกกุมารเวช
ศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. ตัวอย่างที่เก็บจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ที่เหลือจากโครงการการศึกษาการ
ติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วยโรคปอดอักเสบ ที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยหนักกุมารเวช
กรรมของโรงพยาบาลชลบุรีซึ่งเป็นงานบริการประจำวันของทางศูนย์เชี่ยวชาญ
เฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก

จำนวนประชากร

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

โดยที่ n คือ จำนวนตัวอย่าง

Z คือ ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่าเท่ากับ 1.96

p คือ อัตราความชุกของ HPIV ของตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินหายใจจาก
การศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.36% โดยเฉลี่ย (Morgan W. et al.,2012)

q คือ 1-p

d คือ ค่าความคลาดเคลื่อน เท่ากับ 0.05

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.093) (1 - 0.093)}{(5/100)^2} = 129.61$$

เมื่อแทนค่าต่างๆ ในสมการแล้วจะได้จำนวนตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินหายใจเท่ากับ 130
ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่จะเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้โดยมีความผิดพลาด
ไม่เกินร้อยละ 5

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

1. Microcentrifuge tube 0.5 µl ,1.5 µl (Axygen, USA)
2. Pipette tip 10 µl, 200 µl ,1000 µl (Axygen, USA)

3. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
4. Magnetic stirrer (Thermolyne, USA)
5. Parafilm (American nation, USA)
6. Electrophoresis chamber (BioRAD, USA)
7. Vortex mixer (Scientific industry, USA)
8. Master cycler (Eppendorf, Germany)
9. Block heater (Lab Line instrument, USA)
10. Freezer -20° C (Sanyo, Japan)
11. Autoclave (Harvey, USA)
12. Gel Doc (BioRAD, USA)
13. Reagent Bottle 100 mL (Duran, USA)
14. Freezer 4 ° C (Misubishi, Japan)

สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลอง

สารเคมีสำหรับ Viral transport media

1. สารละลาย PBS (phosphate buffer saline) ปริมาณ 2 mL
2. ยาปฏิชีวนะ (Penicillin G (2×10^6 U/L), Streptomycin 200 mg/liter)

สารเคมีสำหรับสกัด RNA โดยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป HiYield™ Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan)

1. 95% ethanol
2. RNase-free water

สารเคมีสำหรับการเปลี่ยน RNA ให้กลายเป็น complementary DNA

1. Random hexamer (Promega, USA)
2. dNTP (deoxynucleotide triphosphate) (Promega, USA)
3. MMLV Reverse transcriptase (Promega, USA)

4. RNase Inhibitor (Promega, USA)

สารเคมีสำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

1. Master mix (5PRIME, Germany)
2. Distilled water
3. Magnesium Chloride
4. PCR Primers
5. DNA Template

สารเคมีสำหรับการทำ electrophoresis

1. DNA Marker (Promega, USA)
2. Agarose Gel (Promega, USA)
3. Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
4. 1X TBE Buffer

สารเคมีสำหรับการ Purify DNA

1. Expin™ Gene ALL purified DNA kit (GeneAll Biotechnology, Korea)
2. Isopropanol (Sigma, Singapore)
3. Ethanol

สารเคมีสำหรับการโคลนนิ่ง

1. p-GEM T Easy vector (Promega, USA)
2. X-gal (Promega, USA)
3. Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside (IPTG) (Eppendorf, Germany)
4. Tryptone powder (Giboco BRL, USA)
5. Yeast Extract (GIBCO, Singapore)
6. Sodium chloride (Sigma, Singapore)
7. Magnesium sulfate (Sigma, Singapore)
8. Glucose (Giboco BRL, USA)

9. Agar (GIBCO, Singapore)

สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด

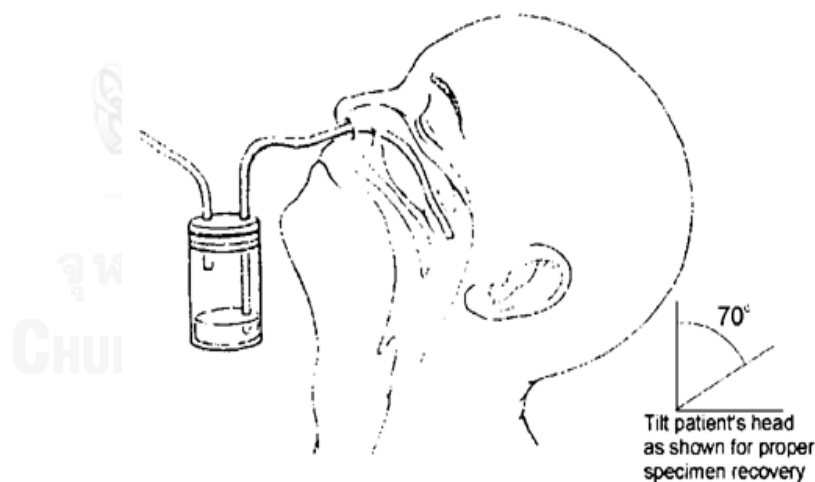
1. Fast Plasmid Mini (Eppendorf, Germany)
2. Isopropanol (Sigma, Singapore)

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างในระบบทางเดินหายใจ

1. Nasopharyngeal aspirate

วิธีการเก็บตัวอย่างให้ใช้น้ำเกลือปราศจากเชื้อฉีดเข้าไปในโพรงจมูก และดูดเก็บตัวอย่างใส่กระบอกเก็บตัวอย่างแล้วปิดฝาให้สนิท (รูปที่ 11) ตัวอย่างจะถูกเก็บใน Viral transport media (VTM) ที่ประกอบด้วยสารละลาย PBS ที่มียาปฏิชีวนะ (Penicillin G (2×10^6 U/L), Streptomycin 200 mg/liter) หลังจากได้รับตัวอย่างแล้วจะทำการแบ่งตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube เพื่อทำการสกัดสารพันธุกรรมแล้วเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -70°C



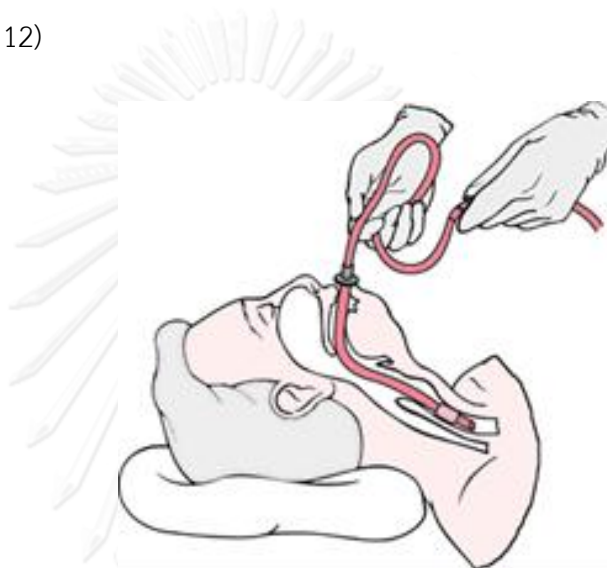
รูปที่ 11 แสดงวิธีการเก็บน้ำล้างโพรงจมูก

(http://portal.mah.harvard.edu/departments/pathology/lab_manual/images/n

aso.gif)

2. Tracheal suction และ Endotracheal suction

การทำ Endotracheal suction คือ การส่งสิ่งตรวจผ่านทางท่อช่วยหายใจ ช่วยให้สามารถดูดสิ่งส่งตรวจที่อยู่ในทางเดินหายใจส่วนล่างออกมาได้ง่าย โดยเฉพาะในกรณีที่ผู้ป่วยไม่รู้สึกรู้สีกตัว ไม่สามารถไอขับเสมหะออกได้ การใส่ Endotracheal tube เข้าทางปาก (orotracheal) หรือทางจมูก (nasotracheal) โดยผ่าน epiglottis vocal cord เข้าสู่ trachea (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงวิธีการเก็บ tracheal & endotracheal suction

(<http://img.tfd.com/mk/E/X2604-E-34.png>)

การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส (RNA extraction)

- ตัวอย่างที่ได้จะนำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
- แบ่งตัวอย่างปริมาตร 200 μ l ใส่ microcentrifuge tube จากนั้นเติม VB buffer ลงไป จากนั้นนำไป vortex
 - incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
 - เติม 95% ethanol ลงไป นำไป vortex
 - นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน VB column ที่เตรียมไว้ให้จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 13,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 1 นาทีแล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
 - เติม W1 buffer ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง

- เติม R-Wash buffer ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลาประมาณ 1 นาที แล้วเท ส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นต่ออีก 5 นาทีเพื่อให้สารที่เหลือใน column หายไปจนหมด
- ย้าย column ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากนั้นเติม RNase free water 50 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อชะล้าง RNA จาก column ลงไปใน microcentrifuge tube

การทำ Reverse transcription

นำ RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) โดยวิธี Reverse Transcription ด้วย Improm II (Promega) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

- นำ RNA 5 μ l มาผสมกับ Dep C 5 μ l และ Random hexamer 1 μ l ให้เข้ากัน
- Incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำไป incubate ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงปั่นตก
- เติมสารละลาย Improm II ปริมาตร 15 μ l ผสมให้เข้ากัน
- Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 5 นาที
- Incubate ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นตก
- Incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C อีก 15 นาที
- นำ cDNA ที่ได้เก็บที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

การตรวจสอบ cDNA

1. ทำการตรวจสอบ cDNA ด้วยการตรวจสอบยีน GAPDH ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ปริมาณสารต่างๆ และสภาวะสำหรับทำ PCR ดังตารางที่ 2-4
2. ตรวจสอบผลการทำ PCR โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR มาผ่านกระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% gel agarose จากนั้นจึงนำไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วเปรียบเทียบ PCR product ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ผ่านเครื่องฉาย UV ซึ่งคาดว่า จะได้ PCR product ขนาด 499 bp โดยประมาณ

ตารางที่ 2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH

สารละลาย	ปริมาตร (volume/tube)
Distilled water	4.5 μ l
Master Mix	7.5 μ l
Forward primer	0.25 μ l
Reverse primer	0.25 μ l
DNA template	1 μ l
Total volume	13.5 μ l

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH

Primer	Sequence (5' \rightarrow 3')	PCR product
GAPDH_F112	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	491 bp
GAPDH_R603	GTTGTCATGGATGACCTTGGC	

ตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้ทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน GAPDH

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94 °C	3 นาที	1
Denaturation	94 °C	18 วินาที	40
Annealing	50 °C	21 วินาที	
Extension	72 °C	1: 30 นาที	
Final extension	72 °C	10 นาที	1
Hold	25 °C	5 นาที	1

การตรวจหาเชื้อ HPIV ด้วยวิธี Multiplex Semi-Nested PCR

- วิธีการออกแบบไพรเมอร์
ออกแบบไพรเมอร์โดยการเพิ่มจำนวนยีนในบริเวณ HN gene ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะระหว่างสายพันธุของ HPIV เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส ในตัวอย่างส่งตรวจ และเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ ในระดับโมเลกุลของเชื้อ HPIV โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPIV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank เป็นแหล่งอ้างอิงสำหรับการออกแบบไพรเมอร์
- นำ cDNA ที่ได้ไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ในบริเวณ HN gene โดยวิธี multiplex semi nested PCR เพื่อคัดเลือกตัวอย่างที่มีเชื้อ HPIV โดยใช้ primer และปริมาณของ mixture และ condition ของ PCR ดังตารางที่ 5 – 9

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ HPIV

Primer	Sequence (5' → 3')	Application
F_PIV 1	<u>ATTTAGGTGCACTATAGACACCAGCAGGAAGGACACA</u>	First & second round PCR
F_PIV 2	<u>ATTTAGGTGCACTATAGAAATCAATTCCTAAAAGGACATGT</u>	
F_PIV 3	<u>ATTTAGGTGCACTATAGCTCACCAACAAGATAACATATAT</u>	
F_PIV 4	<u>ATTTAGGTGCACTATAGATTCAATGGTGAAAAGAACATGG</u>	
R1_PIV1&3	TAAWACYTGATATGAYTTCCTATA	First round PCR
R1_PIV2&4	ATTAYATTGTGRGTRTAACACCAAT	
R2_PIV 1	CCTACGGGACATCTCCAGA	Second round PCR
R2_PIV 2	TTAGGCGTCCCATTGTATGATT	
R2_PIV 3	CCAGACGTGCATCTCCAGA	
R2_PIV 4	GAGGAGTTGTAGCAGTTGGAA	

หมายเหตุ – ส่วนที่ขีดเส้นใต้เป็นบริเวณ SP6 promoter สำหรับใช้ในการทำ nucleotide sequencing และ Degenerate nucleotides are **W** = A or T; **Y** = C or T; **R** = A or G

ตารางที่ 6 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ multiplex semi nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV รอบที่ 1

สารละลาย	ปริมาตร (Volume/tube)
Distilled water	8 μ l
Master Mix	12.5 μ l
Forward primer 10 μ M (F_PIV1)	0.25 μ l
Forward primer 10 μ M (F_PIV2)	0.25 μ l
Forward primer 10 μ M (F_PIV3)	0.25 μ l
Forward primer 10 μ M (F_PIV4)	0.25 μ l
Reverse primer 10 μ M (R1_PIV1&3)	0.5 μ l
Reverse primer 10 μ M (R1_PIV2&4)	0.5 μ l
DNA template	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
Total volume	25 μ l

ตารางที่ 7 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ multiplex semi nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV รอบที่ 2

สารละลาย	ปริมาตร (Volume/tube)
Distilled water	8 μ l
Master Mix	12.5 μ l
Forward primer 10 uM (F_PIV1)	0.25 μ l
Forward primer 10 uM (F_PIV2)	0.25 μ l
Forward primer 10 uM (F_PIV3)	0.25 μ l
Forward primer 10 uM (F_PIV4)	0.25 μ l
Reverse primer 10 uM (R2_PIV1)	0.25 μ l
Reverse primer 10 uM (R2_PIV2)	0.25 μ l
Reverse primer 10 uM (R2_PIV3)	0.25 μ l
Reverse primer 10 uM (R2_PIV4)	0.25 μ l
DNA template (จาก PCR รอบที่1)	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
Total volume	25 μ l

ตารางที่ 8 สภาวะที่ใช้ทำ multiplex Semi-Nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV ด้วย PCR รอบที่ 1

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94 °C	4 นาที	1
Denaturation	94 °C	45 วินาที	40
Annealing	55 °C	45 วินาที	
Extension	72 °C	45 วินาที	
Final extension	72 °C	7 นาที	1
Hold	25 °C	5 นาที	1

ตารางที่ 9 สภาวะที่ใช้ทำ multiplex Semi-Nested PCR เพื่อ screening เชื้อ HPIV ด้วย PCR รอบที่ 2

PCR reaction	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94 °C	4 นาที	1
Denaturation	94 °C	45 วินาที	40
Annealing	53 °C	45 วินาที	
Extension	72 °C	45 วินาที	
Final extension	72 °C	7 นาที	1
Hold	25 °C	5 นาที	1

ตรวจสอบ PCR product ที่ต้องการด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 2% Agarose gel และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของ DNA และย้อมดูแถบ DNA ที่ต้องการด้วยสารละลาย Ethidium Bromide นำไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 428, 428, 422, 486 นิวคลีโอไทด์ สำหรับ HPIV type 1 ถึง HPIV type 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ในการแปลผล ตัวอย่างที่ขึ้นแถบที่จำเพาะกับ HPIV จะถูกนำไปทำการ sequencing และจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลต่อไป

ตารางที่ 10 ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ multiplex semi nested PCR

สายพันธุ์ของเชื้อ HPIV	ขนาดของ PCR Product
1	428
2	428
3	422
4	486

การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากทำการตรวจสอบ PCR product ผ่านแสง UV จากนั้นตัด gel ในส่วนที่มีแถบของ DNA ที่ต้องการ ทำให้บริสุทธิ์โดยชุด Expin™ for purify DNA fragment kit (GeneAll, Korea) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- เติมสารละลาย GB buffer 500 ul ลงใน microcentrifuge tube ที่มี gel อยู่ จากนั้น incubate ที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน SV column แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็น เวลา 1 นาที
- เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม NW buffer 700 ul แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็น เวลา 30 วินาที
- เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- นำ column filter ใส่ microcentrifuge tube จากนั้นเติม elution buffer ประมาณ 50 ul แล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ column แห้ง
- จากนั้น centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วตกลงไปใน microcentrifuge Tube

ตรวจสอบ PCR product ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จำนวน 5 ul มา ทำการวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ โดยวิธี gel electrophoresis ใน 2% gel agarose อีกครั้ง เพื่อตรวจสอบว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วจึงส่งไปทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ยัง บริษัท First Base laboratories SDN BHD โดยใช้ไพรเมอร์ SP6 เป็น sequencing primer เมื่อได้ผลแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ผลต่อไป

การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ HPIV ในตัวอย่าง ควรตรวจสอบโดยนำไพรเมอร์ที่ได้ ออกแบบไว้มาทำการทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกในไวรัสที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ โดยไวรัสที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจสามารถแบ่งออก ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ ได้แก่ Influenza virus (H3N2) , RSV (RSV-A, RSV-B) , Corona virus (OC43, HKU-1), Metapneumovirus, Rhinovirus (HRV-A, HRV-C) และไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ ได้แก่ Adenovirus

การเตรียม Positive Control ด้วยวิธีการ Cloning

สำหรับการเตรียม Positive control ด้วยวิธีการ Cloning จะสามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ เพื่อหาความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ต่อไป

1. ขั้นตอนการ Ligation โดย p-GEM T Easy vector กับ PCR product โดยเตรียม mixture ดังนี้

- 2X ligation buffer 5 μ l
- 50 ng/ μ l p-GEM T Easy vector 1 μ l
- T4 DNA ligase 1 μ l
- PCR Product 3-5 μ l

จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

2. ขั้นตอน Transformation

- นำ competent cell (*E.coli* DH5 α) 50 μ l เติมนสารละลายที่ ligate 5 μ l
- จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน นำไป chill ice 20 นาที
- Heat shock ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 42 วินาที
- Chill ice 2 นาที
- เติม SOC medium 950 μ l
- นำไป shake ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1.30 นาที
- จากนั้นนำไปปั่นที่ 4,000 rpm 5 นาที แล้วเท supernatant ทิ้ง
- เติม X-gal 15 μ l และ IPTG 5 μ l
- Spread plate แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

3. ขั้นตอนการเลือก colony

- เลือก colony ที่มีสีขาว ที่ขึ้นบน plate
- Colony ที่เลือกได้ ใส่ลงใน LB Broth ปริมาตร 1000 μ l
- นำไปใส่ในตู้ shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4. ขั้นตอนการสกัด Plasmid

- นำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาใส่ลงใน tube ปริมาตร 2 μl
- Centrifuge ที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เท supernatant ที่ทิ้ง จากนั้นเติม lysis buffer 400 μl
- Vortex ให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
- นำ Lysate เปลี่ยนใส่ลงใน column แล้ว Centrifuge ที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เทส่วนล่างทิ้ง จากนั้นเติม Wash buffer 600 μl แล้ว Centrifuge ที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เทส่วนล่างทิ้ง จากนั้น ปั่น Dry 1 นาที แล้วจึงย้าย column ใส่ลงใน tube ใหม่
- เติม elution buffer ปริมาตร 50 μl แล้ว Centrifuge ที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Plasmid ที่ความยาวคลื่น 260 nm แล้ว คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย จากความสัมพันธ์ระหว่าง A_{260}/A_{280}

$$\text{DNA purity} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

โดย A_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงสุดของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

A_{280} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงสุดของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การคำนวณหาความเข้มข้นของ Plasmid (copy/ μl)

$$[\text{DNA}] = \frac{[\text{DNA}] (\text{g}/\mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{length of recombinant plasmid (nt)} \times 660}$$

โดย ขนาดความยาวของ recombinant plasmid มีขนาดเท่ากับ 3,015 นิวคลีโอไทด์ (pGEM T Easy vector) รวมกับขนาดของ insert product (bp)

การคำนวณค่าความไวของเทคนิค PCR ด้วยวิธี 10 fold-serial dilution

เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยปริมาณเชื้อของไวรัส (viral load) จะมีผลต่อความไวของเทคนิค PCR โดยนำ plasmid ที่จะใช้เป็น positive control มาทำ serial dilution โดยกำหนดให้ค่า dilution factor เท่ากับ 10 และมีค่าความเข้มข้นของ plasmid อยู่ระหว่าง 10^{12} - 10^0 copies/ μ l โดยค่าที่ยอมรับได้ของการทดสอบด้วยเทคนิค PCR มีค่าระหว่าง 10^4 - 10^2 copies/ μ l

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูล โดยวิธีการบันทึกลงบน data sheet เพื่อเตรียมวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

โปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

- **Bioedit**

เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์ โดยการรวบรวม reference sequence จากฐานข้อมูลเพื่อให้การออกแบบไพรเมอร์มีประสิทธิภาพที่ครอบคลุมมากขึ้น

- **Oligos**

เป็นโปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบโอกาสในการเกิด primer-dimer ของเส้นไพรเมอร์ที่ออกแบบ และคำนวณค่า Tm เส้นไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ยังใช้ในการ reverse complement ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ เพื่อเตรียมออกแบบ reverse primer

โปรแกรมที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขหลังการทำ nucleotide sequencing

- **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)**

เป็นอัลกอริทึมที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบ ข้อมูล sequence เช่น ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่แตกต่างกันหรือนิวคลีโอของลำดับดีเอ็นเอ BLAST ช่วยให้นักวิจัย

เปรียบเทียบลำดับข้อมูล sequence กับฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุลำดับของข้อมูลที่คล้ายคลึงกับลำดับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการค้นหาดังกล่าวข้างต้น

- **Chromas Sequence Chromatogram Viewer**

เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ sequencing โดยดูผลจาก chromatogram

- **DNASTAR's seqman**

เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยพิจารณาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล และข้อมูลจาก chromatogram นอกจากนี้ยังเชื่อมต่อข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมากกว่า 2 ข้อมูลเข้าด้วยกัน (assembly)

โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์เพื่อทำ Phylogenetic tree

- **Clustal X2**

เป็นโปรแกรมที่ช่วยในการจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูล (multiple alignment) เพื่อเตรียมข้อมูลในการสร้าง phylogenetic tree ต่อไป

- **MEGA 6.05**

เป็นซอฟต์แวร์ที่ใช้วิเคราะห์วิวัฒนาการพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ถูกพัฒนาขึ้นมาสำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบของดีเอ็นเอและโปรตีน ลำดับที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษา รูปแบบวิวัฒนาการของยีน จีโนมและความสัมพันธ์เชิงเวลา (Kumar et al, 1994; Tamura et al, 2011) เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ p -distance method และค่า bootstrap ในการทำซ้ำเท่ากับ 1000 ในการสร้าง phylogenetic tree

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลสัดส่วนความชุก แนวนอนตามฤดูกาลและลักษณะของการติดเชื้อ HPIV
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ซอฟต์แวร์สำเร็จรูป SPSS version 17 เปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้การ
ทดสอบ chi square ($p < 0.05$)

การวิเคราะห์ข้อมูล

- นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPIV เพื่อวิเคราะห์ระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV จาก respiratory samples ในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ในระหว่างปี 2010-2013 และศึกษาอัตราการก่อโรค ลักษณะอาการและความสัมพันธ์ของสายพันธุ์กับการทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ
- เปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree analysis) ด้วย ยีน HN ของเชื้อ HPIV สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ เพื่อศึกษาทำนายแนวโน้มการระบาดของเชื้อ HPIV

การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

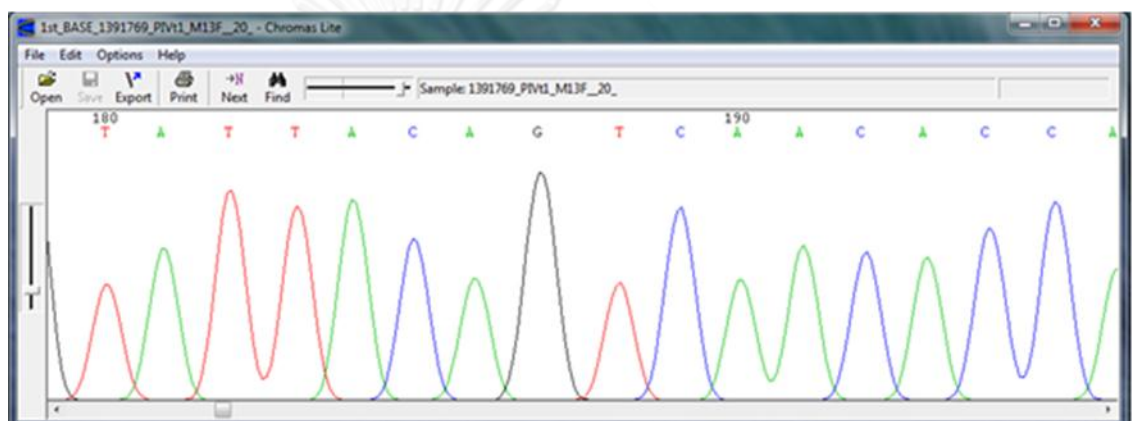
เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ในส่วนของยีน HN โดยใช้โปรแกรม sequin

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบ Positive control ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสทั้งสี่สายพันธุ์ จากนั้นนำไป clone เลือก white colony ทำการสกัดพลาสมิด แล้วส่ง sequencing ต่อไป ผลที่ได้จากการ blast พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจับได้กับเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสทั้งสี่สายพันธุ์



รูปที่ 13 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/USA/629-D02161/2009, complete genome	433	433	100%	4e-118	99%	KF687308.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/USA/38081A/2011, complete genome	433	433	100%	4e-118	99%	KF530212.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/USA/33095J/2011, partial genome	433	433	100%	4e-118	99%	KF530211.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/USA/38078A/2011, complete genome	433	433	100%	4e-118	99%	KF530203.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/WV/529-D02039/2009, partial genome	433	433	100%	4e-118	99%	JQ902007.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/WV/529-D01575/2009, partial genome	433					JQ902004.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/WV/529-D01790/2009, partial genome	433					JQ902001.1
Human parainfluenza virus 1 strain HPIV1/WV/529-D00387/2009, partial genome	433	433	100%	4e-118	99%	JQ901998.1
HPIV-1						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human parainfluenza virus 2 strain V98, complete genome	405	405	60%	2e-109	98%	AF532011.1
Human parainfluenza virus 2 strain Oklahoma/94/2002 hemagglutinin-neuraminidase gene, complete cds	394	394	60%	4e-106	97%	JF912194.1
Human parainfluenza virus 2 strain Riyadh_105/2002 hemagglutinin-neuraminidase (H5) gene, complete cds	394	394	60%	4e-106	97%	HM660808.1
Human parainfluenza virus 2 H5I mRNA for hemagglutinin-neuraminidase, complete cds, strain_Greec-11	377	377	60%	4e-101	96%	AF267954.1
Human parainfluenza virus 2 strain GREER, complete genome	377	377	60%	4e-101	96%	AF532012.1
Human parainfluenza virus 2 genomic RNA, complete genome	375	37				B176531.1
Parainfluenza type 2 virus NP, P, M, F, HN and L genes for nucleocapsid protein, phospho-protein, matrix protein, fusion	375	37				S7559.1
Human parainfluenza virus 2 H5I mRNA for hemagglutinin-neuraminidase, complete cds	372	37				00865.1
Human parainfluenza virus 2 H5I mRNA for Hemagglutinin-neuraminidase, complete cds, isolate_62-M736	355	355	60%	2e-94	94%	AF182948.1
Human parainfluenza virus 2 H5I mRNA for Hemagglutinin-neuraminidase, complete cds, isolate_TC-6558	333	333	59%	8e-88	93%	AF182953.1
HPIV-2						

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human parainfluenza virus 3 strain Riyadh_43/2008_hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene_complete cds	669	669	92%	0.0	99%	JX11646.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/SA/2001/136/2008_partial genome	641	641	92%	1e-180	98%	KF687321.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/MEX/3640/2007_partial genome	641	641	92%	1e-180	98%	VF687328.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/MEX/3593/2007_partial genome	641	641	92%	1e-180	98%	5687327.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/MEX/2841/2006_partial genome	641	641	92%	1e-180	98%	5687326.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/MEX/2822/2006_partial genome	641	641	92%	1e-180	98%	5687324.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/MEX/1512/2005_partial genome	641	641	92%	1e-180	98%	KF687322.1

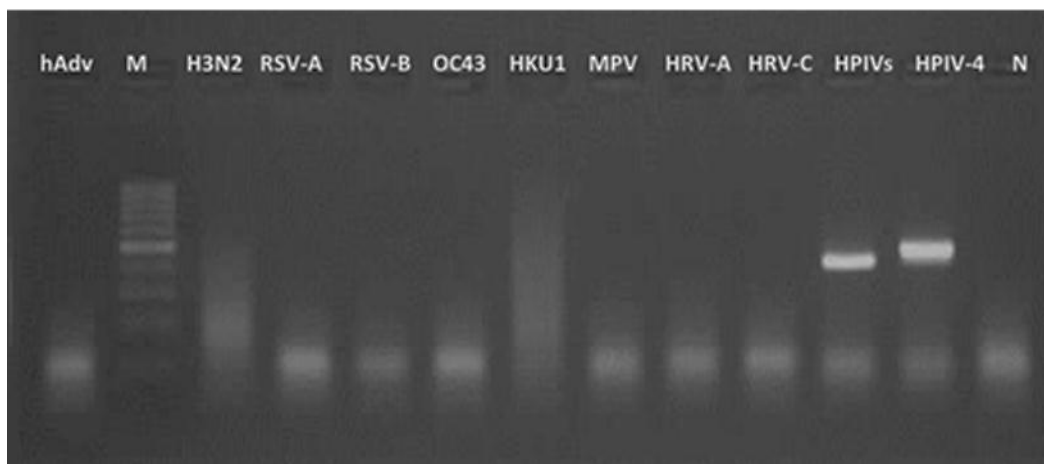
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2594-Yamagata-2011	483	483	100%	5e-133	99%	AB753487.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_3181-Yamagata-2011	483	483	100%	5e-133	99%	AB753482.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2679-Yamagata-2011	483	483	100%	5e-133	99%	AB753465.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2582-Yamagata-2011	477	477	100%	2e-131	99%	AB753485.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2526-Yamagata-2011	477	477	100%	2e-131	99%	53484.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2532-Yamagata-2011	466	466	100%	5e-128	98%	53486.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2665-Yamagata-2011->dbjAB753	466	466	100%	5e-128	98%	53463.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2555-Yamagata-2011	466	466	100%	5e-128	98%	AB753466.1
Human parainfluenza virus 4a HPI gene for hemagglutinin-neuraminidase_partial cds_strain_2520-Yamagata-2011	466	466	100%	5e-128	98%	AB753464.1

รูปที่ 14 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BLAST

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค multiplex semi-nested PCR

เมื่อได้ positive control แล้ว ทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อ HPIV ด้วยวิธี multiplex semi-nested PCR ในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ได้แก่ nasopharyngeal aspirate, endotracheal suction, tracheal suction ซึ่งเก็บจากผู้ป่วยเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลชลบุรี ระหว่างปี 2010-2013 โดย PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ทั้งสองรอบนั้นมีขนาด 428, 428, 422 และ 486 bp สำหรับ HPIV สายพันธุ์ที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ

- ความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์ (specificity) ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ ถูกตรวจสอบโดยการทดสอบกับไวรัสที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ทั้งที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA และ RNA โดยไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ได้แก่ Adenovirus และไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ได้แก่ Influenza virus (H3N2) , RSV (RSV-A, RSV-B) , Corona virus (OC43, HKU-1), Metapneumovirus, Rhinovirus (HRV-A, HRV-C) จากผลการตรวจสอบพบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อเชื้อ HPIV และไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่นๆได้ (รูปที่ 15)

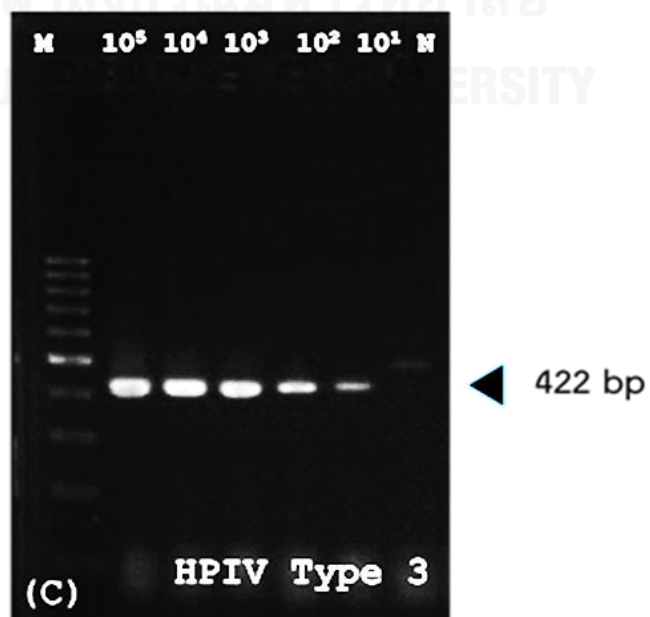
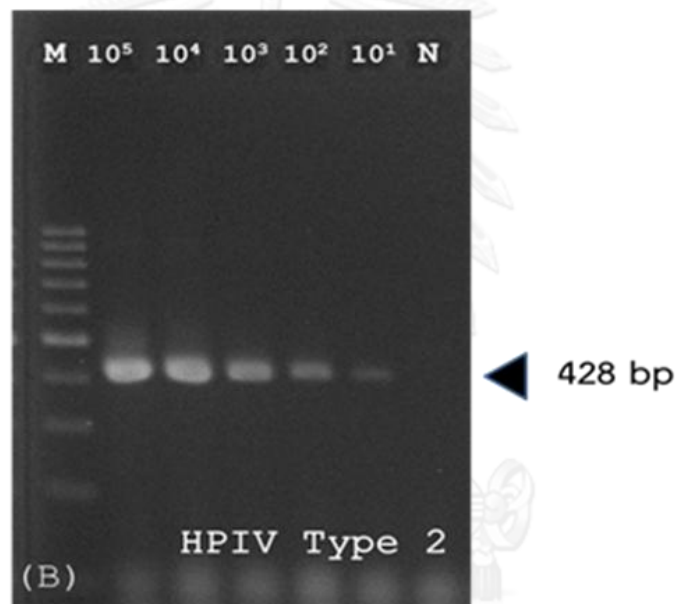
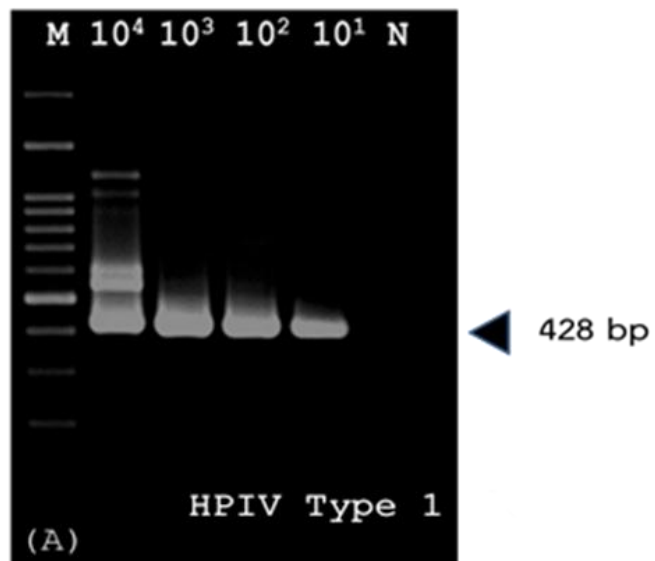


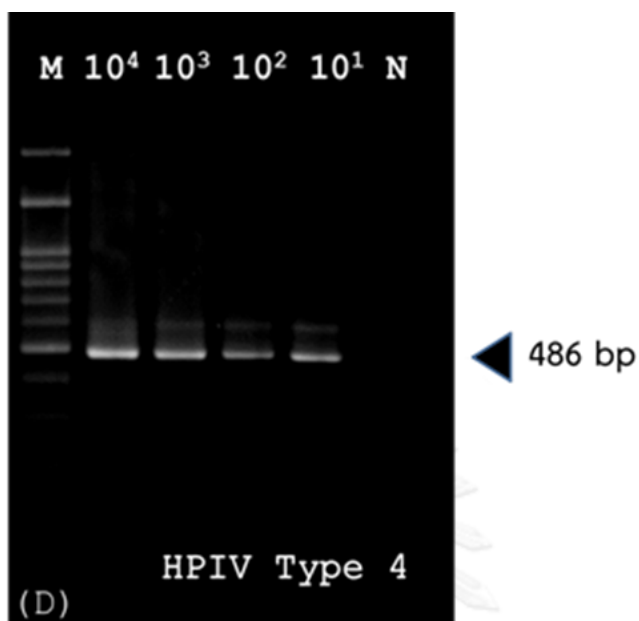
รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

- ความไวของการตรวจวิเคราะห์ (sensitivity) สามารถดูได้จากการทำ serial dilution ของ positive control ซึ่งเตรียมได้จากวิธี cloning แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย plasmid แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย โดยการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย plasmid ในหน่วย copy/ μ l

$$[\text{DNA}] = \frac{[\text{DNA}] (\text{g}/\mu\text{l}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{length of recombinant plasmid (nt)} \times 660}$$

จากนั้น dilute สารละลาย plasmid สำหรับใช้เป็น positive control ให้มีความเข้มข้น 1×10^{12} ถึง 1×10^0 copy/ μ l และใช้เป็น DNA ตั้งต้นสำหรับการทำ Multiplex semi-nested PCR ในรอบที่ 1 สำหรับ PCR รอบที่ 2 พบว่าเทคนิคนี้มีความไวเท่ากับ 10^1 copy/ μ l โดยจะใช้ PCR product ในรอบแรกที่ได้จากการทำ serial dilution มาเป็น template ตั้งต้นในรอบที่ 2 โดยในรอบที่ 2 จะได้ PCR Product มีขนาด 428, 428, 422 และ 486 bp สำหรับ HPIV สายพันธุ์ที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ ดังรูปที่ 16





รูปที่ 16 ผลการตรวจวิเคราะห์ความไวของเทคนิค multiplex semi-nested PCR

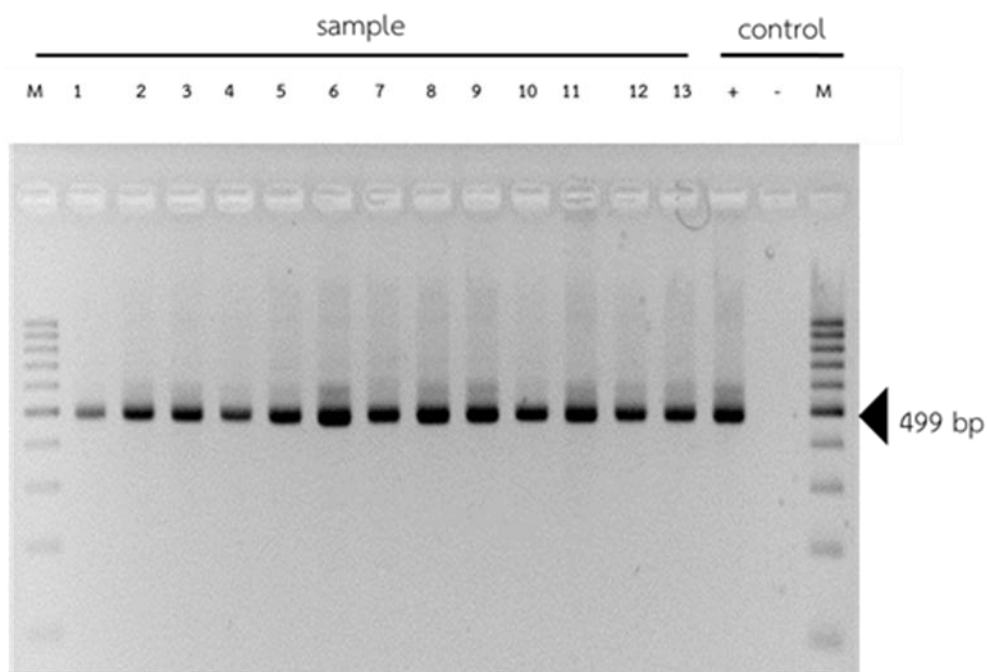
- (A) แสดงค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HPIV-1
- (B) แสดงค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HPIV-2
- (C) แสดงค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HPIV-3
- (D) แสดงค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HPIV-4

3. ผลการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

3.1 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH

ทำการตรวจสอบยีน GAPDH ที่กำหนดการสร้าง glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการสลายกลูโคส (glycolysis pathway) โดยยีน GAPDH นี้เป็น House Keeping Gene ซึ่งจะมีระดับการแสดงออกที่เท่าๆ กันในแต่ละเซลล์ พบว่า 650 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ มีการแสดงออกของยีน GAPDH

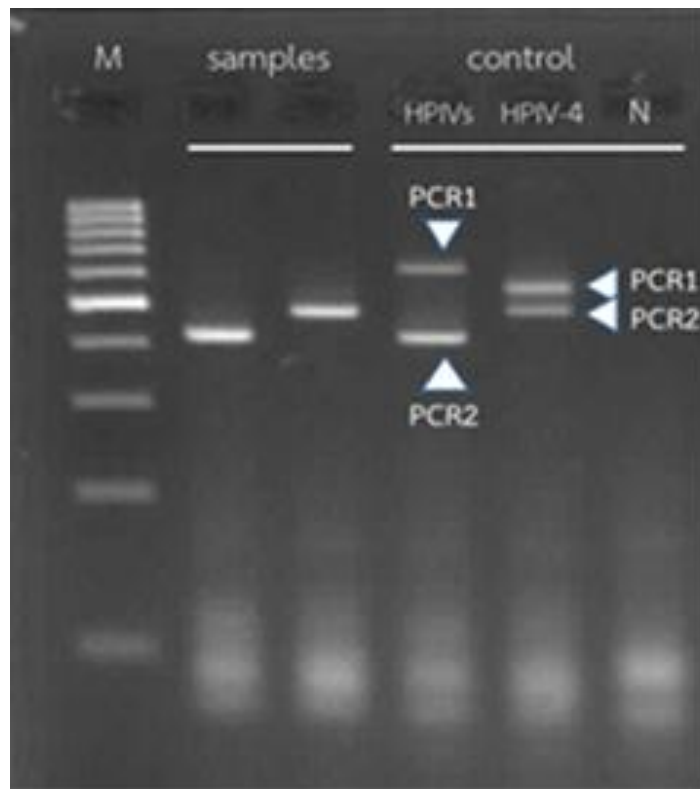
แสดงว่า วิธีการเก็บตัวอย่าง การสกัดสารพันธุกรรม และขั้นตอนการเปลี่ยนสารพันธุกรรม (reverse transcription) มีความถูกต้อง สามารถนำไปทดลองในขั้นต่อไปได้



รูปที่ 17 ตัวอย่างผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GAPDH

3.2 ผลการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HPIV

ในตัวอย่างที่มาจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง จำนวน 650 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีด้วยวิธี Multiplex semi-nested PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 31 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.76% (รูปที่ 18) และสามารถแบ่งผลการวิเคราะห์ ได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ จำนวนตัวอย่างที่ติดเชื้อในแต่ละสายพันธุ์, ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ HPIV ตามช่วงอายุของผู้ป่วย, ระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV ตามฤดูกาล และลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV



รูปที่ 18 ตัวอย่างผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HPIV

โดย

เลนที่ 1 แสดงแถบวัดขนาด DNA (DNA Marker)

เลนที่ 2 และ 3 แสดงตัวอย่างให้ผลบวกกับเชื้อ HPIV

เลนที่ 4 แสดง Positive control ของเชื้อ HPIV สายพันธุ์ที่ 1, 2 และ 3

เลนที่ 5 แสดง Positive control ของเชื้อ HPIV สายพันธุ์ที่ 4

เลนที่ 6 แสดง Negative control ของการทำ PCR

- ผลการวิเคราะห์การติดเชื้อ HPIV ในแต่ละสายพันธุ์

เมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี multiplex semi-nested PCR พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HPIV ทั้งสิ้น 31 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ถูกจำแนกเป็น HPIV- 1 จำนวน 5 ตัวอย่าง HPIV- 3 จำนวน 15 ตัวอย่าง และ HPIV-4 จำนวน 11ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16, 48 และ 36 ตามลำดับของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก จากผลการตรวจวิเคราะห์ สามารถบอกได้ว่าระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV ในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างระหว่างปี 2010-

2013 นั้น เชื้อ HPIV-3 มีการระบาดสูงที่สุด รองลงมา คือ HPIV-4 และ HPIV-1 ตามลำดับ สำหรับเชื้อ HPIV-2 ไม่พบในการศึกษาครั้งนี้

- ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ HPIV วิเคราะห์ตามช่วงอายุของผู้ป่วย

เพื่อดูแนวโน้มการติดเชื้อชนิดนี้ ในเด็กที่มีช่วงอายุแตกต่างกัน พบว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPIV มีตั้งแต่อายุ 1 เดือนถึง 5 ขวบ สามารถแบ่งกลุ่ม การศึกษาออกเป็น 5 ช่วง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ในช่วงอายุตั้งแต่	0-3	เดือน
กลุ่มที่ 2 ในช่วงอายุตั้งแต่	4-6	เดือน
กลุ่มที่ 3 ในช่วงอายุตั้งแต่	7-12	เดือน
กลุ่มที่ 4 ในช่วงอายุตั้งแต่	13 -24	เดือน
กลุ่มที่ 5 ในช่วงอายุตั้งแต่	3-5	ปี

จากผลการวิเคราะห์พบว่า ช่วงอายุที่มีการติดเชื้อ HPIV มาก คือ ช่วงอายุ 13 -24 เดือน และช่วงอายุที่มีการติดเชื้อน้อยที่สุดคือ ช่วงอายุ 0-3 เดือน เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำมีความสำคัญในการป้องกันโรคมากกว่าภูมิต้านทานชนิดเซลล์และอินเตอร์เฟอรอน ซึ่งแอนติบอดีที่ช่วยป้องกันโรคได้ดีที่สุดคือ secretory IgA โดยเด็กวัยนี้จะได้รับจากมารดาผ่านทางน้ำนม

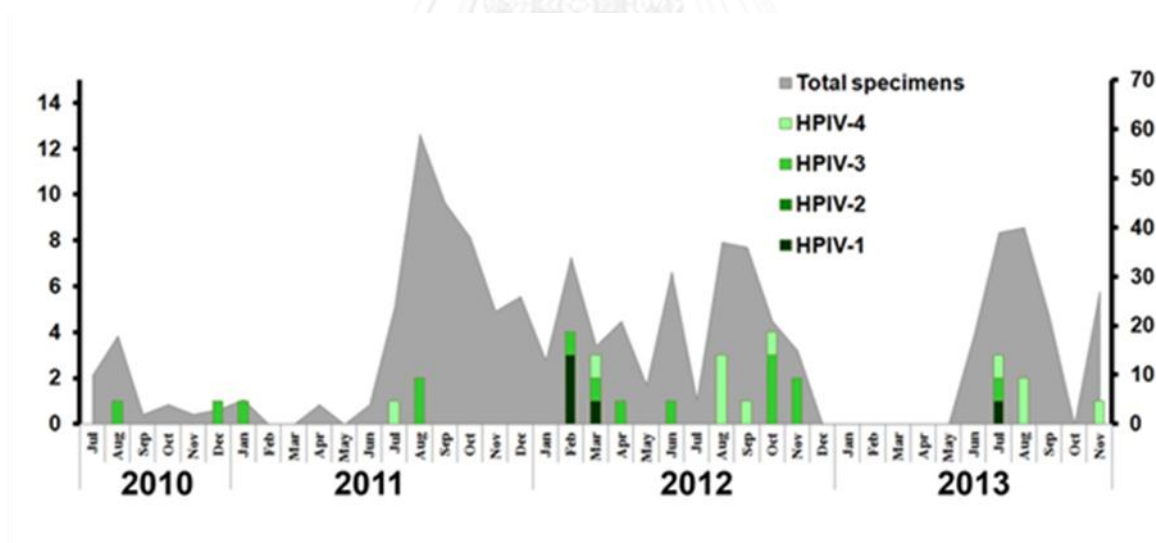
ตารางที่ 11 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาแบ่งตามช่วง

อายุ

ช่วงอายุ	HPIV-1	HPIV-2	HPIV-3	HPIV-4
0-3 เดือน	0	0	0	1
4-6 เดือน	2	0	1	1
7-12 เดือน	1	0	1	2
13-24 เดือน	2	0	9	7
3-5 ปี	0	0	4	0

- ผลการศึกษาาระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV ตามฤดูกาล

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อ HPIV ในระหว่างปี 2010-2013 พบว่ามีการแพร่ระบาดของเชื้อ HPIV แต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบการแพร่กระจายที่แตกต่างกัน ฤดูกาลสำหรับการวิเคราะห์สามารถแยกออกเป็น 3 ช่วงเวลา ดังต่อไปนี้ ช่วงฤดูร้อน (เดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน) ฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม) และ ฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม) จากการศึกษาครั้งนี้พบความชุกตามฤดูกาลของเชื้อ HPIV เกือบทุกสายพันธุ์ สามารถตรวจพบได้ทุกปี รูปแบบการกระจายตามฤดูกาลของ HPIV ไม่แน่นอน (รูปที่ 19) HPIV-1 สามารถพบการติดเชื้อได้ในช่วงฤดูร้อน HPIV-3 สามารถพบการระบาดได้เกือบตลอดทั้งปี ส่วน HPIV-4 นั้น ไวรัสสายพันธุ์นี้พบในฤดูฝน และจะพบการติดเชื้อได้ระหว่างปลายฤดูฝนและต้นฤดูหนาว สำหรับ HPIV-2 ไม่ได้ถูกตรวจพบในช่วงเวลาของการศึกษา



รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการระบาดของเชื้อ HPIVs กับฤดูกาลในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา

- **ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV**

เมื่อดูความสัมพันธ์ทางคลินิกของการติดเชื้อ HPIV ส่วนใหญ่พบว่า ผู้ป่วยมีอาการรุนแรง เช่น ปอดบวม (pneumonia), ปอดบวมรุนแรง (severe pneumonia), หลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) ซึ่งอาการเหล่านี้สามารถพบได้ไม่แตกต่างจากการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ในระบบทางเดินหายใจ (ตารางที่ 12)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV

Code	Sex	Types of sample	Types of HPIVs infection	Co-infected virus	Signs and Sympstoms	Accession number
CU23	F	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187002
CU39	M	NP suction	HPIV 3	Rhinovirus	Pneumonia	KJ187003
CU44	M	NP suction	HPIV 3	Rhinovirus	Pneumonia	KJ187004
CU53	M	NP suction	HPIV 4a	-	Pneumonia	KJ187005
CU108	F	NP suction	HPIV 3	Rhinovirus	Pneumonia	KJ187006
CU130	F	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187007
CU282	F	NP suction	HPIV 1	-	Pneumonia	KJ187008
CU284	M	NP suction	HPIV 1	-	Pneumonia	KJ187009
CU285	F	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187010
CU311	F	NP suction	HPIV 1	-	Pneumonia	KJ187011
CU316	F	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187012
CU317	F	NP suction	HPIV 1	-	Pneumonia	KJ187013
CU327	M	NP suction	HPIV 4b	-	Pneumonia	KJ187014
CU333	M	NP suction	HPIV 3	Metapneumo Virus	Pneumonia	KJ187015
CU380	M	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187016

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPIV (ต่อ)

Code	Sex	Types of sample	Types of HPIVs infection	Co-infected virus	Signs and Sympstoms	Accession number
CU398	F	NP suction	HPIV 4a	RSV	Pneumonia	KJ187017
CU409	M	NP suction	HPIV 4b	-	Pneumonia	KJ187018
CU422	M	NP suction	HPIV 4a	-	Pneumonia	KJ187019
CU439	M	NP suction	HPIV 4a	-	Pneumonia	KJ187020
CU475	M	NP suction	HPIV 3	-	Bronchiolitis	KJ187021
CU478	F	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187022
CU479	M	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187023
CU489	M	NP suction	HPIV 4a	-	Pneumonia	KJ187024
CU501	M	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187025
CU503	M	NP suction	HPIV 3	-	Pneumonia	KJ187026
cb26-2	M	tracheal suction	HPIV 3	-	Severe pneumonia	KJ187027
27	M	NP suction	HPIV 4b	-	Severe pneumonia	KJ187028
36	M	NP suction	HPIV 1	-	Severe pneumonia	KJ187029
62-1	M	tracheal suction	HPIV 4b	-	Severe pneumonia	KJ187030
83	M	NP suction	HPIV 4a	-	Severe pneumonia	KJ187031
113	M	ET suction	HPIV 4a	-	Severe pneumonia	KJ187032

3.3 ผลการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPIVs และไวรัสชนิดอื่นในระบบทางเดินหายใจ

ไวรัสในระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ ที่มีการติดเชื้อร่วมกับ HPIV ได้แก่ HRV, MPV และ RSV โดยไวรัสที่มีการติดเชื้อร่วมกับ HPIV มากที่สุด คือ HRV

ตารางที่ 14 ผลการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPIVs และไวรัสชนิดอื่นในระบบทางเดินหายใจอื่น

ลักษณะการติดเชื้อ	HPIV-1	HPIV-2	HPIV-3	HPIV-4
ติดเชื้อเดี่ยว	5	0	11	10
ติดเชื้อร่วมกับ Rhinovirus	0	0	3	0
ติดเชื้อร่วมกับ Metapneumovirus	0	0	1	0
ติดเชื้อร่วมกับ Respiratory syncytial virus	0	0	0	1
ติดเชื้อร่วมกับ Influenza virus	0	0	0	0

นอกจากนี้จากตัวอย่างในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HPIV ทั้ง 31 ตัวอย่าง นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้แก่ HRV, RSV, MPV และ Influenza virus พบว่ามีทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง ที่มีการติดเชื้อ HPIV ร่วมด้วย และไม่พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPIV กับ Influenza virus สำหรับการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ ร่วมกับ HPIV นั้นพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบการติดเชื้อ HPIV เพียงอย่างเดียวทั้งหมด 26 ตัวอย่าง คิดเป็น 83.9% ของตัวอย่างทั้งหมดที่มีการติดเชื้อ HPIV

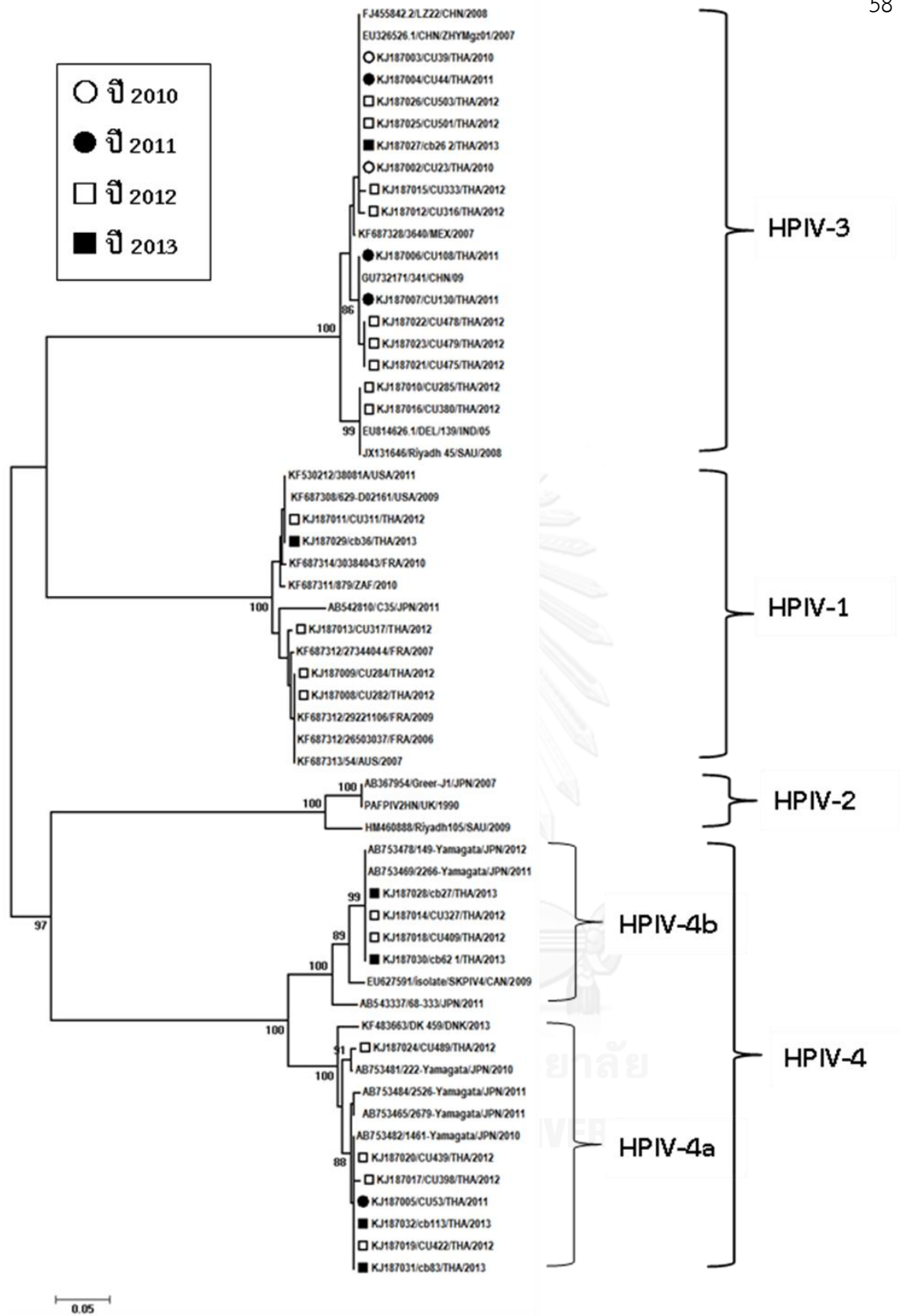
4. ผลการจำแนกสายพันธุ์เชิงชีวโมเลกุลและการหาความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการบนยีน HN ด้วยวิธี Phylogenetic analysis

ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPIV ที่นิยมใช้ส่วนของยีน HN ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ เนื่องจากยีน HN เป็นส่วนที่มี immune pressure โดยบริเวณนี้จะเป็นส่วนที่ไวรัสใช้เกาะกับ host cell receptors และผลที่ได้จากการวิเคราะห์การติดเชื้อ HPIV ในสิ่งส่งตรวจและการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPIV เป็นที่น่าเชื่อถือ เมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี multiplex semi-nested PCR พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HPIV ทั้งสิ้น 31 ตัวอย่าง ซึ่งมี accession number KJ187002 - KJ187032 รายละเอียดดังตารางที่ 12 มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูล HPIV ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank และสร้าง Phylogenetic tree พบว่า ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV ด้วยการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HN มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับ HPIV

strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ในสายพันธุ์เดียวกัน นั้น มีค่า % sequence identity matrix ตั้งแต่ 84.4 - 100 % (ตารางที่ 14) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ HPIV เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank แสดงให้เห็นว่าการระบาดของเชื้อ HPIV มีการกระจายไปทั่วโลก สำหรับการวิเคราะห์ Phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม MEGA6 (www.megasoftware.net) นั้น เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์ *p*-distance method และค่า bootstrap ในการทำซ้ำเท่ากับ 1000 ดังรูปที่ 20 แสดงให้เห็นว่าลำดับสายวิวัฒนาการของ HPIV ถูกแยกออกเป็นสองกลุ่มหลัก แต่ละกลุ่มจะได้รับการจำแนกออกเป็นกิ่งย่อย โดย HPIV ทั้งสี่สายพันธุ์ ถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 100 โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HPIV-1 ทั้ง 5 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับ HPIV ที่พบที่ประเทศ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฝรั่งเศส ออสเตรเลีย และ แอฟริกาใต้ สำหรับ 15 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HPIV-3 พบว่ามีเพียง 2 ตัวอย่าง ที่มีความคล้ายคลึงกับที่ระบาดในประเทศอินเดีย (strain DEL/139/05) และประเทศซาอุดีอาระเบีย (strain Riyadh 45/2008) ด้วยค่า bootstrap เท่ากับ 99 และอีก 13 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ HPIV ที่พบในประเทศเม็กซิโก จีน และญี่ปุ่น จากการศึกษา HPIV -4 ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ Yamagata ที่มีรายงานจากประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี 2010 ไปจนถึงปี 2012 ดังรูปที่ 20

ตารางที่ 15 ผลการเปรียบเทียบค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ของเชื้อ HPIV ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ HPIV สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

	HPIV-1	HPIV-2	HPIV-3	HPIV-4a	HPIV-4b
HPIV-1	84.4 - 97.1	37.2 - 39	46.2 - 47.2	38.1 - 39	36.7- 38.5
HPIV-2	37.2 - 39	93.6 - 100	31.8 - 34	41.4 - 44.1	40 - 43.2
HPIV-3	46.2 - 47.2	31.8 - 34	97.2 - 100	33.6 - 34.9	33.1 - 35.8
HPIV-4a	38.1 - 39	41.4 - 44.1	33.6 - 34.9	97.3 - 100	86 - 88.2
HPIV-4b	36.7 - 38.5	40 - 43.2	33.1 - 35.8	86 - 88.2	96.8 - 100



รูปที่ 20 Phylogenetic analysis แสดงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPIVs โดยเส้นตรงแสดง
ได้ภาพแทนจำนวน nucleotide substitution per site

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

โรคติดเชื้อไวรัสเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยในเด็กวัยแรกเกิดจนถึง 6 ปี และส่วนใหญ่มักพบในเด็กก่อนวัยเรียน บางครั้งเป็นถึงปีละหลายครั้ง โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อไวรัสอาจมีความรุนแรงแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส และภูมิคุ้มกันของเด็กร่วมด้วย ฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส เป็นไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งระบบทางเดินหายใจส่วนบนและระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง โดยสามารถพบการติดเชื้อได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ซึ่งการติดเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัสได้มีการศึกษาทั่วโลก แต่ ในส่วนของประเทศไทยนั้นยังมีการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้น้อยมาก

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทำการศึกษาาระบาดวิทยาเชิงชีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV โดยศึกษาจากตัวอย่างตรวจในระบบทางเดินหายใจ ครอบคลุมประชากรในภาคกลางของประเทศไทย ระยะเวลาที่ทำการศึกษามีเวลา 4 ปีกับข้อมูลของการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV เชิงชีวโมเลกุลทั้งสี่สายพันธุ์ โดยใช้ตัวอย่างที่ทำการศึกษานี้ทั้งสิ้น 650 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างตรวจนี้ ถูกเก็บรวบรวมจากกอร์ดผู้ป่วยเด็กในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลชลบุรี พบการติดเชื้อ HPIVs ประมาณ 4.76 % (31/650) เป็นที่สังเกตได้ว่าความชุกของเชื้อ HPIV ในประเทศไทย มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศอื่น ๆ เช่น ประเทศจีน 3.74% (63) มาเลเซีย 3.38% (15) บราซิล 3.81% (68) สเปน 5.02% (51) โดยการติดเชื้อ HPIV ส่วนใหญ่สามารถพบได้ประมาณ 3 - 30 % ของเด็กในโรงพยาบาลที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปีที่ทำการศึกษา เทคนิคที่ใช้ในการวินิจฉัย การเก็บรวบรวมตัวอย่าง และฤดูกาล (53-55)

เทคนิคที่ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ HPIV มีหลายประเภทด้วยกัน ได้แก่ viral isolation, serologic diagnosis, genomic detection ซึ่งแต่ละวิธีนั้นมีความไวแตกต่างกัน โดยวิธี viral isolation จะให้ผลที่แม่นยำ แต่ผลลัพธ์ที่ได้จะใช้เวลานาน ส่วนวิธีวินิจฉัยทาง serology นั้น ให้ผลที่รวดเร็ว แต่สามารถเกิดผลบวกปลอมได้ นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยในบางส่วนของจีโนมไวรัส จะให้ผลที่ถูกต้อง และรวดเร็ว แต่เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เป็นที่นิยมนักในการตรวจประจำวัน (3)

จากการศึกษาการติดเชื้อไวรัสผู้ป่วยส่วนใหญ่ในประเทศไทยที่มีการติดเชื้อ HPIV -3 พบได้ประมาณ (15/ 31) , HPIV -4 (11/ 31) และ HPIV-1 (5/31) ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับข้อมูลระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV จากประเทศสเปนในปี 2011 (51) ที่พบการระบาดของเชื้อ HPIV-3 สูงที่สุด HPIV-4 มีการติดเชื้อรองลงมา และพบ HPIV-1, HPIV-2 ได้น้อยกว่าตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลระบาดวิทยาประเทศอื่น เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และจีน ที่ทำการศึกษาในปี 2006, 2011 และ 2012 (4, 16, 52) พบการระบาดของ HPIV สายพันธุ์ที่ 3 สูงที่สุด รองลงมา คือ HPIV สายพันธุ์ที่ 1 และพบการติดเชื้อ HPIV สายพันธุ์ที่ 4 และ 2 ได้น้อยกว่าตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอัตราการระบาดของเชื้อ HPIV -4 สูงกว่า HPIV -1 อาจเป็นเพราะการระบาดของเชื้อ HPIV -4 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและการศึกษาอัตราการระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV -4 นี้ ยังแตกต่างกันมากในกลุ่มที่ทำการศึกษา (58-61) แต่สามารถอธิบายได้ว่าวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกันอาจให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคที่ใช้ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ HPIV และเทคนิค Antigen Detection สามารถให้ผลที่แน่นอนกว่า (58) สำหรับเชื้อ HPIV-2 ที่ไม่พบในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อวิเคราะห์ถึงอัตราการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ พบว่า HPIV-2 มีอัตราการระบาดที่ต่ำมาก จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศ จีน (63) มาเลเซีย (15) บราซิล (68) และสเปน (51) พบอัตราการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ประมาณ 0.2 - 0.8% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

อัตราการระบาดของเชื้อ HPIV ยังคงคล้ายกับการระบาดของไวรัสในระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ ในประเทศไทยพบการติดเชื้อของ HPIV อยู่ในระดับต่ำตลอดทั้งปี (62) ทั้งนี้แนวโน้มของการติดเชื้อ HPIV ตามฤดูกาลในประเทศไทยก็คล้ายคลึงกับประเทศจีน (63) และยังมีความสัมพันธ์กับข้อมูลการติดเชื้อในประเทศต่าง ๆ ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยประเทศสิงคโปร์พบการติดเชื้อตามฤดูกาลสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ไปจนถึงเดือนพฤษภาคม (64) และการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยพบการติดเชื้อตามฤดูกาลสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ ไปจนถึงเดือนมีนาคม (65) ในสหรัฐอเมริกาพบการติดเชื้อของ HPIV -3 เกิดขึ้นเป็นประจำทุกปี ในระหว่างเมษายนถึงมิถุนายน (52) ในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาพบว่าในภาคกลางของประเทศไทยส่วนใหญ่ พบการติดเชื้อ HPIV -3 ได้ตลอดทั้งปีและ HPIV -4 พบการติดเชื้อได้ในระหว่างช่วงปลายฤดูฝนและต้นฤดูหนาว สำหรับ HPIV -2 นั้นมีการระบาดสลับกับ HPIV -1 เป็นประจำทุกปี (14, 53, 57) สำหรับข้อมูลดังกล่าวข้างต้น การศึกษา

ระบาดวิทยาของเชื้อ HPIV ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน อาจนำไปสู่การกระจายของเชื้อตามฤดูกาลที่แตกต่างกัน ของ HPIV (63)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ HPIV เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ซึ่งส่วนใหญ่พบได้ในเด็กเล็ก และพบการติดเชื้อได้บ่อยในช่วง 13-24 เดือน เพราะระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการติดเชื้อ HPIV สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดชีวิต (3) การติดเชื้อ HPIVs สามารถพบได้ในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ (63) ส่วนใหญ่ของการติดเชื้อเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่อายุต่ำกว่า 5 ปี (63) นอกจากนี้การติดเชื้อ HPIV ยังแตกต่างกันในแต่ละช่วงของอายุ โดย HPIV -1 สามารถตรวจพบในผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 3 ปี ในขณะที่ HPIV -3 แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPIV -1 (ตารางที่ 10) ในเด็กทารกที่มีอายุต่ำกว่าหนึ่งเดือน ไม่พบการติดเชื้อ HPIV ซึ่งผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าทารกแรกเกิดมีระดับของแอนติบอดีจากแม่ในปริมาณที่สูง และระดับแอนติบอดีเหล่านี้จะลดลงอย่างมากในช่วง 7-12 เดือน (3)

เมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อร่วมของ HPIV กับไวรัสอื่น ๆ ในระบบทางเดินหายใจ จากการศึกษาของ Henrickson, 2003 (3) และ Drews et al., 1997 (69) พบว่า การติดเชื้อร่วมของ HPIV กับไวรัสอื่น ๆ ในระบบทางเดินหายใจนั้นสามารถพบได้ทั่วไป (3, 69) และจะพบในเด็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี (63) การติดเชื้อร่วมของ HPIV กับไวรัสอื่น ๆ ในระบบทางเดินหายใจนั้น พบว่า ในประเทศจีน RSV, MPV, EV และ HCoV-OC43 เป็นไวรัสที่สามารถพบได้บ่อยในการติดเชื้อร่วมกับ HPIV แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (63) สำหรับการศึกษาการติดเชื้อร่วมของ HPIV กับไวรัสอื่น ๆ ที่พบ คือ HRV, RSV และ MPV การติดเชื้อร่วมของเชื้อ HPIV กับไวรัสในระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ นั้น แสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันของเด็กยังไม่สามารถพัฒนาได้เต็มที่นัก การติดเชื้อร่วมของเชื้อ HPIV กับไวรัสในระบบทางเดินหายใจอื่น ๆ นั้นอาจเกิดขึ้นได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ HPIV ด้วยการพิจารณาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HN ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน HN พบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HPIV มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคล้ายกับ HPIV strain อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล ซึ่งผลการวิเคราะห์ค่า % sequence identity matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ strain อื่นๆ ในสาย

พันธุเดียวกันของ HPIV นั้น มีค่าตั้งแต่ 84.4-100% แสดงให้เห็นว่า มีความหลากหลายน้อยในสาย พันธุ์ของเชื้อฮิวแมนพาราอินฟลูเอนซาไวรัส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณยีน HN นั้นมีความ conserved สูง จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ HPIV-1 และ HPIV-3 สามารถ อธิบายได้ว่าลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน เป็นตัวกำหนดเชื้อสายทางพันธุกรรมที่ได้รับสืบ ทอดต่อกันมา (66, 67) ดังแสดงใน phylogenetic tree พบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย มีการแตกกิ่งเป็นสาขาที่ไม่ซ้ำกัน ผลการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงภายในยีน HN ของ HPIV -3 มีความสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ของสายพันธุ์ (4) ส่วนสายพันธุ์ของ HPIV -4 เทียบกับประเทศอื่นๆ ในปีที่ผ่านมา ได้รับการจัดกลุ่มในสายตระกูลเดียวกัน

แม้ว่าการติดเชื้อ HPIV ในภาคกลางของประเทศไทย ในระหว่างช่วงเวลาที่ทำการศึกษา มี อัตราการระบาดที่ต่ำ แต่เป็นภาระทางการเงินของระบบการดูแลสุขภาพของประเทศ นอกจากนี้ ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับข้อมูลการเฝ้าระวังและ ป้องกันการแพร่ระบาดของโรคนี้ ในอนาคต

รายการอ้างอิง

1. Zambon M, Bull T, Sadler CJ, Goldman JM, Ward KN. Molecular epidemiology of two consecutive outbreaks of parainfluenza 3 in a bone marrow transplant unit. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(8):2289-93.
2. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Reviews of infectious diseases*. 1991;13 Suppl 6:S454-62.
3. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(2):242-64.
4. Mao N, Ji Y, Xie Z, Wang H, Wang H, An J, et al. Human parainfluenza virus-associated respiratory tract infection among children and genetic analysis of HPIV-3 strains in Beijing, China. *PloS one*. 2012;7(8):e43893.
5. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *The New England journal of medicine*. 2001;344(25):1917-28.
6. Burke CW, Bridges O, Brown S, Rahija R, Russell CJ. Mode of parainfluenza virus transmission determines the dynamics of primary infection and protection from reinfection. *PLoS pathogens*. 2013;9(11):e1003786.
7. Vilchez R, McCurry K, Dauber J, Iacono A, Keenan R, Griffith B, et al. Influenza and parainfluenza respiratory viral infection requiring admission in adult lung transplant recipients. *Transplantation*. 2002;73(7):1075-8.
8. Vilchez RA, McCurry K, Dauber J, Iacono A, Keenan R, Zeevi A, et al. The epidemiology of parainfluenza virus infection in lung transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;33(12):2004-8.
9. Fairchok MP, Martin ET, Kuypers J, Englund JA. A prospective study of parainfluenza virus type 4 infections in children attending daycare. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(8):714-6.
10. Lau SK, Li KS, Chau KY, So LY, Lee RA, Lau YL, et al. Clinical and molecular epidemiology of human parainfluenza virus 4 infections in hong kong: subtype 4B as common as subtype 4A. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(5):1549-52.

11. Lau SK, To WK, Tse PW, Chan AK, Woo PC, Tsoi HW, et al. Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(9):4515-21.
12. Klippmark E, Rydbeck R, Shibuta H, Norrby E. Antigenic variation of human and bovine parainfluenza virus type 3 strains. *The Journal of general virology*. 1990;71 (Pt 7):1577-80.
13. Palermo LM, Porotto M, Yokoyama CC, Palmer SG, Mungall BA, Greengard O, et al. Human parainfluenza virus infection of the airway epithelium: viral hemagglutinin-neuraminidase regulates fusion protein activation and modulates infectivity. *Journal of virology*. 2009;83(13):6900-8.
14. van Wyke Coelingh KL, Winter CC, Jorgensen ED, Murphy BR. Antigenic and structural properties of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3: sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies which inhibit infectivity, hemagglutination, and neuraminidase activities. *Journal of virology*. 1987;61(5):1473-7.
15. Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF, Chan YF. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC pediatrics*. 2012;12:32.
16. Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, et al. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology journal*. 2011;8:533.
17. Villaran MV, Garcia J, Gomez J, Arango AE, Gonzales M, Chicaiza W, et al. Human parainfluenza virus in patients with influenza-like illness from Central and South America during 2006-2010. *Influenza and other respiratory viruses*. 2013.
18. Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Xiong Z, Liu C, Xiang Z, et al. Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: a comparison study. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;51(3):209-12.

19. Vachon ML, Dionne N, Leblanc E, Moisan D, Bergeron MG, Boivin G. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(11):1755-8.
20. Madhi SA, Schoub B, Simmank K, Blackburn N, Klugman KP. Increased burden of respiratory viral associated severe lower respiratory tract infections in children infected with human immunodeficiency virus type-1. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(1):78-84.
21. Vainionpaa R, Hyypia T. Biology of parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1994;7(2):265-75.
22. McIntosh K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in the developing world: respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. *Rev Infect Dis*. 1991;13 Suppl 6:S492-500.
23. van Wyke Coelingh KL, Winter CC, Tierney EL, Hall SL, London WT, Kim HW, et al. Antibody responses of humans and nonhuman primates to individual antigenic sites of the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins after primary infection or reinfection with parainfluenza type 3 virus. *J Virol*. 1990;64(8):3833-43.
24. Welliver R, Wong DT, Choi TS, Ogra PL. Natural history of parainfluenza virus infection in childhood. *J Pediatr*. 1982;101(2):180-7.
25. Couch RB, Englund JA, Whimbey E. Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am J Med*. 1997;102(3A):2-9; discussion 25-6.
26. Dorman SE, Uzel G, Roesler J, Bradley JS, Bastian J, Billman G, et al. Viral infections in interferon-gamma receptor deficiency. *J Pediatr*. 1999;135(5):640-3.
27. Frank JA, Jr., Warren RW, Tucker JA, Zeller J, Wilfert CM. Disseminated parainfluenza infection in a child with severe combined immunodeficiency. *Am J Dis Child*. 1983;137(12):1172-4.
28. Wendt CH, Weisdorf DJ, Jordan MC, Balfour HH, Jr., Hertz MI. Parainfluenza virus respiratory infection after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1992;326(14):921-6.
29. Hall CB. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the "Cold War" has not ended. *Clin Infect Dis*. 2000;31(2):590-6.

30. Karron RA, O'Brien KL, Froehlich JL, Brown VA. Molecular epidemiology of a parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1441-5.
31. Mufson MA, Levine HD, Wasil RE, Mocega-Gonzalez HE, Krause HE. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among infants and children in Chicago. *Am J Epidemiol.* 1973;98(2):88-95.
32. Nichols WG, Erdman DD, Han A, Zukerman C, Corey L, Boeckh M. Prolonged outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in a stem cell transplant outpatient department: insights from molecular epidemiologic analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(1):58-64.
33. Ebbert JO, Limper AH. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration.* 2005;72(3):263-9.
34. Konovalova NG, Blyumkin VN, Zakstelskaya LY. Action of parainfluenza viruses on the mitotic activity of primary trypsinized human embryo kidney cell cultures. *Acta virologica.* 1967;11(6):564.
35. Kasel JA, Frank AL, Keitel WA, Taber LH, Glezen WP. Acquisition of serum antibodies to specific viral glycoproteins of parainfluenza virus 3 in children. *J Virol.* 1984;52(3):828-32.
36. Spriggs MK, Murphy BR, Prince GA, Olmsted RA, Collins PL. Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to host immunity. *J Virol.* 1987;61(11):3416-23.
37. Julkunen I, Hovi T, Seppala I, Makela O. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. *Clinical and experimental immunology.* 1985;60(1):130-8.
38. van der Logt JT, van Loon AM, van der Veen J. Detection of parainfluenza IgM antibody by hemadsorption immunosorbent technique. *Journal of medical virology.* 1982;10(3):213-21.

39. Hruskova J, Fedova D, Syrucek L, Penningerova S, Holanova L, Berkovicova V. Haemagglutination inhibition antibodies in nasal secretions of persons after natural parainfluenza virus infection. *Acta virologica*. 1978;22(3):203-8.
40. Smith CE. Immunological responses in virus infections. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1969;62(3):292-4.
41. Yanagihara R, McIntosh K. Secretory immunological response in infants and children to parainfluenza virus types 1 and 2. *Infect Immun*. 1980;30(1):23-8.
42. Tremonti LP, Lin JS, Jackson GG. Neutralizing activity in nasal secretions and serum in resistance of volunteers to parainfluenza virus type 2. *J Immunol*. 1968;101(3):572-7.
43. Henderson FW. Pulmonary cell-mediated cytotoxicity in hamsters with parainfluenza virus type 3 pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1979;120(1):41-7.
44. Hogan RJ, Usherwood EJ, Zhong W, Roberts AA, Dutton RW, Harmsen AG, et al. Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol*. 2001;166(3):1813-22.
45. Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrancois L, Farber DL. Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J Immunol*. 2011;187(11):5510-4.
46. Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *American journal of epidemiology*. 1969;89(4):435-48.
47. Schmidt AC, McAuliffe JM, Murphy BR, Collins PL. Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *Journal of virology*. 2001;75(10):4594-603.
48. Haller AA, Miller T, Mitiku M, Coelingh K. Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector. *Journal of virology*. 2000;74(24):11626-35.

49. Alexander ME, Bowman CS, Feng Z, Gardam M, Moghadas SM, Rost G, et al. Emergence of drug resistance: implications for antiviral control of pandemic influenza. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2007;274(1619):1675-84.
50. White LA, Freeman CY, Forrester BD, Chappell WA. In vitro effect of ascorbic acid on infectivity of herpesviruses and paramyxoviruses. *Journal of clinical microbiology*. 1986;24(4):527-31.
51. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Ambrona P, Rico M, Pozo F, Del Mar Molinero M, et al. The burden of infections by parainfluenza virus in hospitalized children in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(9):792-4.
52. Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;43(8):1016-22.
53. Downham MA. Clinical significance of parainfluenza virus infections in children. *Archives of disease in childhood*. 1973;48(10):824.
54. Noh JY, Song JY, Cheong HJ, Choi WS, Lee J, Lee JS, et al. Laboratory surveillance of influenza-like illness in seven teaching hospitals, South Korea: 2011-2012 season. *PloS one*. 2013;8(5):e64295.
55. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza a and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(4):1564-9.
56. Denny FW, Clyde WA, Jr. Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children. *The Journal of pediatrics*. 1986;108(5 Pt 1):635-46.
57. Murphy B, Phelan PD, Jack I, Uren E. Seasonal pattern in childhood viral lower respiratory tract infections in Melbourne. *The Medical journal of Australia*. 1980;1(1):22-4.
58. Billaud G, Morfin F, Vabret A, Boucher A, Gillet Y, Crassard N, et al. Human parainfluenza virus type 4 infections: a report of 20 cases from 1998 to 2002. *Journal*

- of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2005;34(1):48-51.
59. Laurichesse H, Dedman D, Watson JM, Zambon MC. Epidemiological features of parainfluenza virus infections: laboratory surveillance in England and Wales, 1975-1997. *European journal of epidemiology*. 1999;15(5):475-84.
60. Monto AS. The Tecumseh study of respiratory illness. V. Patterns of infection with the parainfluenzaviruses. *American journal of epidemiology*. 1973;97(5):338-48.
61. Rubin EE, Quennec P, McDonald JC. Infections due to parainfluenza virus type 4 in children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1993;17(6):998-1002.
62. Olsen SJ, Thamthitiwat S, Chantra S, Chittaganpitch M, Fry AM, Simmerman JM, et al. Incidence of respiratory pathogens in persons hospitalized with pneumonia in two provinces in Thailand. *Epidemiology and infection*. 2010;138(12):1811-22.
63. Liu WK, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB, et al. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC infectious diseases*. 2013;13:28.
64. Chew FT, Doraisingham S, Ling AE, Kumarasinghe G, Lee BW. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiology and infection*. 1998;121(1):121-8.
65. Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Watthana-kasetr S, Sirinavin S, Ruangchanasetr S, Hotrakitya S, et al. A study of nonbacterial agents of acute lower respiratory tract infection in Thai children. *Reviews of infectious diseases*. 1990;12 Suppl 8:S923-8.
66. Henrickson KJ, Savatski LL. Genetic variation and evolution of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin neuraminidase: analysis of 12 clinical isolates. *The Journal of infectious diseases*. 1992;166(5):995-1005.
67. Hetherington SV, Watson AS, Scroggs RA, Portner A. Human parainfluenza virus type 1 evolution combines cocirculation of strains and development of geographically restricted lineages. *The Journal of infectious diseases*. 1994;169(2):248-52.

68. Fe MM, Monteiro AJ, Moura FE. Parainfluenza virus infections in a tropical city: clinical and epidemiological aspects. *The Brazilian journal of infectious diseases* : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2008;12(3):192-7.
69. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1997;25(6):1421-9.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. 5X Tris Borate Buffer (5x TBE)

- Tris base 54 g
- Boric acid 27.5 g
- EDTA (pH8.0) 20 ml

จากนั้นเติม Distilled water ปริมาตร 1000 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Dep C water

- Dep C 0.1 ml
- Distilled water 100 ml

เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมงแล้วนำไป autoclave

3. Reverse Transcription Mixture

- Improm II buffer 4.0 μ l
- Improm II RT 1.0 μ l
- 10 μ M dNTP 2.5 μ l
- Rnase Inhibitor 1.0 μ l

4. LB agar

- Agar 1.5 g
- Peptone 1 g
- Yeast 0.5 g
- NaCl 0.5 g

จากนั้นเติม Distilled water ปริมาตร 100 ml นำไป autoclave แล้วใส่

Ampicilin (10mg/ml) ปริมาตร 10 μ l

5. LB Broth

- Peptone 1 g
- Yeast 0.5 g
- NaCl 0.5 g

จากนั้นเติม Distilled water ปริมาตร 100 ml นำไป autoclave แล้วใส่

Ampicilin (10mg/ml) ปริมาตร 10 μ l

6. Ampicilin

- Ampicilin 0.01g/100ml

7. SOC media

- Tryptone 2.0 g
- Yeast 0.5 g
- 1M NaCl 1 ml
- 1M KCL 0.25 ml

จากนั้นเติม Distilled water ปริมาตร 100 ml นำไป autoclave แล้วใส่ 2M

Mg²⁺ ปริมาตร 1ml และ 2 M glucose ปริมาตร 1ml

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ - นามสกุล นางสาวหทัยพันธ์ รวมพรรณพงศ์

วัน/เดือน/ปีเกิด 31 มกราคม 2533

สถานที่เกิด จังหวัดภูเก็ต

E-mail Address hathaiphan@live.com

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาจากคณะสหเวชศาสตร์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2554

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2555

การตีพิมพ์ผลงานวิจัย

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : HUMAN PARAINFLUENZA VIRUS INFECTION IN THAI CHILDREN WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION, 2010-2013 เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY