


ลักษณะโมเลกุลของฮิวแมนเมตานิโม่ไวรัสในยีนส่วนนิวคลีโอโปรตีน,
พีวชัน และโพลีเมอเรสในผู้ป่วยเด็กประเทศไทย



นางสาววนิดา ชนสุกาญจน์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4111-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NUCLEOPROTEIN GENE,
FUSION GENE AND POLYMERASE GENE OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS
IN THAI PEDIATRIC PATIENTS**



Miss Wanida Thanasugarn

**สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science**

**Faculty of Medicine
Chulalongkorn University**

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4111-1

วนิดา ชนสุกาญจน์ : ลักษณะโมเลกุลของฮิวแมนเมตานิ่วไวรัสในชิ้นส่วนนิวคลีโอโปรตีน, ฟีวชั่น และโพลีเมอร์สในผู้ป่วยเด็กประเทศไทย. (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NUCLEOPROTEIN GENE, FUSION GENE AND POLYMERASE GENE OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS IN THAI PEDIATRIC PATIENTS) อ. ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรรณ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์รุจิภัตต์ สำราญสำรวจกิจ, 153 หน้า. ISBN 974-17-4111-1

บทนำ : การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉับพลันเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในเด็กทั่วโลก สาเหตุที่สำคัญของการเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉับพลันในเด็กมักเกิดจากไวรัส ซึ่งแบ่งออกได้หลายชนิดและมีช่วงการระบาดที่ต่างกัน ในปี พ.ศ. 2544 นักวิทยาศาสตร์จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (van den Hoogen และคณะ) ได้ค้นพบไวรัสในแฟมิลี *Paramyxoviridae* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่ไม่เป็นที่รู้จักมาก่อน คือ human Metapneumovirus (hMPV) การเรียงตัวของจีโนมและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV นั้นเหมือนกับ avian pneumovirus serotype C มากที่สุด การศึกษาด้าน seroprevalence ในประเทศเนเธอร์แลนด์พบว่าเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปีจะมีแอนติบอดีต่อ hMPV แล้วทุกราย แสดงว่าการติดเชื้อ hMPV นั้นจะเกิดขึ้นในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี นอกจากนั้นการติดเชื้อ hMPV เกิดซ้ำได้และสามารถพบการติดเชื้อได้ตลอดชีวิต จากการศึกษาในหลายประเทศพบว่าอาการของการติดเชื้อ hMPV นั้นคล้ายกับอาการของการติดเชื้อ human Respiratory syncytial virus (hRSV) คือ ไข้, ไอ และหายใจลำบาก และ hMPV ยังมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจบนและส่วนล่าง ผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV มักได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นหลอดลมฝอยอักเสบและปอดอักเสบ สามารถพบการติดเชื้อ hMPV ร่วมกับ hRSV นอกจากนี้การศึกษานานหลายประเทศให้ผลตรงกันว่า hMPV สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์อีกด้วย

วัตถุประสงค์ : การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการติดเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ รวมทั้งศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อ hMPV และความสำคัญทางคลินิกในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reactin (RT-PCR) ของชิ้นส่วนนิวคลีโอโปรตีน (N), ฟีวชั่น (F) และโพลีเมอร์ส (L) ในการยืนยันผลบวกจะใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) เพื่อเปรียบเทียบความใกล้เคียงของสารพันธุกรรมที่ได้กับสิ่งมีชีวิตอื่น และทำการศึกษายาพันธุ์ของ hMPV โดยใช้โปรแกรม PHYLIP 95

ผลการทดลอง : พบอุบัติการณ์การติดเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยเด็กโดยวิธี RT-PCR ในชิ้นส่วน N, F และ L เท่ากับ 5.3% (12/227 คน) โดยมีค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อเท่ากับ 20 เดือน, ค่ามัธยฐานของอายุเท่ากับ 17 เดือน อาการส่วนใหญ่ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV คือ ไข้ (100%), ไอ (100%) และหายใจลำบาก (91.7%) ผู้ป่วยเด็กทุกรายได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นปอดอักเสบ โดยที่ 92% (11/12 คน) ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ผู้ป่วย 1 รายพบการติดเชื้อร่วมกับ hRSV การศึกษาด้วยสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ และสามารถพบการติดเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ในปีเดียวกัน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการศึกษานี้ได้ลงทะเบียนเข้าสู่ธนาคารรหัสพันธุกรรมโดยมีหมายเลขดังนี้ AY152463-AY158465 และ AY550148-AY550175

วิจารณ์ผลการทดลอง : ในการศึกษาการติดเชื้อ hMPV ในครั้งนี้พบอุบัติการณ์การติดเชื้อ hMPV เท่ากับ 5.3% อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์ของการติดเชื้ออาจมากกว่า 5.3% เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาในผู้ที่ไม่มีอาการและผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และการพบการติดเชื้อร่วมกับ hRSV นั้นแสดงถึงช่วงการระบาดของ hMPV นั้นเป็นช่วงเดียวกับช่วงการระบาดเดียวกับ hRSV

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4475262030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD : ACUTE RESPIRATORY TRACT INFECTION / UPPER RESPIRATORY TRACT INFECTION / LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION / HUMAN METAPNEUMOVIRUS

WANIDA THANASUGARN : THESIS TITLE. (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NUCLEOPROTEIN GENE, FUSION GENE AND POLYMERASE GENE OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS IN THAI PEDIATRIC PATIENTS) THESIS ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, MD., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. RUJIPAT SAMRANSAMRUAJKIT, MD., 153 PP. ISBN 974-17-4111-1

Background : Acute respiratory tract infections (ARTIs) account for significant morbidity and mortality in infants and children worldwide. The majority of causation agents are viruses. In 2001, van den Hoogen, *et al.* discovered a new paramyxovirus, human Metapneumovirus (hMPV), found associated with severe respiratory illness in pediatric patients. hMPV displayed a high percentage of nucleotide sequences homology and genomic organization similar to avian pneumovirus serotype C. Serological surveys in the Netherlands showed that children over 5 years were seropositive and reinfection throughout life may be common. The clinical features associated with hMPV infections in children were similar to human Respiratory syncytial virus (hRSV). It was associated with both upper and lower respiratory tract infections. The most significant clinical features were acute bronchiolitis and pneumonia. Fever, cough and difficulty of breathing were frequently observed in infected children. Coinfection with other respiratory viruses can also occur, especially with hRSV. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences can be used to separate hMPV into 2 lineages.

Objective : This study was designed to investigate the incidence of hMPV in nasopharyngeal suction specimens of infant and young children who clinically presented with ARTIs. hMPV detection was performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) located on nucleocapsid (N), fusion (F) and polymerase (L) genes.

Materials and methods : Two hundred and twenty-seven nasopharyngeal suction specimens were collected from pediatric patients with clinical symptoms of ARTIs admitted to Chulalongkorn hospital, Bangkok, Thailand. To ensure the positive results, positive specimens underwent DNA sequencing and were later confirmed by the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Phylogenetic analysis for hMPV N, F and L genes were performed by PHYLIP95 program.

Results : In this study, the incidence of hMPV infection was 5.3% (12/227). The mean age of children with hMPV infections was 20 months and median age was 17 months. Clinical presentations associated with hMPV infections were fever (100%), cough (100%) and difficulty of breathing (91.7%). Ninety-two percent of hMPV infected children were hospitalized and all children had pneumonia. Coinfection with hRSV was found in 1 patient. Phylogenetic analysis was used to identify 2 lineages of hMPV and cocirculation of both lineages during the same years. In addition, the sequences were submitted to GenBank under accession Nos. AY158463-AY158465 and AY550148-AY550175

Conclusion : The results showed the incidence of hMPV at 5.3%. However, the incidence in Thailand might be higher than that, as hMPV infection could remain asymptomatic in children yet cause ARTIs in adults. Coinfection with hRSV found in 1 patient, indicated that hMPV shares seasonal distribution with hRSV.

Field of study	Medical science	Student's signature.....
Academic year	2003	Advisor's signature.....
		Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียงพอ และที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์รุจิจิตต์ สํารณสารวจกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้, คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณว่าที่ร้อยตรี อ. ดร.เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลาให้ความรู้ในด้าน Bioinformatics

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษหน่วยวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ, ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณกุมารแพทย์เฉพาะทางระบบทางเดินหายใจในเด็กที่กรุณาช่วยเก็บส่งตรวจสำหรับการทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ, ให้คำแนะนำ ตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณโครงการเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว และนายกมล กิตตินันทกุล เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท, ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
- การแบ่งชนิดของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน.....	3
- สาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน.....	3
- ปัจจัยเสี่ยงและความรุนแรงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันในเด็ก.....	4
- ช่วงการระบาดของไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน.....	5
- การแพร่กระจายของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน.....	6
- การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันในโรงพยาบาล.....	6
- การรักษา.....	7
- การป้องกัน.....	7
- การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ.....	7
- การค้นพบไวรัสชนิดใหม่.....	10
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	11
- ข้อตกลงเบื้องต้น.....	11
- กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	12
- ข้อจำกัดของการวิจัย.....	13
- คำสำคัญ.....	13
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	13
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	15
- การค้นพบ hMPV.....	15
- อัตราการพบการติดเชื้อ hMPV ในประเทศต่างๆ.....	20
- ช่วงการระบาดของ hMPV.....	22
- การติดเชื้อ hMPV ร่วมกับเชื้ออื่น.....	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
- อาการและอาการแสดงของผู้ติดเชื้อ hMPV.....	24
- hMPV กับการมีโรคประจำตัวและผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน.....	25
- การติดเชื้อ hMPV ซ้ำ.....	26
- การติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจเข้าสู่ออนในโรงพยาบาล.....	26
- การศึกษาในด้าน seroprevalence.....	27
- การรักษา.....	27
- การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ.....	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
- รูปแบบการวิจัย.....	31
- ประชากรศึกษา.....	31
- การเก็บตัวอย่าง.....	31
- เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	32
- สารเคมีที่ใช้.....	34
- วิธีการดำเนินการวิจัย.....	35
- การวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	48
- ผลจากการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในส่วน N gene.....	49
- ผลของการเพิ่มจำนวน internal control.....	50
- ผลของการเพิ่มจำนวน hMPV RNA ในส่วน F gene.....	51
- ผลของการเพิ่มจำนวน hMPV RNA ในส่วน L gene.....	52
- ช่วงอายุและเพศของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ.....	54
- ช่วงการระบาดของ hMPV.....	56
- การติดเชื้อร่วมกับ hRSV.....	58
- อาการและอาการแสดงของผู้ป่วย hMPV.....	58
- ผลของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV.....	60
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	92
รายการอ้างอิง.....	103
ภาคผนวก ก.....	110
ภาคผนวก ข.....	111

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค.....	112
ภาคผนวก ง.....	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	153



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ.....	4
2	แสดงอัตราการตรวจพบ hMPV ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในประเทศ ต่างๆ.....	23
3	แสดงผลการทำ phylogenetic analysis ในประเทศต่างๆ.....	28
4	แสดงตำแหน่งและความยาวของ β -actin ในแต่ละ exon.....	37
5	แสดงส่วนผสมที่ใช้ในการทำ cDNA synthesis ของ hMPV N gene และ β -actin gene....	38
6	แสดงรายละเอียดของ primers แต่ละเส้น.....	39
7	แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ hMPV ในส่วน N gene และ β -actin gene.....	40
8	แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR ของ hMPV ในส่วน N gene และ β -actin.....	40
9	แสดงส่วนผสมที่ใช้ในการทำ cDNA synthesis ของ hMPV F gene, hMPV L gene และ β -actin gene.....	41
10	แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ hMPV ในส่วน F gene และ L gene	42
11	แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR ของ hMPV ในส่วน F gene และ L gene.....	43
12	แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing.....	43
13	แสดงผลสรุปของผู้ป่วยแต่ละรายที่ให้ผลบวกกับ hMPV ในส่วน N, F และ L gene.....	53
14	แสดงรายละเอียดของช่วงอายุและเพศที่ติดเชื้อ hMPV ในแต่ละปี.....	55
15	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดิน หายใจทั้งหมดในแต่ละปี.....	57
16	แสดงรายละเอียดของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV RNA.....	59
17	แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้.....	64
18	แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-C.....	67
19	แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้.....	76
20	แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-C.....	79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
21	แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน L gene ได้จากการศึกษาในครั้งนี้.....	86
22	แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-A.....	89
23	แสดงการแปลงนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวเป็นกรดอะมิโน 1 ตัว.....	117



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย.....13
2	แสดงรูปร่างของ hMPV เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....15
3	แสดงรูปร่างของไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี <i>Paramyxoviridae</i>16
4	แสดงการเรียง genome ของ hMPV.....17
5	แสดงการเข้าสู่เซลล์ของ host ของ hMPV.....19
6	แสดงการค้นพบ hMPV.....21
7	แสดง mucus extractor ที่ใช้ในการเก็บน้ำโพรงจมูก.....32
8	แสดงขั้นตอนการตกตะกอนผลผลิตที่ได้จากการเข้า cycle sequencing.....44
9	แสดงขั้นตอนการดำเนินการทดลอง.....45
10	แสดงการกระจายของอายุของผู้ป่วยที่เก็บน้ำล้างโพรงจมูกทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 22 มีนาคม พ.ศ. 2544 ถึงวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2546.....48
11	แสดงผลผลิตขนาด 259 bp จากการทำ nested-PCR ของ hMPV ในส่วน N gene.....49
12	แสดงผลผลิตขนาด 606 bp จากการทำ RT-PCR ของ β -actin gene.....50
13	แสดงผลผลิตขนาด 450 bp จากการทำ nested-PCR ของ hMPV ในส่วน F gene.....51
14	แสดงผลผลิตขนาด 171 bp จากการทำ nested-PCR ของ hMPV ในส่วน L gene.....52
15	แสดงการกระจายของอายุผู้ป่วยให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV.....54
16	แสดงช่วงเวลาการระบาดของ hMPV ที่เกิดขึ้นในการศึกษาครั้งนี้.....56
17	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....61
18	แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 เฉพาะในส่วน N gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้.....63
19	แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ในส่วน N gene เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....66
20	แสดงลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง.....69
21	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....72
22	แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 เฉพาะในส่วน F gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้.....75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23	แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....78
24	แสดงลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง.....81
25	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....84
26	แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 เฉพาะในส่วน L gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้.....85
27	แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....88
28	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง.....90

คำย่อ

คำย่อ

ความหมาย

ARTI	Acute respiratory tract infection
β -actin	Beta actin
bp	Base pair
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide
ELISA	Enzyme-link immunosorbant
F	Fusion
G	Attachment glycoprotein
hMPV	Human metapneumovirus
hRSV	Human respiratory syncytial virus
L	Polymerase
LRTI	Lewer respiratory tract infection
M	Matrix
N	Nucleoprotein
P	Phosphoprotein
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	Picomol
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolution per minute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SH	Small hydrophobic
T _m	Annealing temperature
μ l	Microlitter
URTI	Upper respiratory tract infection

บทที่ 1

บทนำ

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน (Acute respiratory tract infections; ARTIs) เป็นโรคติดเชื้อที่พบบ่อยที่สุดในเด็กทั่วโลก เป็นสาเหตุของการมาใช้บริการสาธารณสุขมากที่สุด⁽¹⁾ ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากการเสียค่าใช้จ่ายกับผู้ป่วยโรคนี้เป็นจำนวนมาก เกิดการขาดงานและขาดเรียน และยังก่อให้เกิดอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตมากที่สุดในเด็กทั่วโลกอีกด้วย⁽²⁻⁶⁾ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันพบในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปีมากถึง 50%⁽⁷⁾ และยังเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตเป็นอันดับสองในช่วงอายุนี้⁽⁸⁾ เด็กที่อายุน้อยกว่า 5 ปีพบอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันมากถึง 4 ล้านคนต่อปีทั่วโลก และ 90% ที่เสียชีวิตเป็นเด็กที่อยู่ในประเทศกำลังพัฒนา⁽⁹⁾ อัตราการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันในประเทศพัฒนาแล้วหรือประเทศกำลังพัฒนาจะสูงเท่าๆกัน แต่ในประเทศกำลังพัฒนาจะพบอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว 20-50 เท่า โดยเฉพาะในเด็กที่อายุต่ำกว่า 1 ขวบ ในประเทศกำลังพัฒนาจะพบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันสูง^(2, 5, 10) ในประเทศไทยพบว่า การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันนั้นเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 1 ขวบถึง 25%⁽¹¹⁾ พบว่าเพศชายจะมีอัตราการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมากกว่าเพศหญิง⁽¹⁾

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันพบได้ในทุกช่วงอายุ ในเด็กจะพบการติดเชื้อ 6-8 ครั้งต่อปี⁽¹⁻²⁾ และในผู้ใหญ่จะพบ 2-4 ครั้งต่อปี⁽¹⁾ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในผู้สูงอายุก็เป็นปัญหาสำคัญเช่นกัน เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของผู้สูงอายุจะมีประสิทธิภาพลดลง เพราะฉะนั้นจึงเกิดการติดเชื้อที่ง่ายขึ้น ผู้ป่วยด้วยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันที่มีอายุมากกว่า 55 ปีจะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตมากขึ้นตามอายุ⁽⁵⁾

ปอดอักเสบ (pneumonia) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตในเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมากถึง 75%^(2, 7, 12) รองลงมา คือ หลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) และ Laryngo-Tracheo Bronchitis (Croup) เด็กที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดปอดอักเสบเมื่อเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ คือ ทารกที่มีน้ำหนักตัวน้อย, เด็กขาดสารอาหาร, และเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี⁽²⁾ หากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเด็กมีความรุนแรงมากทำให้ปอดเกิดความเสียหาย และส่งผลถึงการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของเด็ก⁽¹³⁾ นอกจากนั้นการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันอาจทำให้เกิดความผิดปกติเรื้อรังตามมา เช่น หลอดลมอักเสบเรื้อรัง และหลอดลมโป่งพองเรื้อรัง⁽⁶⁾

ในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉับพลันมีการพยากรณ์ของโรค (prognosis) ที่แยกว่าผู้ใหญ่ เนื่องจาก

1. เด็กมีปริมาตรทรวงอกน้อยกว่าผู้ใหญ่และมีท่อทางเดินหายใจที่สั้นและแคบกว่าผู้ใหญ่ ในทารกแรกเกิดจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางท่อทางเดินหายใจ 3.5 มิลลิเมตรแล้วยังมีความยาวเพียง 4 เซนติเมตร ขณะที่ผู้ใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางท่อทางเดินหายใจ 10-14 มิลลิเมตร และยาว 13 เซนติเมตร ทางเดินหายใจของเด็กที่แคบและสั้นนี้จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของปอดและปฏิกิริยาตอบสนองของทางเดินหายใจขณะที่มีการติดเชื้อ เพราะการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจะทำให้เยื่อบุทางเดินหายใจอักเสบ, บวม, เกิดการเกร็งตัว, มีเสมหะคั่งจากการอักเสบ และมีเซลล์ที่ตายมาสะสม จากการอักเสบที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ท่อทางเดินหายใจของเด็กเกิดความต้านทานที่มากกว่าเพราะท่อทางเดินหายใจของเด็กที่สั้นและแคบกว่าผู้ใหญ่ดังที่กล่าวข้างต้น เมื่อเกิดการบวมในความหนาที่เท่ากันกับผู้ใหญ่ จะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อทางเดินหายใจแคบกว่าผู้ใหญ่ และเป็นการเพิ่มภาระการหายใจ (work breathing) ที่มากกว่าผู้ใหญ่อีกด้วย จึงส่งผลทำให้ในขณะที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเด็กเกิดอาการที่รุนแรงกว่าและทำให้เด็กมีอัตราการเสียชีวิตมากกว่า⁽⁶⁾
2. การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของเด็กนั้น มักเป็นครั้งแรกที่ระบบทางเดินหายใจของเด็กได้พบกับเชื้อโรค (first exposure) ดังนั้นการสร้างภูมิคุ้มกันยังไม่ดีเพียงพอต่อการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ทำให้เกิดโรคได้
3. แม้ว่าหลังคลอดจะมีภูมิคุ้มกันชนิด IgG ที่ผ่านรกมาจากมารดา แต่ยังคงไม่สมบูรณ์เพราะยังคงสร้างภูมิคุ้มกันชนิดอื่นได้ไม่มาก เช่น IgM และ IgA โดยเฉพาะหลังจากคลอด 3 เดือน IgG ที่ได้จากมารดาก็จะถูกลดลงมากประกอบกับการสร้าง IgM และ IgA ยังคงสร้างได้ไม่เพียงพอต่อการคุ้มกันโรค จึงทำให้ช่วงอายุนี้มีโอกาสในการติดเชื้อมากกว่าช่วงอายุอื่น เรียกว่า physiological hypogammaglobulinemia
4. เซลล์ในทางเดินหายใจของเด็กนั้นเป็นเซลล์ตัวอ่อน (young cell) จะส่งผลให้เซลล์เจริญได้เร็วเพราะว่ามีการแบ่งตัวมาก ฉะนั้นเซลล์จึงเอื้อต่อการเจริญของเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแบ่งชนิดของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลัน

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract infections; URTIs) คือ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจตั้งแต่รูจมูกถึง epiglottis รวมถึงโพรงอากาศรอบจมูกด้วย อาการจากการติดเชื้อในระบบหายใจส่วนนี้ ได้แก่ โพรงหลังจมูกอักเสบหรือโรคหวัด (rhinitis หรือ common cold), คออักเสบ (pharyngitis), ต่อมทอนซิลอักเสบ (tonsillitis), ไซนัสอักเสบ (sinusitis), และหูชั้นกลางอักเสบ (otitis media) เป็นการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงนัก แต่ถ้าหากร่างกายอ่อนแอลงอาจเกิดโรคแทรกซ้อนทำให้เกิดอาการที่รุนแรงได้
2. การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory tract infections; LRTIs) คือ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจตั้งแต่หลอดคอถึงปอด อาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนนี้ ได้แก่ Laryngo-Tracheo Bronchitis (Croup), หลอดลมอักเสบฉบับพลัน (acute bronchitis), หลอดลมฝอยอักเสบฉบับพลัน (acute bronchiolitis) และปอดอักเสบ (pneumonia) การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนนี้มักพบบ่อยในขวบปีแรก และในแต่ละปีพบว่า 3% ของเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 1 ขวบจะเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล เนื่องจากมีการติดเชื้อในระบบหายใจส่วนล่าง⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ และการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างนี้มีความรุนแรงและทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตมากกว่าการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน

สาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลัน

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันนั้นอาจมีสาเหตุมาจากไวรัสหรือแบคทีเรีย แต่การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันในเด็กมักมีสาเหตุจากไวรัส การศึกษาในกรุงเทพมหานครพบว่า การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี 45% มีสาเหตุมาจากไวรัส⁽²⁻³⁾ ไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันทั้ง 2 ส่วนมีมากถึง 200 ชนิดสลับเปลี่ยนกันไป ดังตารางที่ 1⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ ไวรัสแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการติดเชื้อต่างที่กันไป เช่น Rhinovirus จะทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณทางเดินหายใจส่วนบน ในขณะที่ hRSV ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง⁽¹⁸⁾ การเกิดโรคของไวรัสต่าง ๆ นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อายุ, เพศ, ฤดู และช่วงเวลาการระบาด (seasonal distribution) ไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างอย่างรุนแรงในเด็กนั้น คือ hRSV, Parainfluenza, Influenza และ Adenovirus

เมื่ออายุมากขึ้นร่างกายจะมีภูมิคุ้มกันต้านต่อไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจชนิดต่าง ๆ มากขึ้น ก็จะป่วยห่างขึ้นและมีอาการรุนแรงน้อยลงไป ตามปกติร่างกายจะมีภูมิคุ้มกันซึ่งอยู่ในน้ำคัดหลังที่เคลือบผิวเยื่อทางเดินหายใจ แต่ถ้าร่างกายไม่แข็งแรง เช่น ออกกำลังกายไม่เพียงพอ อากาศเย็น เชื้อจะเข้าสู่เนื้อเยื่อและทำให้เกิดอาการขึ้น

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ

ชนิดของไวรัส	จำนวน subtype (s)
Influenza viruses	3 subtypes of type A
Respiratory syncytial viruses	2 subtypes
Parainfluenza viruses (PIV)	4
Adenoviruses	33
Rhinoviruses	~100
Enteroviruses	63
Coronaviruses	4
Herpesviruses	2 subtypes
Cytomegaloviruses	1

ปัจจัยเสี่ยงและความรุนแรงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันในเด็ก

1. น้ำหนักแรกคลอด – พบว่าทารกที่มีน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่า 2,000-3,000 กรัม จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันในช่วงปีแรก โดยเฉพาะทารกที่มีน้ำหนักแรกคลอด 1,500 กรัมจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันมากกว่าทารกที่มีน้ำหนักแรกคลอด 2,500 กรัม ถึง 5 เท่า⁽¹³⁾
2. การเลี้ยงลูกด้วยนมแม่ – การศึกษาในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศกำลังพัฒนาพบว่าทารกที่เลี้ยงด้วยนมมารดาจะมีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันที่น้อยกว่าเลี้ยงด้วยนมผง^(13, 19)
3. โรคประจำตัว – ในผู้ป่วยเด็กที่มีโรคประจำตัว โดยเฉพาะโรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคปอด และโรคภูมิแพ้ จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันมากกว่าเด็กปกติ⁽¹⁹⁾ และหากเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับพลันที่มีไวรัสเป็น

สาเหตุ จะมีความเสี่ยงที่จะเกิดอาการที่รุนแรงกว่าและเกิดอัตราการเสียชีวิตที่มากกว่าผู้ป่วยเด็กที่ไม่มีโรคประจำตัวอีกด้วย^(18, 20)

4. **ภาวะโภชนาการ** – เนื่องจากภาวะโภชนาการที่จะส่งผลในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และเด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการจะทำให้การสร้างระบบภูมิคุ้มกันไม่ดี ดังนั้นเด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดอาการที่รุนแรงและทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตที่มากกว่าเด็กปกติ⁽²¹⁾
5. **ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง** – ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised patients) คือ ผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันน้อยกว่าปกติซึ่งอาจเกิดจากตัวผู้ป่วยเอง เช่น โรคมาเร็งหรือเกิดจากการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันรวมทั้ง corticosteroid เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาจากการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ ในผู้ป่วยกลุ่มนี้เนื่องจากมีภูมิคุ้มกันโรคลดลง จึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดการติดเชื้อตลอดเวลาโดยเฉพาะการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจบริเวณปอด ทั้งจากเชื้อโรคที่ทำให้เกิดปอดอักเสบในคนปกติและเชื้อโรคที่ไม่ทำให้เกิดโรคในคนปกติ ไวรัสที่สามารถเข้าสู่ปอดได้โดยตรงจากการหายใจแม้จะมีจำนวนน้อยก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่ง่ายกว่าคนปกติ และเมื่อเกิดการติดเชื้อขึ้นแล้วก็มักจะลุกลามอย่างรวดเร็วและเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำซ้อน และยังทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตที่มากกว่าคนปกติอีกด้วย^(15, 22) ไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Orthomyxoviridae* และ *Paramyxoviridae* มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเด็กที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽²³⁾

ช่วงการระบาดของไวรัสที่ทำให้ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับย่อ

ช่วงเวลาการระบาดของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับย่อในซีกโลกเหนือมักเริ่มพบในฤดูใบไม้ร่วงและตลอดฤดูหนาว และจะเริ่มลดลงในฤดูใบไม้ผลิ⁽¹⁾ ในเขตร้อนมักเริ่มพบในฤดูฝน หรือหลังจากฤดูฝน 1-2 เดือน และจะมากที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์^(21, 24) ในประเทศไทยจะพบการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับย่อมากที่สุดในช่วงปลายฤดูร้อนถึงฤดูฝน แต่ช่วงการระบาดอาจแตกต่างกันออกไปตามลักษณะภูมิประเทศและชนิดของไวรัสได้อีก เช่น แถบยุโรปจะมีช่วงการระบาดของ human Respiratory syncytial virus (hRSV) อยู่ในต้นฤดูหนาวถึงฤดูใบไม้ผลิ คือ ตั้งแต่เดือนธันวาคม และจะระบาดมากที่สุดในเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ และจะลดลงในเดือนมีนาคม⁽²⁵⁾ ส่วนในแถบเอเชียจะพบช่วงการระบาดของ hRSV ในช่วงฤดูฝนถึงฤดูหนาวแต่จะพบในฤดูฝนมากกว่า คือ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์^(23, 26)

การแพร่กระจายของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ฉบับปล้น

โรคนี้เป็นโรคที่พบได้ตลอดทั้งปีเพราะมีไวรัสหลายชนิดเป็นสาเหตุ การติดต่อเกิดได้ง่ายมาก โดยการอยู่ใกล้ชิดกันจึงพบเป็นกันมากตามโรงเรียน โรงงาน และที่ ๆ มีคนอยู่รวมกลุ่มกันมาก ไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจนั้นจะมีอยู่ในสารคัดหลั่ง เช่น น้ำมูก น้ำลาย และเสมหะของผู้ป่วย จะสามารถติดต่อได้โดยการไอ จาม หรือหายใจรดกัน นอกจากนี้ยังอาจติดต่อโดยการสัมผัสมือ กล่าวคือ ไวรัสอาจติดที่มือและเมื่อใช้นิ้วมือขยี้ตาหรือแคะจมูก เชื้อก็จะเข้าสู่ร่างกายจนเกิดอาการได้ ระยะฟักตัว คือ ระยะตั้งแต่ผู้ป่วยรับเชื้อเข้าไปจนกระทั่งมีอาการเกิดขึ้นจะอยู่ในช่วง 1-3 วัน

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับปล้นในโรงพยาบาล

การติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) มักเกิดขึ้นในช่วงการระบาดของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจนั้นๆ เช่น ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลในฤดูฝนก็จะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ hRSV ในระบบทางเดินหายใจจากการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ผู้ป่วยเด็กที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลมีโอกาสที่ได้รับผลแทรกซ้อนจากการติดเชื้อในระบบหายใจในโรงพยาบาลได้สูงเป็นอันดับที่ 2 รองจากการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ⁽⁶⁾ สาเหตุที่การเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมีส่วนในการส่งเสริมการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจมีหลายสาเหตุขึ้นอยู่กับความเจ็บป่วยของตัวผู้ป่วยเอง หรืออาจเกิดจากสภาวะแวดล้อม เช่น⁽⁶⁾

1. ผู้ป่วยอาจเสียดกลไกในการขับเชื้อออก เช่น กลไกการไอ, ขนขนาดเล็ก (cilia) ที่ช่วยในการโบกเชื้อโรค, เม็ดเลือดขาวในปอด
2. ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันต่ำลง ซึ่งอาจเกิดจากความเจ็บป่วยของตัวผู้ป่วยเอง หรือจากการให้ยารักษา
3. จากความจำเป็นที่ต้องใช้เครื่องมือบางอย่างเข้าสู่ร่างกาย เช่น ท่อหลอดลมคอ, การเจาะคอ หรือการดูดเสมหะ โดยเฉพาะการใช้เครื่องช่วยหายใจ หากมีการปนเปื้อนแล้วจะทำให้เกิดการเพิ่มเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจได้โดยตรง

ไวรัสที่สำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของผู้ป่วยเด็กในโรงพยาบาล คือ hRSV และ PIV และการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีสาเหตุจากไวรัส 2 ชนิดนี้อาจส่งผลให้เกิดอาการที่รุนแรงกว่าการติดเชื้อ hRSV และ PIV จากผู้อื่นหรือการติดเชื้อสิ่งแวดล้อมดังที่กล่าวข้างต้น โดยเฉพาะการติดเชื้อ hRSV ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคหัวใจ (congenital heart disease) จะมีอัตราการเสียชีวิตและอัตราการเสียชีวิตสูง⁽²⁷⁾

การรักษา

เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจสามารถหายได้เอง การรักษาจึงอยู่ที่การพักผ่อนและการปฏิบัติตัวของผู้ป่วยเป็นสำคัญ แต่ในผู้ป่วยบางรายหากมีอาการรุนแรงอาจต้องรักษาตามอาการ ในปัจจุบันยาค้านไวรัสที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่มีไวรัสเป็นสาเหตุมีไม่กี่ชนิดและใช้แตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของไวรัส เช่น ribavirin จะใช้กับการติดเชื้อ hRSV และ influenza เพราะฉะนั้นการให้ยาค้านไวรัสในการรักษาจึงจำเป็นต้องทราบชนิดของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อก่อน ข้อเสีย คือ ยาเหล่านี้มีราคาแพงและมักมีผลข้างเคียง เช่น ผลข้างเคียงทางระบบประสาท หรือการเกิดปอดอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำซ้อน

การป้องกัน

การป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับล้นที่ดั้นขึ้นขึ้นอยู่กับทำให้ความรู้ในการรักษาสุขอนามัยของประชาชน และการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการเสียชีวิตได้ เช่น

1. การควบคุมการแพร่ระบาดของไวรัสโดยการสร้างสุขอนามัยที่ดี เช่น การล้างมือให้สะอาด
2. การควบคุมไม่ให้เกิดการติดเชื้อในญาติพี่น้อง
3. การพัฒนาวัคซีน เช่น ในปัจจุบันมีวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อ influenza

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉบับล้นนั้นอาจมีสาเหตุมาจากไวรัสหรือแบคทีเรีย อาการและอาการแสดงรวมถึงช่วงการระบาดของไวรัสแต่ละชนิดไม่สามารถบอกลถึงสาเหตุของการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ เพราะฉะนั้นการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการในการทราบถึงสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจึงเป็นสิ่งสำคัญในการพิจารณาการให้การรักษาที่เหมาะสม โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่มีอาการรุนแรง ผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียก็ควรได้รับยาปฏิชีวนะในการรักษา ส่วนผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อเนื่องมาจากไวรัสนั้นไม่จำเป็นต้องให้ยาปฏิชีวนะ เพราะยาปฏิชีวนะไม่มีผลต่อไวรัส หากให้ยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยที่มีไวรัสเป็นสาเหตุของการติดเชื้อก็จะทำให้เกิดการใช้ยาปฏิชีวนะที่เกินความจำเป็นจะเกิดผลอันไม่พึงประสงค์จากยาตามมา ในทางกลับกันผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะก็อาจเกิดโรคแทรกซ้อนและมีอาการที่รุนแรงได้

การวินิจฉัยไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในห้องปฏิบัติการแม้จะมีความยุ่งยาก แต่ก็มีความจำเป็นในด้านระบาดวิทยาเพื่อให้ทราบถึงสมบัติของเชื้อไวรัสที่เป็นต้นเหตุให้เกิดการติดเชื้อ, วิธีการติดต่อ, พยาธิกำเนิด, การใช้ยาต้านไวรัสที่เหมาะสม, การพัฒนาวัคซีนหรือการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมอนามัยเพื่อป้องกันและควบคุมโรค⁽²²⁾ สิ่งส่งตรวจที่นำมาวินิจฉัยไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจมีหลายชนิด ปัจจุบันวิธีที่นิยม คือ การวินิจฉัยโดยใช้น้ำล้างโพรงหลังจมูก (nasopharyngeal aspirate; NA or NP, nasopharyngeal washing; NW)^(2, 28) เพราะน้ำล้างโพรงหลังจมูกสามารถเก็บเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) จากทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง เนื่องจากไวรัสเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องอาศัยเซลล์ของ host สิ่งส่งตรวจ (specimen) จึงจำเป็นต้องมีเซลล์ของ host บริเวณที่ไวรัสเพิ่มจำนวนอยู่ด้วย คือ เซลล์เยื่อบุผิวบริเวณทางเดินหายใจ เพราะฉะนั้นน้ำล้างโพรงหลังจมูกจึงเป็นทางเลือกที่ดี การเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกควรเก็บตั้งแต่เริ่มมีอาการเพราะไวรัสจะมีปริมาณมากที่สุดเมื่อผู้ป่วยมีอาการ ไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจนับพันมักเป็น RNA ไวรัส จึงควรเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกได้ที่ -70°C จนกว่าจะนำมาวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการตรวจหาไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจนั้นมีหลายวิธี ซึ่งมีจุดประสงค์คือตรวจหาเชื้อไวรัสหรือองค์ประกอบของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรครวดเร็วและแม่นยำที่สุด และได้มีการพัฒนามาจนถึงปัจจุบัน คือ

1. การเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (viral culture, viral cytopathology) : เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) โดยการนำสิ่งส่งตรวจที่ได้เพาะบนเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น cell line เช่น primary monkey kidney cells, human lung fibroblasts เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้น (cytopathic effect : CPE) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นั้นจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวของไวรัส เช่น ในเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อ human respiratory syncytial virus (hRSV) นั้นจะใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Hep-2 cells และจะทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ที่ติดเชื้อ (syncytial formation) ถึงแม้ว่าการเพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นจะเป็นวิธีมาตรฐานก็ตาม แต่ก็มีข้อเสีย คือ อาจใช้เวลานานเป็นสัปดาห์ และต้องใช้ความชำนาญสูงขึ้นอยู่กับห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจทำให้รักษาไม่ทันทั่วถึง นอกจากนั้นไวรัสแต่ละชนิดยังต้องการเซลล์เพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันอีกด้วย
2. การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) : เป็นวิธีที่สามารถบอกแฟ้มลิ้นของไวรัสได้อย่างชัดเจน โดยนำสิ่งส่งตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยอาศัยลักษณะของไวรัสแต่ละชนิด เป็นวิธีที่รวดเร็วและมีข้อดีในด้านการจำแนกไวรัสที่ไม่สามารถเจริญได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น Coronaviruses และ Rotavirus แต่ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูง และต้องมีไวรัสอยู่

ในสิ่งส่งตรวจมากกว่า 10^7 virion/ml จึงจะตรวจพบ นอกจากนั้นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจยังมีราคาแพงอีกด้วย

3. การตรวจโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody reaction)

- immunofluorescence : วิธีนี้มีความไวกว่าการเพาะเชื้อ เป็นการตรวจหาตัวไวรัส (แอนติเจน) หรือแอนติบอดีต่อไวรัส โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีหรือแอนติ-แอนติบอดีต่อไวรัสที่ติดฉลากอยู่กับสารเรืองแสง (fluorescein dye) และอ่านผลภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence microscope) ข้อดีของวิธีนี้คือ รวดเร็วและสามารถอ่านเชื้อได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ราคาสูงและการแปลผลขึ้นอยู่กับความไวและความจำเพาะของน้ำยา หากมีความไวมากเกินไปอาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ และเนื่องจากต้องอ่านผลภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์จึงต้องใช้ผู้ชำนาญในการเตรียมและแปลผล นอกจากนี้การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส ในสิ่งส่งตรวจจะต้องมีปริมาณแอนติบอดีสูง

- enzyme immunoassay (EIA) หรือ enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) : เป็นการตรวจหาตัวไวรัส (antigen) ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่อยู่บน solid phase และอ่านผลด้วย spectrophotometer ข้อดีของวิธีนี้คือ สะดวกและรวดเร็ว สามารถตรวจไวรัสปริมาณน้อยได้ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผล เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ และที่สำคัญสามารถวัดปริมาณเชื้อได้ มีความไวมากกว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง และ immunofluorescence ข้อเสียของวิธีนี้คือ อาจเกิด non-specific reaction ซึ่งจะทำให้ผลบวกปลอม

- radioimmunoassay : มีหลักการเช่นเดียวกับ enzyme immunoassay แต่ติดฉลากด้วยสารรังสี radioisotope ที่นิยมคือ I^{125} หรือ I^{131} และอ่านผลด้วย gamma counter แต่วิธีนี้มีความเสี่ยงเนื่องจากการใช้สารรังสี

- latex-agglutination assay : ใช้ antibody ติดฉลากกับ latex bead และอ่านผลด้วยการดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม ข้อดีของวิธีนี้คือ สะดวกและใช้เวลาน้อยมากเพียง 5-10 นาทีเท่านั้นและไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผล แต่ข้อเสียคือ มีความไวค่อนข้างต่ำ

4. Polymerase chain reaction (PCR) : เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส (DNA หรือ RNA) โดยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสจนสามารถตรวจปริมาณสารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยได้ และวิธีนี้แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง คือ ไม่จำเป็นต้องใช้ไวรัสที่อยู่ในรูปที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ เพียงมีสาร

พันธุกรรมในสิ่งส่งตรวจเล็กน้อยก็สามารถตรวจหาไวรัสที่มีได้ เพราะฉะนั้นวิธีนี้จึงมีความไวและความจำเพาะสูง ไม่ยุ่งยากและรวดเร็ว แล้วยังสามารถตรวจหาไวรัสหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาไวรัสที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ เช่น Rhinovirus และ Coronavirus อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังมีข้อเสียคือ วิธีนี้มีความไวสูงจึงต้องระวังการปนเปื้อนระหว่างสิ่งส่งตรวจ และยังคงมีราคาแพงจึงไม่นิยมใช้ในงานประจำ

ถึงแม้ว่าการตรวจหาไวรัสในปัจจุบันได้มีหลายวิธีดังที่กล่าวมา แต่ยังคงมีผู้ป่วยเด็กอีกร้อยละ 50-70 ที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่างที่มีอาการเล็กน้อยจนถึงอาการรุนแรงแต่ยังคงตรวจไม่พบจุลชีพใดๆที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค⁽²⁹⁾ เพราะฉะนั้นอาจเป็นไปได้ว่ายังคงมีจุลชีพอื่นๆนอกเหนือจากจุลชีพที่พบได้ในปัจจุบันแต่ยังไม่มีการค้นพบ

การค้นพบไวรัสชนิดใหม่

ในปี พ.ศ. 2544 van den Hoogen และคณะจากประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁰⁾ ได้ค้นพบไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจจากเด็กที่พบว่ามีอาการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจแต่ไม่สามารถตรวจพบจุลชีพจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และโดยการทำ PCR จากจุลชีพที่ทราบในปัจจุบัน แต่สามารถเพาะเชื้อไวรัสและตรวจพบไวรัสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จึงได้ทำการศึกษาลักษณะของไวรัสชนิดนี้ เมื่อศึกษาแล้วพบว่า เป็นไวรัสชนิดใหม่ที่มีมานานแต่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อนจึงได้ให้ชื่อไวรัสชนิดนี้ว่า human metapneumovirus (hMPV)

จากการศึกษาดังกล่าวจึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของ การติดเชื้อ hMPV ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจประเทศไทย โดยการนำ RT-PCR จากน้ำล้างโพรงหลังจมูกใน gene ส่วนนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein: N), ฟิวชั่น (fusion: F) และ โพลีเมอเรส (polymerase: L) ของ hMPV และวิเคราะห์ถึงสายพันธุ์ของ hMPV ที่เกิดขึ้นในประเทศไทยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในประเทศอื่น เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยและการรักษาได้ทันทั่วถึง นอกจากนี้ยังสามารถเป็นประโยชน์ขั้นพื้นฐานในการพัฒนาวัคซีนในอนาคตอีกด้วย

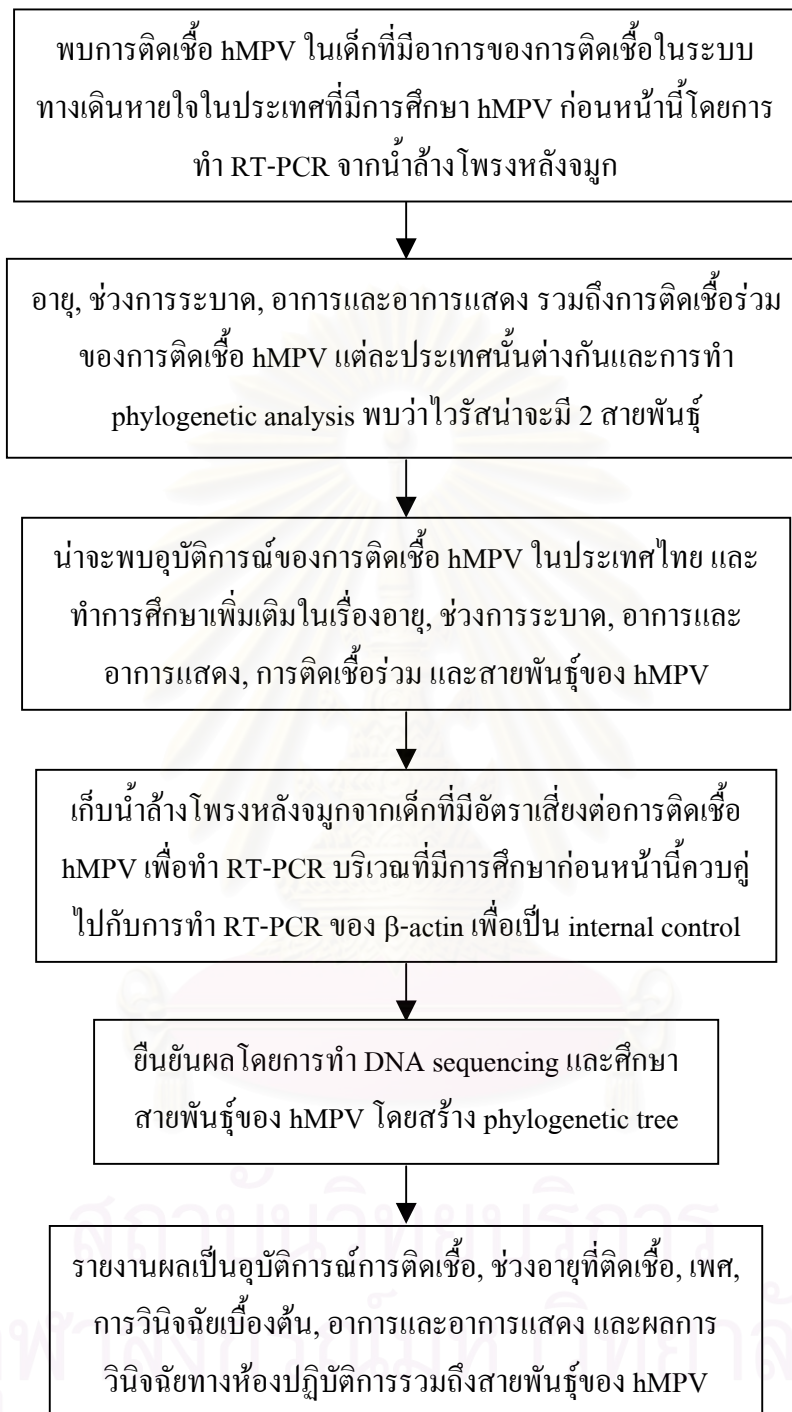
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

1. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในชิ้นส่วนนิวคลีโอโปรตีน, พีวชัน และโพลีเมอเรส ที่ตรวจพบในประเทศไทยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ตรวจพบในประเทศต่างๆ
2. ศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยเด็กที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย รวมถึงความสำคัญทางคลินิกในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ผู้ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉับพลัน คือ ผู้ที่มีอาการในระบบทางเดินหายใจ หรือได้รับการวินิจฉัยว่ามีอาการดังนี้
 - 1.1 มีไข้ (fever)
 - 1.2 ไอ (cough)
 - 1.3 หอบ (dypnea)
 - 1.4 เจ็บคอ (sore throat)
 - 1.5 จมูกอักเสบ (rhinitis)
 - 1.6 คออักเสบ (pharyngitis)
 - 1.7 ต่อมทอลซินอักเสบ (tonsillitis)
 - 1.8 หูชั้นกลางอักเสบ (otitis media)
 - 1.9 ไซนัสอักเสบ (sinusitis)
 - 1.10 หลอดลมอักเสบ (bronchitis)
 - 1.11 หลอดลมฝอยอักเสบ (brionchiolitis)
 - 1.12 ปอดอักเสบ (pneumonia)
2. ผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจฉับพลันเนื่องจาก hMPV คือ ผู้ป่วยที่ตรวจการติดเชื้อ hMPV ด้วยวิธี RT-PCR ในส่วน N, F หรือ L gene แล้วให้ผลบวก และต้องให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ β -actin ด้วย

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

ข้อจำกัดของการวิจัย

จำนวนน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับ hMPV โดยวิธี RT-PCR อาจมีน้อยไปไม่เพียงพอในการทำ phylogenetic analysis และการศึกษาช่วงการระบาดของการติดเชื้อ hMPV นั้นอาจเป็นไปได้ยาก เนื่องจากข้อจำกัดในปริมาณของสิ่งส่งตรวจเช่นกัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้จะเป็นแนวทางเพื่อการพัฒนาการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ

1. human metapneumovirus (hMPV)
2. acute respiratory tract infections (ARTIs)
3. upper respiratory tract infections (URTIs)
4. lower respiratory tract infections (LRTIs)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กไทยได้
2. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จะทำให้ทราบถึงชนิดของสายพันธุ์ hMPV ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการศึกษาประเทศอื่นๆ ที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้
3. ทราบถึงอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยเด็กไทย
4. ทราบถึงความสัมพันธ์ของช่วงอายุ, เพศ, อาการและอาการแสดง ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจ
5. ทราบถึงช่วงการระบาดของ hMPV ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยเด็กไทย
6. ทราบถึงความเป็นไปได้ของการเกิดการติดเชื้อร่วม (coinfection) กับ hRSV

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การค้นพบ hMPV⁽³⁰⁾

human Metapneumovirus (hMPV) เป็นไวรัสที่ถูกค้นพบโดย van den Hoogen และคณะ ในปีพ.ศ. 2544 จากน้ำล้างโพรงหลังจมูกของเด็กที่ป่วยด้วยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ จำนวน 28 คน ภายในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา เด็กเหล่านี้มีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจคล้ายกับการติดเชื้อไวรัสโดยเฉพาะ human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) คือ ไอ, มีไข้, หลอดลมอักเสบ, หลอดลมฝอยอักเสบ และปอดบวม รวมถึงเด็กบางรายต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ แต่การตรวจทางห้องปฏิบัติการ คือ การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี รวมถึงการตรวจทางอณูชีววิทยาต่อไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่ทราบในปัจจุบันทั้งหมด ปรากฏว่าไม่พบสาเหตุของการติดเชื้อ และนักวิจัยยังคงเชื่อว่าการติดเชื้อดังกล่าวเกิดจากการติดเชื้อไวรัส จึงทำการศึกษาเพื่อหาสาเหตุของการติดเชื้อ

การศึกษาเริ่มต้นโดยนำน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ตรวจไม่พบไวรัสชนิดอื่นนำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัส 5 ชนิด เพื่อดูปฏิกิริยาที่ไวรัสมีต่อเซลล์ (Cytopathic effect : CPE) คือ

1. tertiary Monkey Kidney (tMK) cells
2. Vero cells
3. A549 cells
4. Madin Darby Kidney cells
5. Chicken Embryo Fibroblasts (CEF)

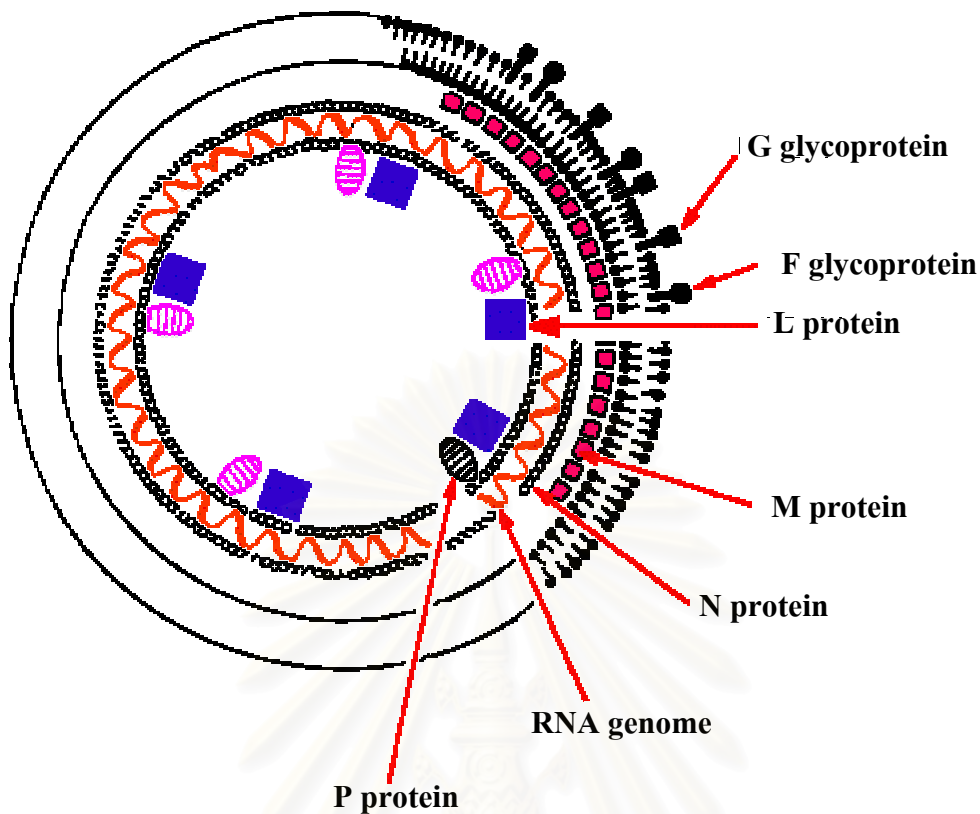
ปรากฏว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 10-14 วัน ไวรัสสามารถเจริญได้ดีใน tMK cells และการเกิดปฏิกิริยาต่อเซลล์ก็ต่างจาก hRSV คือ ไม่ทำให้เกิดการรวมกลุ่มขนาดใหญ่ของเซลล์ (syncytial formation) เหมือนกับ hRSV จึงเชื่อว่าเชื้อนี้ไม่ใช่ hRSV เมื่อนำส่วนใสของเซลล์เพาะเลี้ยงส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบอนุภาคไวรัสขนาด 150-600 นาโนเมตร รูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) มีเปลือกหุ้ม (envelope) ซึ่งสมบัติดังกล่าวเป็นสมบัติของไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* จึงทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* คือ human parainfluenza (hPIV) type 1-4, mumps virus, measles virus, hRSV, simian virus type 5 (SV-5), Sendai virus และ Newcastle disease virus (NDV) โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) แต่ให้ผลลบกับไวรัสทุกชนิดดังที่กล่าวข้างต้น นักวิทยาศาสตร์จึงสรุปว่าไวรัสที่พบอาจเป็นไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* แต่ยังคงไม่มีการค้นพบ ต่อมาได้ทำการตรวจสอบสมบัติทาง

ชีวเคมีของเปลือกหุ้ม (envelope) เพื่อคุณสมบัติของเปลือกหุ้มของไวรัส โดยความสามารถในการยึดเกาะกับเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity) ของไก่และหนูตะเภา ปรากฏว่าไวรัสไม่สามารถทำให้เกิดการยึดเกาะของเม็ดเลือดแดงได้ จึงบอกได้ว่าไวรัสนี้เป็นสมาชิกของสับแฟมิลี *Pneumovirinae*



รูปที่ 2 แสดงรูปร่างของ hMPV เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ต่อมาจึงทำการหาลักษณะของไวรัสด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาโดยใช้วิธี Random Arbitrary PCR (RAP-PCR) โดยการออกแบบ primer แบบสุ่มจับกับสารพันธุกรรมของไวรัส เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้วจะได้เป็นส่วนๆ จากนั้นทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำแต่ละส่วนเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) ปรากฏว่าสารพันธุกรรมและกรดอะมิโนแต่ละส่วนที่ได้ใกล้เคียงกับ Avian Pneumovirus serotype C (APV-C) ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในนกมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัว genome ของไวรัสที่พบระหว่างจีโนม *Pneumovirus* ซึ่งมี hRSV เป็นสมาชิก จะมี gene ทั้งหมด 10 gene และมีการเรียง genome เป็น 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' กับจีโนม *Metapneumovirus* ซึ่งมี APV เป็นสมาชิกจะมี gene ทั้งหมด 8 gene และมีการเรียง genome ต่างจากจีโนม *Pneumovirus* คือ 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5' ปรากฏว่าไวรัสที่พบมีการเรียง genome เหมือนกับไวรัสที่อยู่ในจีโนม *Metapneumovirus* จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นไวรัสที่อยู่ในจีโนม *Metapneumovirus* เช่นเดียวกับ APV



รูปที่ 3 แสดงรูปร่างของไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxovirus*

โดยสรุปแล้ว hMPV เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope virus) เป็น lipid bilayer ที่สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จัดอยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae*, สับแฟมิลี *Pneumovirinae* และอยู่ในจีนัส *Metapneumovirus* เช่นเดียวกับ APV มี genome เป็น RNA สายลบ (negative single-stranded RNA virus) ที่มีความยาวประมาณ 13,350 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบไปด้วย gene ทั้งหมด 8 gene และมีการเรียง genome ดังรูปที่ 4 และเพิ่มจำนวนอยู่ใน cytoplasm เนื่องจาก hMPV เป็นไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* จึงมีรูปร่างและหน้าที่ของโปรตีนเหมือนกับไวรัสอื่นๆ ที่อยู่ในแฟมิลีนี้ตามลำดับ คือ⁽³¹⁻³³⁾

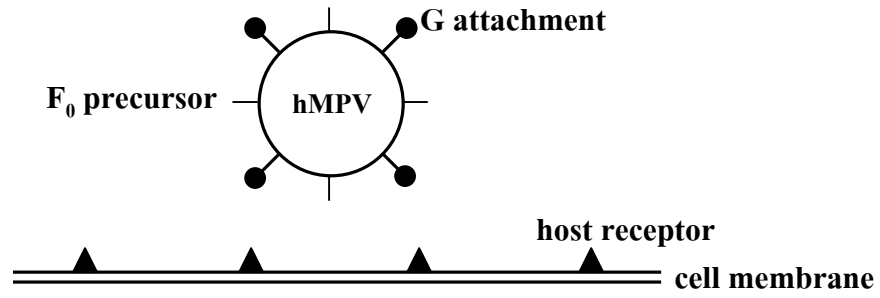
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



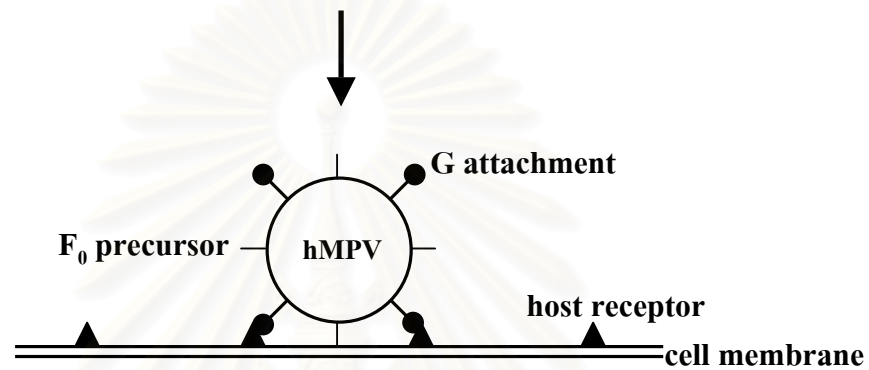
รูปที่ 4 แสดงการเรียง genome ของ hMPV

1. นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein: N) - มีความยาว 1,185 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 394 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 55 ถึง 1,239) โปรตีนในส่วนนี้เหมือนกับ APV-C มากที่สุดถึง 88% และกับ Paramyxovirus อื่นๆ hMPV จะมีความใกล้เคียงเพียง 7-11 % เท่านั้น หน้าที่ของโปรตีนในส่วนนี้คือ
 - ทำงานร่วมกับเมทริกซ์โปรตีน (M) ในการช่วยให้ RNA genome ของไวรัสเข้ารวมกันกับ capsid (encapsidation)
 - ช่วยฟอสโฟโปรตีน (P) และโพลีเมอเรสโปรตีน (L) ในการ transcription และ replication
 - ทำหน้าที่ร่วมกับเมทริกซ์โปรตีน (M) ในการ assembly
 - เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมอัตราการ transcription และ replication
2. ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein: P) - มีความยาว 885 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 294 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,263 ถึง 2,147) โปรตีนในส่วนนี้เหมือนกับ APV-C 68% และเหมือนกับ hRSV ซึ่งเป็นไวรัสที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกัน 22-24% มีบทบาทร่วมกับโพลีเมอเรสโปรตีน (L) ในการสร้างสาย RNA (RNA synthesis) แล้วยังทำหน้าที่ในการสร้าง RNA ร่วมกับโพลีเมอเรสโปรตีน และนิวคลีโอโปรตีน(N) อีกด้วย
3. เมทริกซ์โปรตีน (Matrix: M) - มีความยาว 765 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 254 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2,180 ถึง 2,944) โปรตีนในส่วนนี้เหมือนกับ APV สูงถึง 76-87% และมีความเหมือนกับ hRSV ค่อนข้างต่ำ คือ 37-38% เป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดและมีหน้าที่ในการกำหนดรูปร่างของไวรัส คือ เปลือกหุ้ม (envelope) และการ budding ออกจากเซลล์ host
4. ฟิวชั่นโปรตีน (fusion: F) - มีความยาว 1,620 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 254 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2,180 ถึง 2,944) โปรตีนในส่วนนี้เหมือนกับ APV-C 81% และมีความเหมือนกับไวรัสอื่นๆ ที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* เพียง 10-18% fusion protein มีบทบาทสำคัญในการก่อโรค เพราะโปรตีนในส่วนนี้เป็น surface antigen ในการจับกับตัวรับ (receptor) ของ host ในการนำ genome เข้าสู่เซลล์

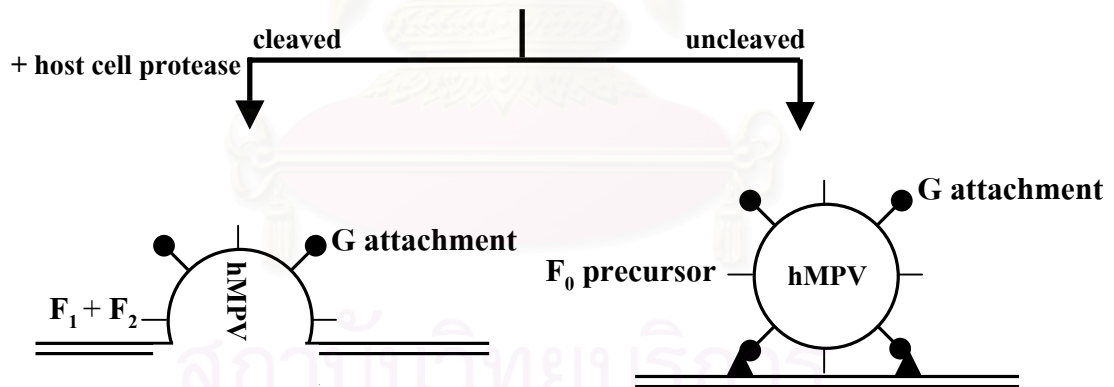
- ของ host เหมือนกับไวรัสอื่นๆ ที่อยู่แฟมิลี *Paramyxoviridae* ถึงแม้จะมีการจับตัวกันของแอสเทซเม้นท์โปรตีน (G) กับเซลล์ของ host แล้ว แต่ถ้าไม่มีการจับกับของ fusion protein กับเซลล์ของ host ไวรัสก็จะไม่สามารถปล่อย RNA genome เข้าสู่เซลล์ของ host ได้ การปล่อย RNA genome ของ paramyxovirus มีกลไกดังนี้ คือ ก่อนที่ไวรัสจะจับกับ receptor บนผิวเซลล์มนุษย์นั้นจะมีฟิวชันโปรตีนเป็น F_0 (precursor F_0) และเมื่อไวรัสจับกับ receptor บนผิวเซลล์โดยมีสภาวะที่เหมาะสม คือ มีเอนไซม์ protease ของ host จะทำให้ F_0 แยกออกเป็น 2 หน่วยย่อย คือ F_1 และ F_2 โดยมี disulfide bond เชื่อมระหว่าง F_1 และ F_2 จากนั้นเปลือกหุ้มของไวรัสก็จะรวมเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของ host และจะปล่อย RNA เข้าสู่เซลล์ของ host (รูปที่ 5)
5. 22K โปรตีน (M_2 protein: M_2) – โปรตีนส่วนนี้มี 2 open reading frames (ORF) เหมือนกับ Pneumovirus อื่นๆ ประกอบไปด้วย
 - โปรตีน M2-1 (transcription anti-termination factor) อยู่ติดกับ F gene และมีความยาว 187 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5,315 ถึง 4,752) และมีความเหมือนกับ APV-C ถึง 87% มีหน้าที่ช่วยโพลีเมอเรสโปรตีนในการสร้างเอนไซม์
 - โปรตีน M2-2 (RNA regulatory protein) อยู่เหลื่อมกันกับ M2-1 มีความยาว 71 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5,263 ถึง 5,478) มีความเหมือนกับ APV-C น้อยกว่า M2-1 คือ เหมือนกับ APV-C 56% หน้าที่ของโปรตีนในส่วนนี้คือการควบคุมในระหว่างการเกิดกระบวนการ RNA replication และ transcription
 6. สมอลล์ ไฮโดรโฟบิก โปรตีน (small hydrophobic protein: SH) - มีความยาว 552 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 183 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5,509 ถึง 6,060) โปรตีนในส่วนนี้มีความยาวมากกว่า Paramyxovirus อื่นๆ เมื่อใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast ปรากฏว่าโปรตีนในส่วนนี้ไม่มีความเหมือนกับไวรัสที่ทราบในปัจจุบัน หน้าที่ของโปรตีนส่วนนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด
 7. แอสเทซเม้นท์โปรตีน (attachment protein: G) – เป็น transmembrane ที่มีความยาว 710 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 236 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 6,262 ถึง 6,972) เมื่อใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast ปรากฏว่าโปรตีนในส่วนนี้ไม่มีความเหมือนกับไวรัสที่ทราบในปัจจุบัน
 8. โพลีเมอเรสโปรตีน (polymerase protein: L) – มีความยาวมากที่สุด คือ 6,017 นิวคลีโอไทด์และโปรตีนมีความยาว 2,005 amino acid (นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 7,182 ถึง 13,199) เนื่องจากยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C ในส่วน L gene



เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ของ host ก็จะหา receptor ในการจับกับ G protein ของไวรัส



จากนั้น G attachment ก็จะจับกับ receptor ของ host และ F₀ ก็จะจับกับ cell membrane



หาก F₀ ของไวรัสจะจับกับ cell membrane ของ host ไวรัสก็จะสามารถนำ RNA genome เข้าสู่เซลล์ของ host ได้

หาก F₀ ไม่จับกับ cell membrane ของ host ไวรัสก็ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้

รูปที่ 5 แสดงการเข้าสู่เซลล์ของ host ของ hMPV

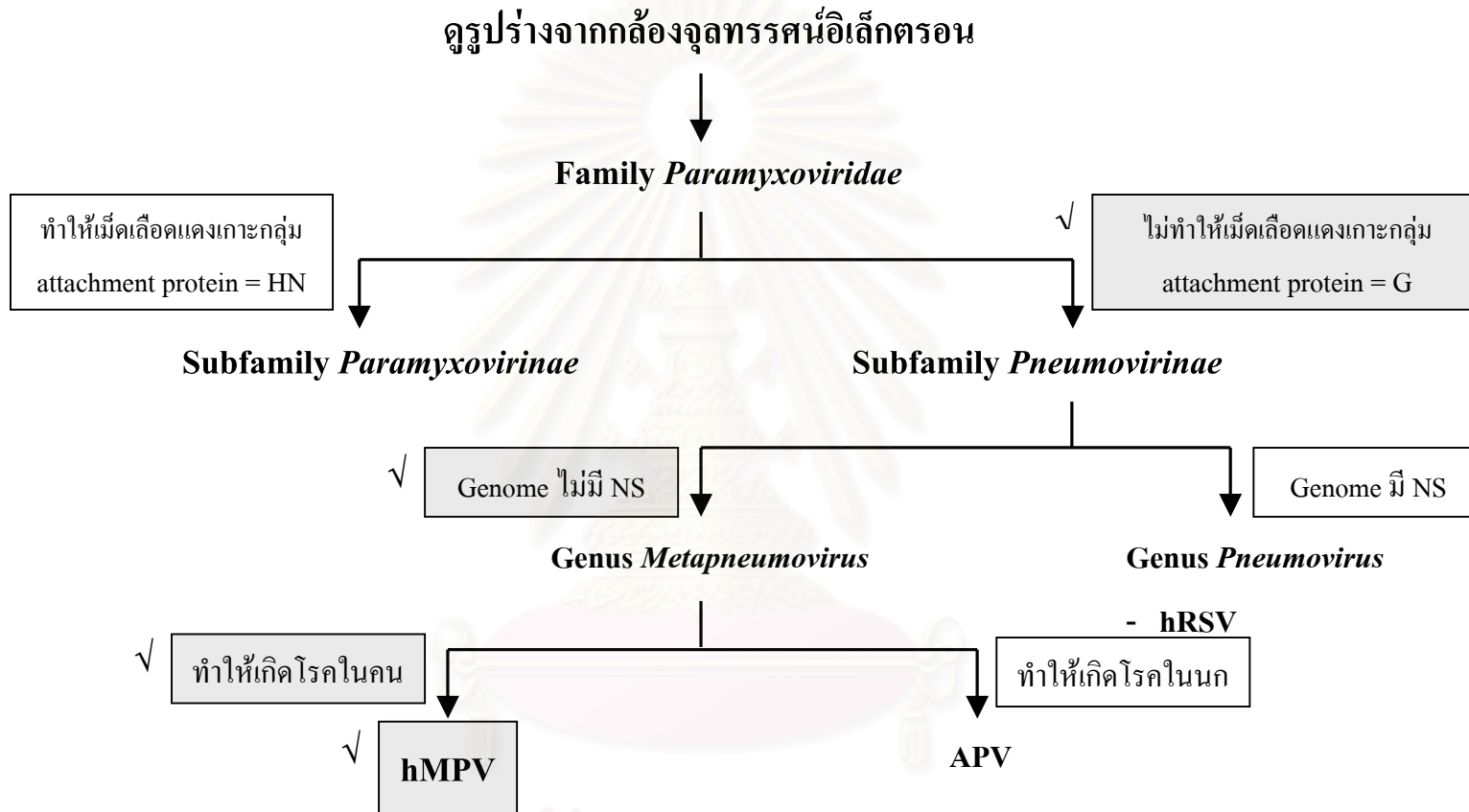
จึงไม่ทราบความเหมือนของโปรตีนกับ APV-C โปรตีนในส่วนนี้จึงมีความเหมือนกับ APV-A มากที่สุด คือ 64% และโปรตีนในส่วนนี้เหมือนกับ hRSV 44% โปรตีนในส่วนนี้มีน้อยที่สุด แต่มีขนาดใหญ่ที่สุด หน้าที่ของโปรตีนในส่วนนี้ คือ การสร้างเอนไซม์ RNA-dependent-RNA polymerase ในกระบวนการ replication และ transcription ร่วมกับ P และ N

จากข้อมูลที่ได้ทำให้มีข้อสงสัยว่าไวรัสที่พบเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในนกแล้วข้ามสายพันธุ์มายังมนุษย์ หรือเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์เท่านั้น จึงได้ทำการทดลองในสัตว์ทดลองเพื่อดูความจำเพาะ (host range) ของการก่อโรคของไวรัสชนิดนี้ โดยการหยดไวรัสที่ทำการเพาะเชื้อในจมูกของลิงกับนก ปรากฏว่าลิงเท่านั้นที่เกิดอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ แสดงว่าไวรัสชนิดนี้เป็นไวรัสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าไวรัสนี้เป็นไวรัสของมนุษย์ที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* จีนัส *Metapneumovirus* ที่ยังไม่ได้มีการค้นพบและยังเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงได้ให้ชื่อว่า human Metapneumovirus (hMPV)

เพื่อศึกษาถึงการอุบัติขึ้นของ hMPV จึงนำซีรัมกลุ่มอายุต่างๆตั้งแต่ 1-90 ปีที่เก็บไว้ 50 ปีที่แล้วมาทดสอบแอนติบอดีต่อไวรัสชนิดนี้ ปรากฏว่าคนที่มีอายุตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไปส่วนใหญ่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดนี้แล้วและแสดงให้เห็นว่า hMPV ก่อให้เกิดโรคในวัยเด็กและมีมานานกว่า 50 ปี เพราะฉะนั้น hMPV ไม่ใช่ไวรัสที่เพิ่งอุบัติขึ้น แต่เป็นไวรัสที่เพิ่งมีวิธีการตรวจวินิจฉัยพบในปัจจุบัน หลังจากที่ Van den Hoogen และคณะ ค้นพบ hMPV เมื่อ พ.ศ. 2544⁽³⁰⁾ ก็ได้มีหลายประเทศที่สนใจทำการศึกษาค้นคว้าการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเนื่องจาก hMPV ในด้านต่างๆ ทุกช่วงอายุทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ เช่น อุบัติการณ์การติดเชื้อ hMPV, อาการของการติดเชื้อ hMPV และสายพันธุ์ของ hMPV

อัตราการพบการติดเชื้อ hMPV ในประเทศต่างๆ

หลังจากการพบ hMPV ในประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁰⁾ ได้มีหลายประเทศได้ทำการตรวจหาอัตราการติดเชื้อ hMPV โดยวิธี RT-PCR ใน gene ต่างๆ เช่น N, F, M และ L ในหลายช่วงอายุ พบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในประเทศต่างๆ แตกต่างกันไป แสดงในตารางที่ 2 จากข้อมูลการพบ hMPV ในหลายประเทศทำให้สรุปได้ว่า hMPV สามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกช่วงอายุ และอุบัติการณ์ของการพบ hMPV ในแต่ละประเทศนั้นยังคงแตกต่างกันออกไป อาจเป็นเพราะการออกแบบการทดลองที่ต่างกัน ในบางประเทศจะออกแบบการทดลองโดยการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในตัวอย่างทั้งหมด ในทางตรงกันข้ามก็มีบางประเทศที่ตรวจหาการติดเชื้อ hMPV จากตัวอย่างที่ให้ผลลบกับไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักบางประเทศก็



รูปที่ 6 แสดงการค้นพบ hMPV

ได้ทำการศึกษาศึกษาการติดเชื้อ hMPV ย้อนหลัง เช่น การศึกษาในประเทศอังกฤษ⁽³⁴⁾ และประเทศแคนาดา⁽³⁵⁾ เป็นการศึกษาการติดเชื้อย้อนหลังเป็นเวลา 25 ปี และ 8 ปีตามลำดับ แต่การศึกษาย้อนหลังในประเทศอังกฤษนั้นเป็นการศึกษาศึกษาการติดเชื้อเฉพาะรายที่ให้ผลลบกับการติดเชื้อไวรัสที่เป็นที่รู้จัก ส่วนการศึกษาศึกษาการติดเชื้อ hMPV นั้นยังคงเป็นที่ศึกษาน้อยมีเพียงประเทศฮ่องกง⁽³⁶⁾, ประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁷⁾ และในประเทศอิตาลี⁽³⁸⁾ เท่านั้น และอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ใน 3 ประเทศนี้เป็น 5.5%, 7% และ ตามลำดับ การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV นั้นยังคงมีน้อย อาจเพราะเป็นการศึกษาระยะยาว และอัตราการพบการติดเชื้อ hMPV นั้นก็อาจเป็นในฤดูหนาว (ในแถบยุโรป) จึงทำการศึกษาศึกษาการติดเชื้อ hMPV เฉพาะช่วงที่คาดว่าจะพบการติดเชื้อ แต่อัตราการติดเชื้อ hMPV มักจะน้อยกว่าไวรัสอื่นๆที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจโดยเฉพาะ hRSV ถึงแม้ว่า hRSV ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเด็ก แต่บางการศึกษาก็พบการอัตราการติดเชื้อ hMPV ที่เกือบเท่ากับการติดเชื้อ hRSV⁽³⁹⁾ และการค้นพบ hMPV ในหลายประเทศ ทำให้สรุปได้ว่า hMPV เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ แล้วยังสามารถพบได้ทั่วโลกเช่นเดียวกับ hRSV อีกด้วย และจากการศึกษาเบื้องต้นของคุณะผู้ทำวิจัยในประเทศไทย พบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กเท่ากับ 4.2%⁽⁴⁰⁾

ช่วงการระบาดของ hMPV

ช่วงการระบาด (seasonal distribution) ของการติดเชื้อ hMPV ยังคงเป็นที่ศึกษา เนื่องจากการรายงานในแต่ละประเทศยังคงแตกต่างกันออกไป แถบยุโรป, อเมริกาและออสเตรเลียมักพบการติดเชื้อ hMPV ในฤดูหนาวถึงต้นฤดูใบไม้ผลิ คือ ตั้งแต่เดือนธันวาคมถึงเดือนเมษายน^(30, 35, 37, 39, 41-47) ในทางตรงกันข้ามในฮ่องกงซึ่งเป็นแถบเอเชียเหมือนประเทศไทย พบการติดเชื้อ hMPV ในช่วงต้นฤดูร้อน คือ ตั้งแต่เดือนเมษายนไปจนถึงกรกฎาคม⁽³⁶⁾

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการตรวจพบ hMPV ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในประเทศต่างๆ

ประเทศ	กลุ่มอายุ	ช่วงที่ตรวจ	จำนวนเดือน	จำนวนที่ตรวจ	จำนวนที่พบ	อัตราการพบ (%)	gene ที่ใช้ในการตรวจ	อ้างอิง
เยอรมนี	0-2 ปี	ม.ค. - พ.ค.	4	63	11	17.5	N, L	45
ออสเตรเลีย 1*	0-3 ปี	มี.ค. - ต.ค.	7	329	32	9.7	N	58
สเปน*	0-3 ปี	พ.ย. - ก.พ.	3	147	6	4.1	F	47
		พ.ย. - ก.พ.	3					
ฝรั่งเศส*	เด็ก	พ.ย. - มี.ค.	4	337	19	6.6	N	44
		พ.ย. - ก.พ.	3					
อังกฤษ 1*	ทุกช่วงอายุ	ต.ค. - มี.ค.	5	405	9	2.2	L	41
แคนาดา 1	0-3 ปี	ธ.ค. - เม.ย.	4	208	12	5.8	N, F	50
แคนาดา 2	ทุกช่วงอายุ	ต.ค. - เม.ย.	6	447	66	14.8	F	46
สหรัฐอเมริกา 1	ผู้ใหญ่ (มีอาการ)	พ.ย. - เม.ย.	5	984	44	4.5	N, F	39
	ผู้ใหญ่ (ไม่มีอาการ)			217	9	4.1		
สหรัฐอเมริกา 2	0-5 ปี	ต.ค. - ก.พ.	4	296	19	6.4	F	42
ฟินแลนด์	4-13.5 ปี	ก.ย. - พ.ค.	8	132	10	9	L	43
บราซิล	0-3 ปี	เม.ย. - พ.ค.	1	111	27	24.3	N, F, M	49

หมายเหตุ - * คือ ประเทศที่ทำการศึกษาความชุกของ hMPV โดยเลือกตัวอย่างที่ให้ผลลบกับไวรัสที่เป็นที่รู้จัก

การติดเชื้อ hMPV ร่วมกับเชื้ออื่น

การติดเชื้อ hMPV ร่วมกับการติดเชื้ออื่น โดยเฉพาะร่วมกับเชื้อ hRSV นั้น พบว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เด็กเกิดอาการหลอดลมฝอยอักเสบที่รุนแรงขึ้น⁽⁴⁸⁾ ในทางตรงกันข้ามการศึกษาหนึ่งของประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า การติดเชื้อ hMPV ร่วมกับเชื้ออื่นไม่ส่งผลให้เกิดความรุนแรงของอาการ⁽³⁴⁾

บางการศึกษาพบว่า การระบาดของ hMPV มีช่วงเดียวกับการระบาดของ hRSV^(36-37, 42, 44-46, 49) แต่บางการศึกษาไม่เป็นเช่นนั้น^(43, 50) เพราะฉะนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบการติดเชื้อร่วม (coinfection) กับ การติดเชื้อ hRSV^(34-35, 37, 39, 42, 45-46) แต่บางการศึกษาพบการติดเชื้อ hMPV ร่วมกับการติดเชื้อ influenza^(35, 37, 39, 42, 46, 50), cytomegalovirus⁽⁴²⁾ และ Adenovirus⁽³⁶⁻³⁷⁾ นอกจากนี้ยังสามารถพบการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรียได้ เช่น ติดเชื้อร่วมกับ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*⁽³⁵⁾ ได้อีกด้วย

อาการและอาการแสดงของผู้ติดเชื้อ hMPV

จากการศึกษา hMPV ในหลายประเทศ พบว่า hMPV ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจมักจะได้รับวินิจฉัยเป็นหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis)^(34-35, 42, 43-45, 51-52) และปอดอักเสบ (pneumonia)^(35-36, 45)

อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV คล้ายกับการติดเชื้อไวรัส โดยเฉพาะ hRSV คือ มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน เช่น ตั้งแต่อาการเล็กน้อย เช่น ไอ, มีไข้, หายใจลำบาก ไปจนถึงอาการรุนแรงและต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ และไม่สามารถแยกอาการของผู้ที่ติดเชื้อ hMPV ออกจากผู้ที่ติดเชื้อ hRSV ได้^(30, 35, 39, 43-44, 48-49) การศึกษาในประเทศอังกฤษ⁽⁴¹⁾ ก็พบการรายงานการติดเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อในระบบหายใจคล้ายกับการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza-like illness) โดยผู้ป่วยที่ทำการศึกษามีไข้, ไอ และปวดกล้ามเนื้อน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 วัน บางการศึกษากล่าวว่าการอาการของการติดเชื้อ hMPV ก็ไม่สามารถแยกออกจากอาการของการติดเชื้อ influenza A ได้เช่นกัน^(46, 50)

อาการและอาการแสดงของการติดเชื้อ hMPV ในเด็ก, ผู้ใหญ่ และในผู้สูงอายุ (ผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี) นั้นคล้ายกัน คือ ผู้ที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจมักสัมพันธ์กับการมีไข้^(35-36, 42), ไอ^(34-36, 39, 41-42, 50) และมีแนวโน้มการไอ⁽³⁹⁾ และหอบหายใจลำบาก^(35, 37) มากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hRSV ในการศึกษาของประเทศฟินแลนด์⁽⁴³⁾ พบว่าการหายใจเสียงดังก็เป็นอาการที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ hMPV โดยสรุปการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าการไอและมีไข้ มักมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจ แต่มีรายงานหนึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽³⁹⁾ กล่าวว่า การติดเชื้อ hMPV ไม่สัมพันธ์กับการมีไข้

การติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจนั้นอาจไม่ทำให้เกิดอาการได้ (asymptomatic) เช่น การศึกษาการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในเด็กและผู้ใหญ่ในประเทศสหรัฐอเมริกา^(34, 39) โดยการทำให้ RT-PCR พบว่ามีน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR แต่ผู้ที่ติดเชื้อ hMPV นั้น ไม่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแต่อย่างใด นอกจากนั้นในผู้ป่วยเด็กบางรายได้เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลด้วยอาการอื่นโดยไม่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลด้วยอาการท้องเสีย⁽³⁶⁾ หรือท้องเสียร่วมกับมีไข้สูง⁽⁴⁴⁾ แต่การวินิจฉัยน้ำล้างโพรงหลังจมูกจากห้องปฏิบัติการพบว่าให้ผลบวกกับ hMPV โดยการทำให้ RT-PCR

อัตราการเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจนั้นยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน เนื่องจากผู้ป่วย 6 รายที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV แล้วเสียชีวิต แต่ไม่ได้ทำการชันสูตรศพ รายละเอียดของผู้ที่เสียชีวิตมีดังนี้

1. ผู้ป่วยเด็กหญิงอายุ 7 เดือน 1 คน เป็นโรค acute lymphoblastic leukemia⁽⁵²⁾
2. ผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี 1 คน⁽³⁵⁾
3. ผู้ป่วยผู้ใหญ่อายุ 33 ปี 1 ราย เป็นโรค acute lymphoblastic leukemia⁽⁵³⁾
4. ผู้ป่วยผู้ใหญ่อีก 1 ราย ที่ไม่มีโรคประจำตัวใดๆ⁽³⁹⁾
5. ผู้ป่วยอายุมากกว่า 65 ปี 1 คน เป็น leukemia แล้วยังพบการติดเชื้อในระบบหายใจร่วมกับ *Stenotrophomonas maltophilia*⁽³⁵⁾
6. ผู้ป่วยอายุมากกว่า 65 ปี 1 คน มีโรคประจำตัว คือ Alzheimer⁽³⁵⁾

สรุปแล้วการติดเชื้อ hMPV นั้นสามารถพบได้ทุกช่วงอายุ อาการและอาการแสดงของการติดเชื้อ hMPV นั้นคล้ายกับการติดเชื้อ hRSV บางการศึกษารายงานว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการติดเชื้อ hMPV ในช่วงอายุต่างๆ แต่การติดเชื้อ hMPV จะทำให้ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี และผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 50 ปี มีความเสี่ยงที่จะมีอาการรุนแรงและเข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลมากกว่าผู้ป่วยกลุ่มอื่น⁽⁴⁶⁾

hMPV กับการมีโรคประจำตัวและผู้ที่ได้รับ การรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน

พบว่าในผู้ป่วยเด็กที่มีประวัติการคลอดก่อนกำหนดหรือมีโรคประจำตัว เช่น โรคหัวใจหรือโรคปอด, ผู้ป่วยที่ได้รับ การรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับ การเปลี่ยนถ่ายอวัยวะหรือเป็นโรคมุมคุ้มกันบกพร่อง มีความเสี่ยงที่จะเกิดการติดเชื้อ hMPV รุนแรงกว่าคนปกติ เช่น การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽⁴²⁾ พบว่าเกือบ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV จะมีประวัติของการคลอดก่อนกำหนด หรือเป็นโรคหัวใจ และการศึกษาผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปีในประเทศแคนาดา⁽³⁵⁾ พบว่า 4 ใน 12 รายที่พบการติดเชื้อ hMPV นั้นคลอดก่อนกำหนดหรือมีโรค

ประจำตัว แล้วยังพบการติดเชื้อ hMPV ซ้ำในช่วง 1 ปีในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันในประเทศแคนาดา⁽⁵²⁾

นอกจากนั้นมีการรายงานการติดเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มีโรคประจำตัวหรือได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันในประเทศแคนาดา⁽⁵⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีการรายงานในผู้ป่วยอายุ 33 ปี 1 รายในประเทศอังกฤษ⁽⁵³⁾ ที่เป็น ALL ที่ต้องรับการปลูกถ่ายไขกระดูกอีกด้วย

การติดเชื้อซ้ำ

พบการติดเชื้อ hMPV ซ้ำ (reinfection) ในผู้ป่วยรายหนึ่งที่มีประวัติการใช้ยากดภูมิคุ้มกันจากการเป็น acute lymphoblastic leukemia ในประเทศแคนาดา⁽⁵²⁾ ผู้ป่วยรายนี้ได้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในพ.ศ. 2541 และปีต่อมาก็ได้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลอีกครั้งด้วยการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจอีกครั้ง แต่ต่างสายพันธุ์

นอกจากนั้นในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽³⁴⁾ ได้ติดตามผู้ป่วยจำนวนหนึ่งตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 5 ปี พบผู้ป่วย 3 รายที่มีการติดเชื้อ hMPV ซ้ำ เด็กทั้ง 3 รายนี้พบว่าได้ติดเชื้อ hMPV ครั้งแรกเมื่ออายุน้อยกว่า 6 เดือน และเมื่ออายุ 1-3 ปีได้พบการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจอีกครั้งหนึ่ง

จากการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁰⁾ พบว่าในผู้ที่มีอายุมากกว่า 5 ปีทุกรายจะมีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อ hMPV ในซีรัม นั่นคือ ในวัยเด็กทุกคนจะติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจมาแล้ว แต่อาการและอาการแสดงอาจแตกต่างกันออกไป ตั้งแต่ไม่มีอาการไปจนถึงอาการรุนแรง และในการศึกษาบางการศึกษาที่พบการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในผู้ใหญ่⁽³⁹⁾ แสดงว่าการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจซ้ำสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดชีวิต แต่ปัจจัยหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ hMPV ซ้ำในผู้ใหญ่ คือ ในการศึกษาการติดเชื้อ hMPV ในผู้ใหญ่ในสหรัฐอเมริกา⁽³⁹⁾ พบว่าผู้ใหญ่ที่ให้ผลบวกกับ hMPV มีประวัติการสัมผัสกับเด็ก

การติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจเข้าสู่อินในโรงพยาบาล

ในการศึกษาผู้ป่วยเด็กในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽³⁹⁾, ฝรั่งเศส⁽⁴⁴⁾ และฮ่องกง⁽³⁶⁾ พบว่าเด็กที่พบการติดเชื้อ hMPV เข้าสู่อินเหล่านี้ได้เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลด้วยโรคที่ไม่ใช่การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ⁽⁴²⁾ หรือคลอดที่โรงพยาบาลแล้วยังไม่ได้ออกจากโรงพยาบาล⁽⁴²⁾ แต่หลังจากที่เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลระยะหนึ่ง เด็กเหล่านี้เกิดอาการที่บ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าเป็นการติดเชื้อ hMPV

การศึกษาในด้าน seroprevalence

การศึกษาในด้าน seroprevalence ในประชากรในประเทศอิสราเอล⁽⁵⁴⁾ และประเทศญี่ปุ่น⁽⁵⁵⁾ พบว่าเด็กที่มีอายุตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไปจะมีแอนติบอดีต่อ hMPV แล้วมากกว่า 50% แสดงว่าผู้ที่มีอายุมากกว่า 2 ปีมีโอกาสที่จะติดเชื้อ hMPV แล้ว 50% และการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁰⁾ ดังที่ได้กล่าวข้างต้น พบว่าเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปีจะมีแอนติบอดีต่อ hMPV แล้วทุกคน แสดงว่าเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปีนั้นเกิดการติดเชื้อ hMPV มาแล้วทั้งสิ้น แต่การศึกษาในประเทศญี่ปุ่นพบว่าเด็กที่มีอายุ 10 ปีขึ้นไปจึงจะพบแอนติบอดีต่อ hMPV ทุกคน

การรักษา

การรักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจนั้นเหมือนกับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจทั่วไป คือ มักหายได้เองโดยไม่ต้องรับการรักษา แต่หากผู้ป่วยบางรายมีอาการรุนแรงก็ควรได้รับการรักษาตามอาการ เช่น ในการศึกษาของเนเธอร์แลนด์⁽³⁷⁾ พบว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV นั้น ต้องรักษาด้วยยาขยายหลอดลมมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hRSV

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV

จากการศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในหลายประเทศพบว่า hMPV มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ avian pneumovirus serotype C (APV-C) มากที่สุด เพราะการสร้างวงศัวานวิวัฒนาการ hMPV จะอยู่กึ่งเดียวกับ APV-C เสมอ⁽³¹⁾ จึงเป็นการยืนยันว่า hMPV เป็นไวรัสที่อยู่ในจีนัส *Metapneumovirus* และเป็นไวรัสที่ใกล้เคียงกับ APV-C มากที่สุด

ถึงแม้ว่า hMPV จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ APV-C มากที่สุด แต่ hMPV ก็ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีกได้⁽³⁰⁾ เนื่องจาก gene ที่น่าจะกำหนดความจำเพาะในการติดเชื้อ (host range) คือ attachment (G) gene และ small hydrophobic (SH) gene ไม่มีความใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตใดเมื่อใช้โปรแกรม BLAST ในส่วนของความใกล้เคียงกับไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์พบว่า hMPV มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ hRSV ซึ่งอยู่ในจีโนม *Pneumovirus* มากที่สุด แต่ hMPV ก็ไม่ได้มีการเรียงตัวของ genome เหมือนกับ hRSV ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น

การศึกษาสายพันธุ์ของ hMPV โดยการสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ในส่วน N, F, P, M และ L gene ในหลายประเทศพบว่า hMPV มี 2 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 3 ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 กลุ่มนี้ประมาณ 80% ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้ในแต่ละประเทศนั้นมีความใกล้เคียงกับ hMPV ที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้มากที่สุด รองลงมา คือ APV-C

ตารางที่ 3 แสดงผลการทำ phylogenetic analysis ในประเทศต่างๆ

ประเทศ	gene ที่ทำการศึกษา	ผลที่ได้	อ้างอิง
เนเธอร์แลนด์	N, F, L, M	2 สายพันธุ์	30, 31, 37
แคนาดา	N, F, L, P, M	2 สายพันธุ์	35, 56
สหรัฐอเมริกา	F	2 สายพันธุ์	39, 42, 57
อังกฤษ	L	2 สายพันธุ์	34, 41
ฝรั่งเศส	N	2 สายพันธุ์	44
เยอรมัน	N	2 สายพันธุ์	45
อิตาลี	L	2 สายพันธุ์	38
สเปน	F	2 สายพันธุ์	47
ฮ่องกง	L, F	1 ใน 2 สายพันธุ์	36

การศึกษาถึงความแตกต่างของ hMPV ทั้ง genome ในทั้ง 2 กลุ่ม⁽⁵⁷⁾ พบว่า hMPV ในแต่ละกลุ่มนั้นมีความยาวไม่เท่ากัน คือ กลุ่มที่ 1 มีความยาว 13,335 นิวคลีโอไทด์ และกลุ่มที่สองมีความยาว 13,280 นิวคลีโอไทด์ ซึ่ง G gene เป็น gene ที่มีความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์มากที่สุด คือ ในกลุ่มแรกมีความยาว 711 นิวคลีโอไทด์ ส่วนในกลุ่มที่สองมีความยาว 732 นิวคลีโอไทด์ จึงทำให้จำนวนโปรตีนในส่วนนี้แตกต่างกันมากที่สุด คือ ในกลุ่มแรกมีความยาวของกรดอะมิโนเท่ากับ 219 ในกลุ่มที่สองมีความยาวของกรดอะมิโนเท่ากับ 236 และในส่วน G gene นี้เองที่มีการรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้⁽³¹⁾ ว่าน่าจะเป็นส่วนที่กำหนดกลุ่มของ hMPV ได้อย่างชัดเจน และเป็น gene ที่กำหนด host range ของ hMPV และในการศึกษานี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อย คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นโปรตีนภายในของไวรัส คือ N, L, M2-1 และ M gene และ F gene ที่เป็นโปรตีนบนผิวไวรัส เพราะ gene ดังกล่าวมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 94% แต่ gene ในส่วน SH และ G gene เป็นส่วนที่มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด คือ 59% และ 37% ตามลำดับ และ 2 ส่วนนี้เป็นส่วนที่พบการแทนที่ของกรดอะมิโนมากที่สุดด้วย

โดยสรุปแล้ว hMPV เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่างเป็นที่มียูเดิมแต่เพิ่งมีการวินิจฉัยพบด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาในปัจจุบัน การศึกษา hMPV ในหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่ามีข้อจำกัดหลายประการ เช่น บางการศึกษาได้ทำการศึกษาการติดเชื้อ hMPV เฉพาะผู้ป่วยที่ทำการตรวจกรองไวรัสหรือแบคทีเรียที่เรื้อรังแล้วให้ผลลบ แต่ไม่ได้ทำการศึกษาในกลุ่มที่ให้ผลบวกด้วย เพราะฉะนั้นจึงไม่สามารถทราบถึงการติดเชื้อร่วม หรือจากที่ผู้ป่วยได้เสียชีวิตนั้นไม่ได้ทำการชันสูตรศพ จึงไม่ทราบว่า hMPV ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อนั้นเป็นสาเหตุของความรุนแรงที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตหรือไม่ เพราะฉะนั้นการศึกษาคัดเชื้อ hMPV ในด้านต่างๆ เพิ่มเติม จะเป็นการยืนยันและให้ผลที่ถูกต้องตรงกันมากขึ้นด้วย

จากการที่พบ hMPV ในหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทย⁽⁴⁰⁾ แล้วยังสามารถพบการติดเชื้อ hMPV ได้ในประเทศอิสราเอล⁽⁵⁴⁾ ซึ่งเป็นประเทศที่เป็นเขตทะเลทราย ทำให้สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า hMPV นั้นเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอย่างแท้จริงและสามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง นอกจากนั้นสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทุกช่วงอายุแต่จะทำให้เกิดอาการที่รุนแรงในผู้ป่วยเด็กและผู้ป่วยวัยชรา ถึงแม้ว่าอาการของการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจนั้นยังไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าอาการของการติดเชื้อ hMPV นั้นคล้ายกับอาการของการติดเชื้อ hRSV ในระบบทางเดินหายใจ และสายพันธุ์ของ hMPV ที่พบนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์เช่นเดียวกับ hRSV ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเช่นกัน

ในปัจจุบันยังคงมีการศึกษา hMPV ไม่มากนัก เพราะฉะนั้นการศึกษาถึงรายละเอียดของ hMPV ในด้านต่างๆอาจเป็นประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยให้ทันทั่วถึง แต่ยังเป็นแนวทางในการป้องกันโรคที่อาจเกิดขึ้นจากการพัฒนาวัคซีนอีกด้วย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive research)

ประชากรศึกษา

เป็นผู้ป่วยเด็กอายุ 0-15 ปีที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งส่วนล่าง และไม่มีประวัติเป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือกำลังได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยทุกคนได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกตั้งแต่วันที่ 22 มีนาคม พ.ศ. 2544 ถึงวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2546 จำนวน 227 คน การเก็บน้ำล้างโพรงจมูกจากเด็กทุกคนได้รับการขออนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ปกครอง และการศึกษาในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

การเก็บตัวอย่าง

กุมารแพทย์เฉพาะทางโรกระบบทางเดินหายใจจะเป็นผู้เก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูก (Nasopharyngeal suction: NP) โดยวิธี Negative pressure suction โดยมีวิธีเก็บ ดังนี้⁽⁵⁹⁾

1. ใช้ Mucus extractor หรือ De Lee Suction Catheter (รูปที่ 7) โดยให้ด้านหนึ่งสอดลงในจมูก โดยสอดให้ถึงตำแหน่ง posterior pharynx ของผู้ป่วย และปลายอีกด้านหนึ่งต่อกับ suction pump
2. ปรับความดันของ suction pump ให้เหมาะสม แล้วใช้น้ำที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร ชะล้างสารคัดหลั่งจากโพรงหลังจมูกผู้ป่วย
3. จากนั้นนำน้ำล้างโพรงหลังจมูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะตรวจหา hMPV



รูปที่ 7 แสดง mucus extractor ที่ใช้ในการเก็บน้ำโพรงหลังจมูก

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1. Pipette tip : 10 ul, 200 ul และ 1,000 ul (Elkay , Ireland)
- 1.2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)
- 1.3. Polypropylene conical tube : 15 ml และ 50 ml (Elkay , Ireland)
- 1.4. Beaker : 50 ml, 1000ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA.)
- 1.5. Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA.)
- 1.6. Reagent bottele : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.7. Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA.)
- 1.8. Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- 1.9. Thermometer (Precision , Germany)
- 1.10. Parafilm (American National Can, USA)
- 1.11. Plastic wrap
- 1.12. Stirring-magnetic bar
- 1.13. sequence ABI 310 kit (Perkin-Elmer, USA.)
- 1.14. Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 1.15. Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

2. อุปกรณ์

- 2.1 Automatic adjustable micropipette : P2 (0.1-2 ul), P10 (0.5-10 ul), P20 (5-20 ul)
- 2.2 P100 (20-100ul), P1000 (0.1-1 ml) (Eppendorf, Germany)
- 2.3 Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)
- 2.4 Vortex muxer (Scientific industry, USA)
- 2.5 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.6 Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)
- 2.7 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- 2.8 Thermal cycle (Eppendorf, Germany)
- 2.9 Thermal cycle Gradient (Eppendorf, Germany)
- 2.10 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.11 Multi-block heater (Lab-Lime Instrument Inc., USA)
- 2.12 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.13 Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)
- 2.14 Thermal paper (Bio-RAD, USA)
- 2.15 Refrigerator 4⁰ c (Misubishi, Japan)
- 2.16 Freezer -20⁰C (Sanyo, Japan)
- 2.17 Freezer -70⁰C (Forma Scientific, USA)
- 2.18 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)
- 2.19 ABIPRISMTM 310 Genetic (Perkin-Elmer, USA)

สารเคมีที่ใช้

1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)
- 1.2 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)
- 1.3 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)
- 1.4 Boric acid (USB, Hong kong)
- 1.5 Disodium ethylenediamine tetracetic acid : EDTA (USB, Hong kong)
- 1.6 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
- 1.7 Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)
- 1.8 Sucrose (USB, Hong kong)
- 1.9 Tris base (USB, Hong kong)
- 1.10 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)

2. สารเคมีสำหรับการสกัด RNA (RNA extraction)

- 2.1 Rneasy mini kit (QiaGen, USA)

3. สารเคมีสำหรับการทำ cDNA

- 3.1 5 x buffer (Promega, USA)
- 3.2 Rnase Inhibitor (Promega, USA)
- 3.3 Multireverse transcriptase (Promega, USA)
- 3.4 Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs (Pharmacia, Sweden)
- 3.5 Oligonucleotide primers (BSU)

4. สารเคมีสำหรับการทำ PCR

- 4.1 Eppendorf MasterMix (2.5x)(Eppendorf, USA)

5. สารเคมีสำหรับการทำให้ผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

- 5.1 Perfect Gel Cleanup (Eppendorf, USA)

6. สารเคมีสำหรับการทำ DNA sequencing

- 6.1 BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing RR-100 (Perkin-Elmer, USA)
- 6.2 BigDye terminator v.3.1 cycle 5x buffer (Perkin-Elmer, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

Positive control

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่มี positive control ของ hMPV เพราะฉะนั้นจึงต้องทำการสุ่มเลือกตัวอย่างที่มีอาการ, อาการแสดง และช่วงอายุที่เสี่ยงต่อการพบการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจ จากการศึกษาก่อนหน้านี้⁽³⁰⁾ พบว่าเด็กที่พบการติดเชื้อ hMPV จะมีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจคล้ายกับการติดเชื้อ hRSV และจะมีอายุน้อยกว่า 5 ปี และเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปีจะมีแอนติบอดีต่อ hMPV แล้วทุกคน เพราะฉะนั้นว่าเด็กที่อายุน้อยกว่า 5 ปีจะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ hMPV มากกว่าประชากรกลุ่มอื่น และในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกจากผู้ป่วยเด็กที่มีอาการของการติดเชื้อคล้ายกับ hRSV อยู่แล้ว เพราะฉะนั้นจึงเลือกเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี เพื่อสุ่มหา positive control

จากนั้นนำน้ำล้างโพรงหลังจมูกของเด็กที่สุ่มได้สกัด RNA ในส่วน N gene และเพิ่มจำนวน hMPV ตามวิธีทำด้านล่าง จนกว่าจะได้น้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวก หลังจากเพิ่มปริมาณไวรัสในน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อยืนยันผลว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast เมื่อได้น้ำล้างโพรงหลังจมูกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น hMPV ในส่วน N gene แล้วจึงนำใช้ล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกนั้นเป็น positive control

Negative control

เนื่องจาก hMPV เป็น RNA ไวรัส เพราะฉะนั้น Negative control ในการศึกษานี้ คือ น้ำที่ปราศจากเอนไซม์ย่อย RNA (Rnase) คือ Diethyl pyrocarbonate (DEPC) water ที่มีปริมาตรเท่ากับ cDNA หรือ DNA target ที่ใช้ในการทดลอง

Internal control

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถสกัด RNA ได้จริง ในการศึกษานี้จึงได้เลือกใช้ RNA ที่มีอยู่ในเซลล์ปกติทุกเซลล์เพื่อเป็นการยืนยันผลการสกัดว่าการให้ผลลบกับการทำ RT-PCR ของ hMPV ให้เป็นผลลบจริง ไม่ใช่จากการสกัดไม่ได้ RNA เพราะการสกัด RNA ในเซลล์ที่มีอยู่ในเซลล์ปกติทุกเซลล์นั้นจะให้ผลบวกเสมอ หากให้ผลลบจะสามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่าไม่สามารถสกัด RNA ได้ และในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ mRNA ของ β -actin เพราะเซลล์ทุกเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์กล้ามเนื้อจะมีโปรตีน β -actin อยู่มากเพื่อทำหน้าที่ในการรักษาสภาพของเซลล์และการเคลื่อนไหวของเซลล์แบบ amoeboid movement ในกรณีของ hMPV จะเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์เยื่อผิว (epithelial cell) ของระบบทางเดินหายใจ ซึ่งเซลล์เหล่านี้ก็สามารถพบ β -actin ได้เช่นกัน เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ β -actin ที่เป็น mRNA เป็น internal control เพื่อยืนยันว่าสามารถสกัด RNA ได้จริง จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณของ β -actin mRNA ด้วยวิธี reverse transcriptase - polymerase chain reaction การเพิ่มปริมาณ β -actin RNA ต้องให้ผลบวกเสมอ หากการเพิ่มปริมาณ RNA ของ hMPV

ให้ผลลบ และการเพิ่มปริมาณ RNA ของ β -actin ให้ผลลบเช่นกัน จะต้องทำการสกัด RNA ใหม่ เพราะไม่สามารถสกัด RNA ได้

การออกแบบ Primers

การศึกษาคั้งนี้จะตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกทุกรายโดยการเพิ่มจำนวน hMPV ทั้งหมด 3 gene และ β -actin อีก 1 gene ดังนี้

1. hMPV ส่วนนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein: N) – จะตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV โดยใช้การเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วนนี้ด้วยวิธี nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) การออกแบบ primer อาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้านี้จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337)
2. hMPV ส่วนฟิวชั่น (fusion: F) – จะทำการเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วน F gene เฉพาะน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับ N gene ด้วยวิธี seminested polymerase chain reaction (seminested-PCR) การออกแบบ primers ในส่วนนี้จะใช้ primers คู่ใน (inner forward และ inner reverse) จากการศึกษของประเทศแคนาดา⁽⁵⁶⁾ ส่วน primer เส้นนอก (outer forward) จะทำการออกแบบเอง
3. hMPV ส่วนโพลีเมอเรส (polymerase: L) – จะทำการเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วน L gene เฉพาะน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับ N gene ด้วยวิธี seminested polymerase chain reaction (seminested-PCR) ในยีนส่วนนี้ การออกแบบ primers ในส่วนนี้จะใช้ primers คู่ใน (inner forward และ inner reverse) จากการศึกษของประเทศเนเธอร์แลนด์(net1) ส่วน primer เส้นนอก (outer forward) จะทำการออกแบบเอง
4. β -actin gene – β -actin gene อยู่บนโครโมโซม 7p15-p12 genonic DNA มีความยาว 4235 bp และ mRNA มีความยาว 3435 bp β -actin gene ประกอบไปด้วย 6 exon โดยมีตำแหน่งของแต่ละ exon ดังตารางที่ 4 การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาหา RNA virus เพราะฉะนั้น internal control ที่ใช้จะต้องเป็น RNA เช่นกัน การออกแบบ primer ให้ forward primer และ reverse primer อยู่ต่าง exon กัน เพื่อให้สามารถแยกผลผลิตของ genonic DNA และ mRNA ของ β -actin ออกจากกันได้จากขนาดของผลผลิต การศึกษาคั้งนี้ได้ใช้ primer จากการศึกษาก่อนหน้านี้⁽⁶⁰⁾ ในการศึกษา forward primer อยู่บน exon ที่ 4 และ reverse primer อยู่บน exon ที่ 6 ผลผลิตของ β -actin mRNA ที่ได้จะมีความยาว 606 bp หากเป็น genonic DNA ของ β -actin จะมีความยาว 895 bp

ตารางที่ 4 แสดงตำแหน่งและความยาวของ β -actin ในแต่ละ exon

Exon	ตำแหน่ง	ความยาว (bp)	ความยาว intron (bp)
1	4865826-4865903	77	exon 1-2 = 861
2	4864837-4864965	128	exon 2-3 = 135
3	4864463-4864702	239	exon 3-4 = 442
4	4863583-4864021	438	exon 4-5 = 96
5	4863306-4863487	181	exon 5-6 = 193
6	4862453-4863193	740	

การตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV โดยการเพิ่มจำนวนไวรัสในยีนส่วนนิวคลีโอโปรตีน

การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

ใช้น้ำล้างโพรงหลังจมูกปริมาณ 100 μ l ในการสกัด RNA ด้วย Rneasy Mini Kit หลังจากสกัด RNA ด้วย Rneasy Mini Kit แล้วจะได้ปริมาณ RNA ที่ละลายน้ำปริมาณ 30 μ l จากนั้นจะแบ่งน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่สกัดได้ออกเป็น 2 หลอด หลอดละ 10 μ l เพื่อนำไปใช้ในการเปลี่ยน RNA ให้เป็นคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (cDNA) ของ hMPV ในส่วน N gene 1 หลอดและ mRNA ของ β -actin gene อีก 1 หลอด

การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (cDNA synthesis)

การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน hMPV N gene และ mRNA ของ β -actin gene โดยใส่สารตามตารางที่ 5 หลังจากใส่สารตามตารางเรียบร้อยแล้ว incubate ที่ 65 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมที่ใส่ในการทำ cDNA synthesis ของ hMPV N gene และ β -actin gene

สารละลาย	ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNA แต่ละยีน (ปริมาณต่อ 1 หลอด)	
	N gene	β -actin
DEPC water	5.8 μ l	5.8 μ l
5 x buffer	2 μ l	2 μ l
10 mM dNTP	3 μ l	3 μ l
MPVP R primer (10pmol)	1 μ l	-
β -actin R primer (10 pmol)	-	1 μ l
Rnase Inhibitor	0.5 μ l	0.5 μ l
multireverse transcriptase	1 μ l	1 μ l
Total volume	13.3 μ l	13.3 μ l

การเพิ่มจำนวนไวรัสในส่วน N gene และ β -actin โดยใช้วิธี polymerase chain reaction

เพิ่มปริมาณ hMPV ในส่วน N gene โดยใช้วิธี nested-PCR และเพิ่มปริมาณ β -actin mRNA ใช้วิธี PCR โดยใส่สารตามตารางที่ 7 จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมดใส่ในเครื่อง thermal cycler (eppendorf) โดยมีอุณหภูมิตามตารางที่ 8 และดูผลผลิตจากการทำ PCR ได้โดยการนำผลผลิตที่ได้ประมาณ 10 μ l ผสมกับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมของ 1.5 % agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ marker 100 bp จะได้ขนาดของผลผลิตดังตารางที่ 5 จากนั้นนำ gel แช่ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงรายละเอียดของ primers แต่ละเส้น

ยีน	primer	ลำดับเบส	ตำแหน่ง	ความยาว (bp)	Tm (°C)	%GC	product size	แหล่งที่มา
N	outer forward primer (MPVP F)	5' ACGGGGTAGAGAAGAGCTGG 3'	389-408	20	64	60	259 bp	ออกแบบเอง
	outer reverse primer (MPVP R) *	5' GCAAAGTTGGGACAGTTGGC 3'	1004-985	20	62	55		ออกแบบเอง
	inner forward primer (MPVN F)	5' GCATCAACCATAGAAGTGGGAC 3'	556-577	22	64	45		ออกแบบเอง
	inner reverse primer (MPVN R)	5' GCATTGTTTGACCGCCCCA 3'	814-795	20	64	60		ออกแบบเอง
F	outer forward primer (MPVS F)	5' GATGTGGGTACAACAACCTGC 3'		20	60	50	450 bp	ออกแบบเอง
	inner forward primer (MPVF1f)	5' CTTTGGACTTAATGACAGATG 3'	3704-3724	21	58	38		*
	reverse primer (MPVF1r) *	5' GTCTTCCTGTGCTAACTTTG 3'	4153-4134	20	58	45		*
L	outer forward primer (MPVS L)	5' GCACTAAGTGAGAGATTTGGG 3'	11052-11072	21	62	47	171 bp	ออกแบบเอง
	inner forward primer (BF 44)	5' CATGCCCACTATAAAAAGGTCAG 3'	11336-11357	21	64	45		*
	reverse primer (BF 2) *	5' CACCCCAGTCTTTCTTGAAA 3'	11506-11486	20	58	45		*
β-actin	forward primer (β-actin F)	5' ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC 3'	591-615	25	82	64	606 bp	*
	reverse primer (β-actin R) *	5' AGCATTTGCGGTGCACGATGGAGGG 3'	1196-1162	25	80	60		*

หมายเหตุ - * คือ primers ที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA ให้เป็น cDNA (cDNA synthesis)

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ hMPV ในส่วน N gene และ β -actin gene

สารละลาย	N gene (volume/tube)		β -actin (volume/tube)
	1 ^o PCR	2 ^o PCR	
DEPC water	20 μ l	20 μ l	38.82 μ l
2.5 PCR master mix	20 μ l	20 μ l	5 μ l
MPVP F primer (10pmol)	1 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
MPVP R primer (10pmol)	1 μ l	-	-
MPVN F primer (10pmol)	-	1 μ l	-
MPVN R primer (10pmol)	-	1 μ l	-
β -actin F primer (10 pmol)	-	-	1 μ l
β -actin R primer (10 pmol)	-	-	1 μ l
cDNA Template/PCR product	5 μ l	3 μ l	5 μ l
Total volume	47 μ l	45 μ l	47 μ l

ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR ของ hMPV ในส่วน N gene และ β -actin

PCR Cycle	N gene		β -actin
	1 ^o PCR	2 ^o PCR	
Pre-denaturation	95 °C 2 min	95 °C 2 min	95 °C 2 min
Denaturation	95 °C 1 min	95 °C 1 min	95 °C 1 min
Annealing	45 °C 1 min	45 °C 1 min	60 °C 1 min
Extension	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min
	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ
Post-extension	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min

การเพิ่มปริมาณไวรัสในส่วน F gene และส่วน L gene

นำน้ำล้างโพรงหลังจุมูกที่ให้ผลบวกกับ hMPV ในส่วน N gene มาทำ semi-nested PCR ในส่วน F gene และ L gene เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลเพิ่มเติม และยังคงใช้ mRNA ของ β -actin gene เป็น internal control ในการยืนยันการสกัด RNA

การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

ใช้น้ำล้างโพรงหลังจุมูกปริมาณ 100 μ l ในการสกัด RNA ด้วย Rneasy Mini Kit หลังจากสกัด RNA ด้วย Rneasy Mini Kit แล้วจะได้ปริมาณ RNA ที่ละลายน้ำปริมาณ 30 μ l จากนั้นแบ่งเป็น 3 หลอด หลอดละ 10 μ l เพื่อนำไปใช้ในการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ของ hMPV ในส่วน F gene 1 หลอด, L gene 1 หลอดและ mRNA ของ β -actin gene อีก 1 หลอด

การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (cDNA synthesis)

การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วน F gene, และ hMPV L gene และ β -actin gene โดยใส่สารดังตารางที่ 9 เมื่อใส่สารตามตารางเรียบร้อยแล้ว incubate ที่ 65 °C 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที

ตารางที่ 9 แสดงส่วนผสมที่ใส่ในการทำ cDNA synthesis ของ hMPV F gene, hMPV L gene และ β -actin gene

สารละลาย	ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNA แต่ละยีน (ปริมาณต่อ 1 หลอด)		
	F gene	L gene	β -actin
DEPC water	5.8 μ l	5.8 μ l	5.8 μ l
5 x buffer	2 μ l	2 μ l	2 μ l
10 mM dNTP	3 μ l	3 μ l	3 μ l
MPVF1 r (10 pmol)	1 μ l	-	-
BF 2 (10 pmol)	-	1 μ l	-
β -actin R primer (10 pmol)	-	-	1 μ l
Rnase Inhibitor	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
Multireverse transcriptase	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Total volume	13.3 μ l	13.3 μ l	13.3 μ l

การเพิ่มจำนวนไวรัสในส่วน F gene, L gene และ β -actin โดยใช้วิธี polymerase chain reaction

เพิ่มปริมาณ hMPV ในส่วน F gene และ L gene โดยใช้วิธี semi-nested PCR โดยใส่สารดังตารางที่ 10 และ β -actin gene ใช้วิธี PCR โดยใส่สารดังตารางที่ 7 จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมดใส่ในเครื่อง thermal cycler (eppendorf) โดยมีอุณหภูมิของ F และ L gene ตามตารางที่ 10 และ β -actin ตามตารางที่ 11 จากนั้นดูผลผลิตที่ได้โดยการนำผลผลิตที่ได้ประมาณ 10 μ l ผสมกับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมของ 1.5 % agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ marker 100 bp จะได้ผลผลิตตามตารางที่ 5 จากนั้นนำ gel แช่ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc) เพื่อถ่ายภาพแถบ DNA

ตารางที่ 10 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ hMPV ในส่วน F gene และ L gene

สารละลาย	F gene (volume/tube)		L gene (volume/tube)	
	1 ^o PCR	2 ^o PCR	1 ^o PCR	2 ^o PCR
DEPC water	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
2.5 PCR master mix	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
MPVS F primer (10pmol)	1 μ l	-	-	-
MPVF1 f primer (10pmol)	-	1 μ l	-	-
MPVF1 r primer (10 pmol)	1 μ l	1 μ l	-	-
MPVS L primer (10 pmol)	-	-	1 μ l	-
BF 44 primer (10 pmol)	-	-	-	1 μ l
BF 2 primer (10 pmol)	-	-	1 μ l	1 μ l
cDNA Template/PCR product	5 μ l	1 μ l	5 μ l	3 μ l
Total volume	47 μ l	43 μ l	47 μ l	45 μ l

ตารางที่ 11 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR ของ hMPV ในส่วน F gene และ L gene

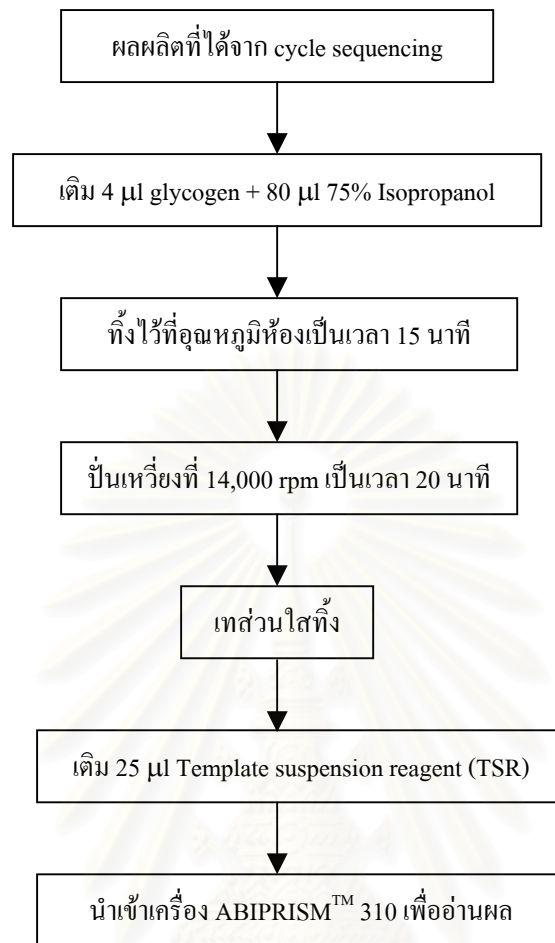
PCR Cycle	F gene		L gene	
	1 ^o PCR	2 ^o PCR	1 ^o PCR	2 ^o PCR
Pre-denaturation	95 °C 2 min	95 °C 2 min	95 °C 2 min	95 °C 2 min
Denaturation	95 °C 1 min	95 °C 1 min	95 °C 1 min	95 °C 1 min
-----	-----	-----	-----	-----
Annealing	45 °C 1 min	45 °C 1 min	45 °C 1 min	45 °C 1 min
-----	-----	-----	-----	-----
Extension	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min
-----	-----	-----	-----	-----
	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ
-----	-----	-----	-----	-----
Post-extension	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตัด gel ที่ให้ผลบวกกับ hMPV ทั้ง 3 ยีน คือ N, F และ L ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Perfect Gel Cleanup แล้วนำผลผลิตที่ได้เข้าสู่ cycle sequencing การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละ gene นั้นจะใช้ primers ทั้ง forward primer และ reverse primer เพื่อเปรียบเทียบการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 เส้น โดยใส่สารตามตารางที่ 12 และนำผลผลิตจาก cycle sequencing ที่ได้มาตกตะกอนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABIPRISM™ 310

ตารางที่ 12 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ใส่การทำ cycle sequencing

สารละลาย	ปริมาณสารที่ใส่ในแต่ละหลอด
DEPC water	5.33 µl
-----	-----
5 x buffer	2 µl
-----	-----
BigDye RR-100	4 µl
-----	-----
Primer คู่ใน forward หรือ reverse	0.8 µl
-----	-----
ผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	10 µl
-----	-----
Total volume	22.13 µl

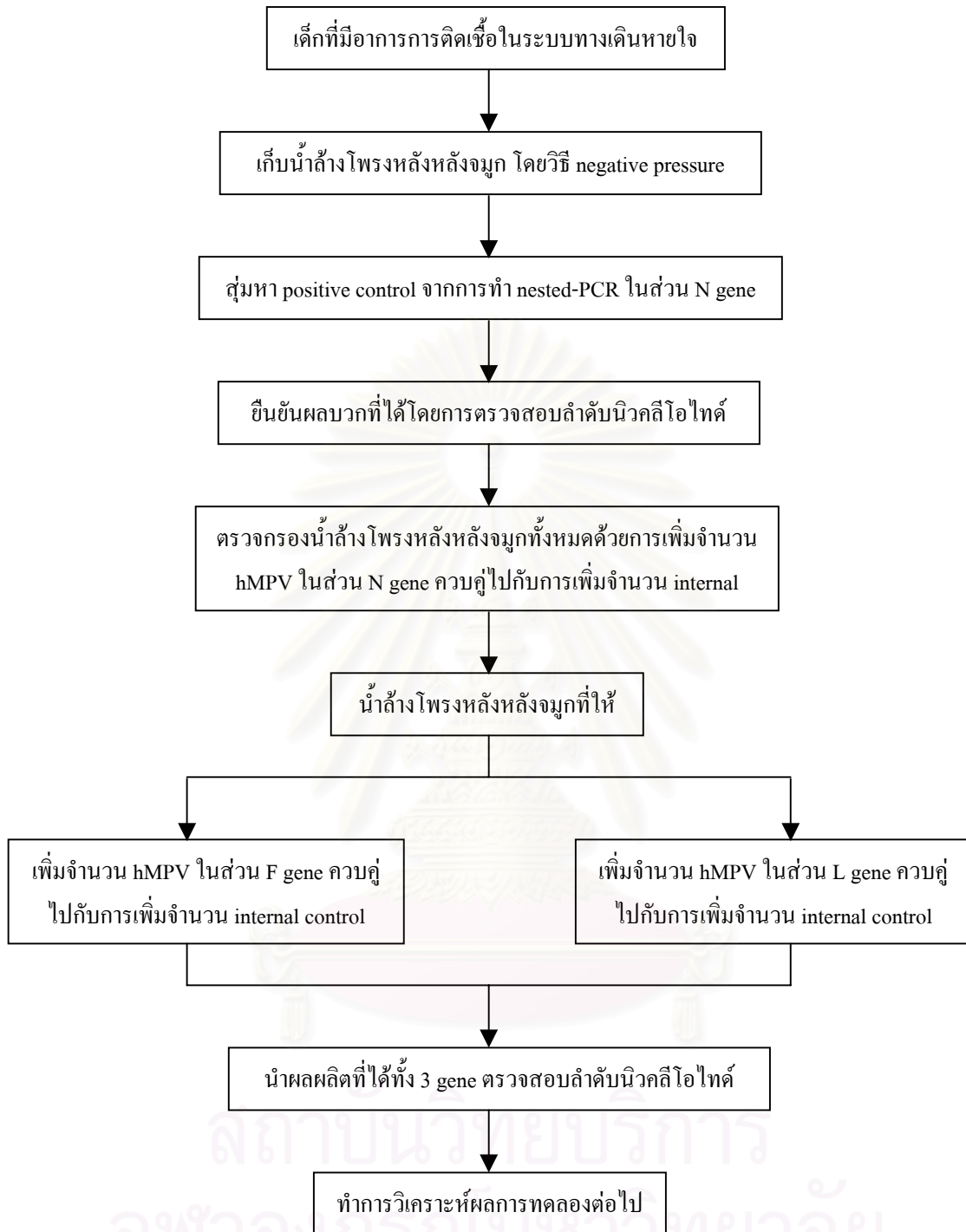


รูปที่ 8 แสดงขั้นตอนการตกตะกอนผลผลิตที่ได้จากการเข้า cycle sequencing

เมื่ออ่านผลแล้ว จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งจาก forward primer และ reverse primer อ่านเปรียบเทียบกัน โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก reverse primer จะทำการอ่านโดยทำการ reverse complementary ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการ reverse complementary แล้วอ่านเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งจาก forward primer โดยอาศัยโปรแกรม CLUSTAL X และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

การตรวจหา hRSV ในผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับ hMPV

จะทำการตรวจหาการติดเชื้อ hRSV ในผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับ hMPV RNA โดยการทำให้ RT-PCR ของ hRSV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกทุกราย วิธีทำตามขั้นตอนของการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้⁽⁶¹⁾



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. ข้อมูลน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมด
 - เพศ : แยกเพศหญิงและชายแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์
 - อายุ : แสดงเป็นแผนภูมิการกระจายของช่วงอายุต่างๆ
2. ข้อมูลน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่พบว่าติดเชื้อ hMPV
 - อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV : รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์
 - เพศ : แยกเพศชายและหญิงที่ติดเชื้อ hMPV แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์
 - อายุ : บันทึกช่วงอายุที่ติดเชื้อ hMPV แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและมัธยฐาน รวมถึงแสดงเป็นแผนภูมิการกระจายของช่วงอายุต่างๆ
 - ช่วงการระบาดของติดเชื้อ hMPV : แสดงเป็นแผนภูมิการเกิดการติดเชื้อ hMPV ในแต่ละเดือน
 - การติดเชื้อ hMPV ในแต่ละปี : แสดงเป็นจำนวนผู้ติดเชื้อ hMPV ในแต่ละปีและแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อ hMPV ในแต่ละปี เป็นรูปแบบตาราง
 - การติดเชื้อร่วมกับ hRSV : แสดงรายละเอียดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อร่วมกับ hRSV
 - อาการของผู้ที่ติดเชื้อ hMPV : สังเกตอาการส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้น
 - ข้อมูลทั่วไปของผู้ที่ติดเชื้อ hMPV : แสดงเป็นตารางรายละเอียดของผู้ที่ติดเชื้อ hMPV เช่น อายุ, เพศ, โรคประจำตัว, การวินิจฉัยจากแพทย์ เป็นต้น
3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน N, F และ L gene : เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer และ reverse primer เรียบร้อยแล้ว
 - ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
 - เพื่อให้เห็นความเหมือนหรือความแตกต่างอย่างชัดเจนของลำดับนิวคลีโอไทด์ จะใช้โปรแกรม CLUSTAL X เพื่อเปรียบเทียบที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่มีการศึกษาจากประเทศอื่นและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C
 - ทำการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง N, F และ L gene โดยอาศัยการคำนวณด้วยวิธี Distance matrix method และทำการสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ Neighbour-joining method จากโปรแกรม PHYLIP 95 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน N, F และ L gene ที่มี

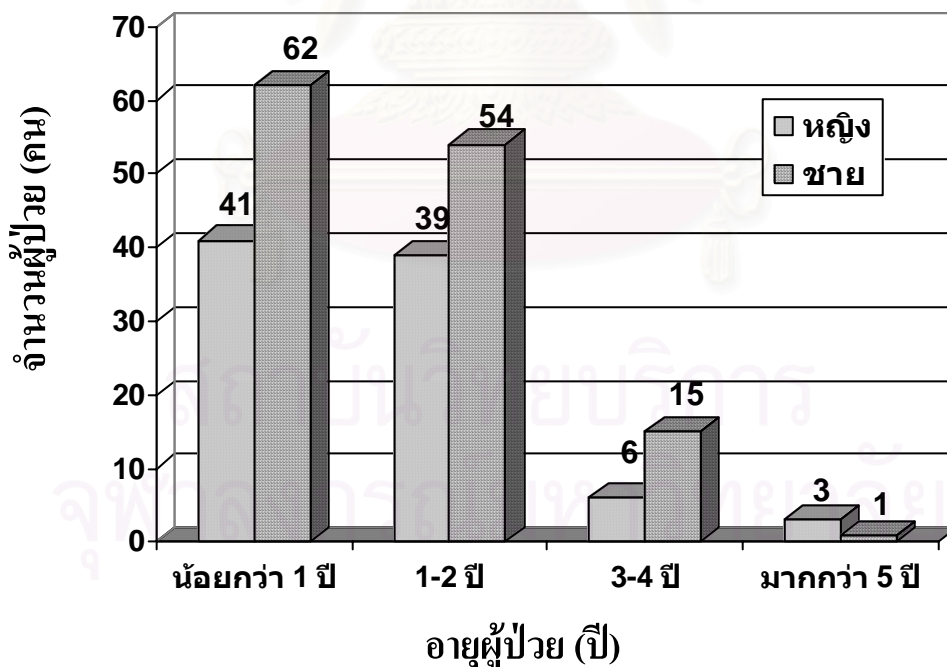
การศึกษาก่อนหน้านี้ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C หรือ APV-A

- ทำการหา % nucleotide similarity เปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กันเอง รวมถึงทำการเปรียบเทียบ % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากประเทศอื่นด้วยโดยใช้ Pairwise alignment จากโปรแกรม GeneDoc
4. เมื่อทำการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ทั้งในส่วน N, F และ L gene แล้ว จึงทำการวิเคราะห์ผล ดังนี้
- ทำการทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
 - เพื่อให้เห็นความเหมือนหรือความแตกต่างอย่างชัดเจนของลำดับกรดอะมิโน จะใช้โปรแกรม CLUSTAL X เพื่อเปรียบเทียบที่ลำดับกรดอะมิโนได้จากการศึกษาในครั้งนี้ กับลำดับกรดอะมิโนของ hMPV จากประเทศอื่น และลำดับกรดอะมิโนของ APV-C

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกจากเด็กจำนวน 236 คน ที่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันที่มีช่วงอายุตั้งแต่ 0-15 ปี จำนวน 227 คน แบ่งเป็นเด็กชาย 136 คน (59.9%) และเป็นเด็กหญิง 90 คน (39.6%) และเด็กไม่ทราบข้อมูล 1 คน (0.4%) รวมถึงเด็กจำนวน 8 คน ที่เข้ารับการรักษามากกว่า 1 ครั้ง แบ่งเป็นเด็กจำนวน 7 คนที่เข้ารับการรักษาก่อน 2 ครั้ง และเด็กอีก 1 คนที่เข้ารับการรักษาก่อน 3 ครั้ง อายุผู้ป่วยที่เก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกแบ่งเป็น ผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปีจำนวน 103 คน (45.4%), ผู้ป่วยเด็กที่มีช่วงอายุ 1-2 ปีจำนวน 93 คน (41%), ผู้ป่วยเด็กที่มีช่วงอายุ 3-4 ปีจำนวน 21 คน (9.3%), ผู้ป่วยเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปีจำนวน 4 คน (1.8%) และผู้ป่วยเด็กที่ไม่ทราบอายุ 5 คน (2.2%) (รูปที่ 10) ผู้ป่วยเด็กทุกคนได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่วันที่ 22 มีนาคม พ.ศ. 2544 ถึงวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2546 และผู้ป่วยทุกรายได้รับการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกโดยการทำ RT-PCR ในส่วน N gene และ β -actin gene



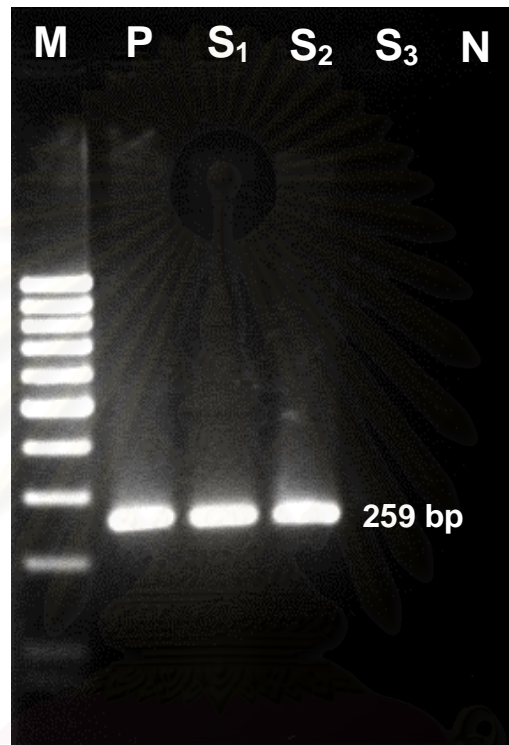
รูปที่ 10 แสดงการกระจายของอายุของผู้ป่วยที่เก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมดตั้งแต่วันที่

วันที่ 22 มีนาคม พ.ศ. 2544 ถึงวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2546

หมายเหตุ – การแสดงการกระจายอายุผู้ป่วยไม่รวมผู้ป่วยที่ไม่ทราบเพศและอายุ

ผลจากการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในส่วน N gene

จากการทำ RT-PCR ของ hMPV RNA ส่วน N gene แล้วจะได้ผลผลิตในส่วน N gene จากการ
ทำ PCT รอบสองขนาด 259 bp ตามรูปที่ 11 เมื่อทำการตรวจกรองน้ำล้างโพรงหลังจมูกด้วยการทำ
nested-PCR ใน gene ส่วนนี้ ปรากฏว่าในน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมดจำนวน 236 หลอด พบน้ำล้าง
โพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวก 12 คนจากจำนวนเด็กทั้งหมด 227 คน (5.3%)



รูปที่ 11 แสดงผลผลิตขนาด 259 bp ที่ได้จากการทำ nested-PCR ของ hMPV ในส่วน N gene โดยที่ M คือ 100 bp marker, P คือ positive control, S₁ คือ ตัวอย่างที่ 1, S₂ คือ ตัวอย่างที่ 2, S₃ คือ ตัวอย่างที่ 3 และ N คือ negative control ตามลำดับ

ผลของการเพิ่มจำนวน internal control

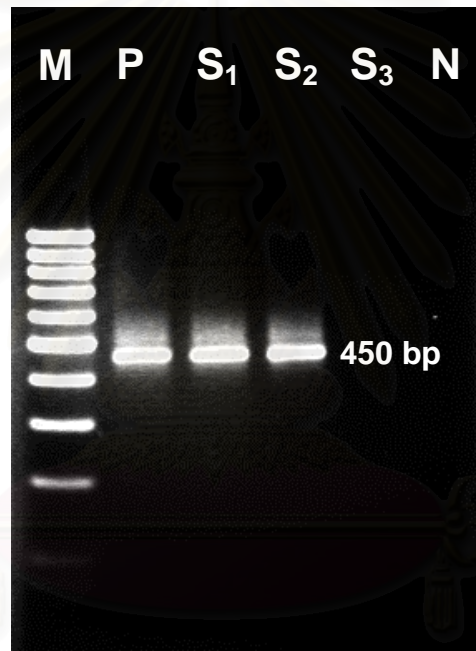
ในการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกจะใช้ β -actin mRNA เป็น internal control ทุกครั้ง จากการทำให้ RT-PCR ของ β -actin จะให้ผลผลิตขนาด 606 bp ตามรูปที่ 12 และน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ทำการตรวจกรอง hMPV ในส่วน N gene ให้ผลบวกกับการทำให้ RT-PCR ของ β -actin mRNA ทุกสาย



รูปที่ 12 แสดงผลผลิตขนาด 606 bp ที่ได้จากการทำให้ RT-PCR ของ β -actin gene โดยที่ M คือ 100 bp marker, S₁ ถึง S₁₁ คือ ตัวอย่างที่ 1 ถึงตัวอย่างที่ 11 และ N คือ negative control ตามลำดับ

ผลของการเพิ่มจำนวน hMPV RNA ในส่วน F gene

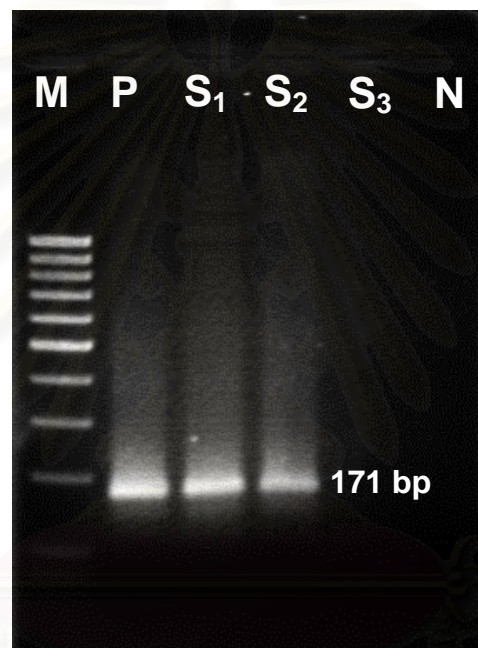
การเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วนนี้จะเป็นการเพิ่มจำนวน hMPV เฉพาะผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV ในส่วน N gene จำนวน 12 คนเท่านั้น ผลปรากฏว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกในส่วน F gene จำนวน 10 คน ยกเว้นผู้ป่วยรายที่ 4 และ 5 ที่ไม่สามารถทำการทดลองได้เนื่องจากน้ำล้างโพรงหลังจมูกมีไม่เพียงพอในการทำการศึกษา โดยแสดงรายละเอียดของน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับการทำ PCR ในยีนส่วนต่างๆในตารางที่ 13 และน้ำล้างโพรงหลังจมูกทุกรายที่ทำการเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วน F gene ก็ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ β -actin mRNA



รูปที่ 13 แสดงผลผลิตขนาด 450 bp จากการทำ nested-PCR ของ hMPV ในส่วน F gene โดยที่ M คือ 100 bp marker, P คือ positive control, S₁ คือ ตัวอย่างที่ 1, S₂ คือ ตัวอย่างที่ 2, S₃ คือ ตัวอย่างที่ 3 และ N คือ negative control ตามลำดับ

ผลของการเพิ่มจำนวน hMPV RNA ในส่วน L gene

เป็นการเพิ่มจำนวน hMPV เฉพาะผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV ในส่วน N gene จำนวน 12 คนเท่านั้น ผลปรากฏว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกในส่วนนี้ 9 คน ยกเว้นผู้ป่วยรายที่ 4 และ 5 ให้ผลลบ และผู้ป่วยรายที่ 9 ที่น้ำล้างโพรงหลังจมูกไม่เพียงพอในการทำการศึกษา โดยแสดงรายละเอียดของน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับการทำ PCR ในยีนส่วนต่างๆในตารางที่ 13 และน้ำล้างโพรงหลังจมูกทุกรายที่ทำการเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วน L gene ก็ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ β -actin mRNA เช่นกัน



รูปที่ 14 แสดงผลผลิตขนาด 171 bp จากการทำ nested-PCR ของ hMPV ในส่วน L gene โดยที่ M คือ 100 bp marker, P คือ positive control, S₁ คือ ตัวอย่างที่ 1, S₂ คือ ตัวอย่างที่ 2, S₃ คือ ตัวอย่างที่ 3 และ N คือ negative control ตามลำดับ

ตารางที่ 13 แสดงผลสรุปของผู้ป่วยแต่ละรายที่ให้ผลบวกกับ hMPV ในส่วน N, F และ L gene

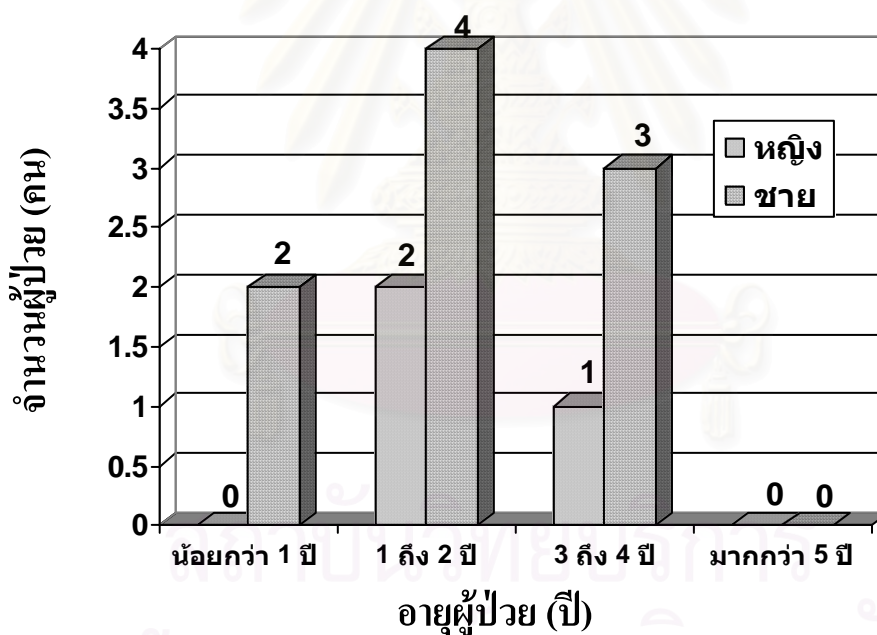
ผู้ป่วย	ผลการทำ RT-PCR		
	N gene	F gene	L gene
1	Positive	Positive	Positive
2	Positive	Positive	Positive
3	Positive	Positive	Positive
4	Positive	Negative	Negative
5	Positive	Negative	Negative
6	Positive	Positive	Positive
7	Positive	Positive	Positive
8	Positive	Positive	Positive
9	Positive	Positive	ND
10	Positive	Positive	Positive
11	Positive	Positive	Positive
12	Positive	Positive	Positive
รวม	12 ราย	10 ราย	9 ราย

หมายเหตุ – ND ในตารางสีเทาแสดงถึงน้ำล้างโพรงหลังจมูกไม่เพียงพอในการทำการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่วงอายุและเพศของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV

จากการทำ RT-PCR ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกของเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจำนวน 236 หลอด จากเด็กจำนวน 227 คน พบน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV จำนวน 12 คน (5.3%) แบ่งเป็นเด็กชาย 9 คน คือ เด็กชายอายุ 9 เดือน 2 คน, อายุ 1 ปี 3 คน, อายุ 2 ปี 1 คนและอายุ 3 ปี 1 คน และเด็กหญิง 3 คน คือ เด็กหญิงอายุ 1 ปี 1 คน, อายุ 2 ปี 1 คน และอายุ 3 ปี 1 คน เด็กที่พบการติดเชื้อในน้ำล้างโพรงหลังจมูกมีช่วงอายุตั้งแต่ 9 เดือนถึง 3 ปี (ค่าเฉลี่ยของอายุเท่ากับ 1.8 ปี, ค่ามัธยฐานเท่ากับ 1.5 ปี) จะเห็นว่าเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจทั้ง 12 รายมีอายุน้อยกว่า 5 ปีทั้งสิ้น และพบการติดเชื้อ hMPV มากที่สุดในช่วงอายุ 1-2 ปี ซึ่งคิดเป็น 50% ของเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ทั้งหมด (รูปที่ 15) แต่เมื่อพิจารณาจำนวนน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกกับ hMPV เทียบกับน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมดในช่วงอายุต่างๆ แล้วจะเห็นว่าอัตราการติดเชื้อ hMPV ที่มากที่สุดนั้นอยู่ในช่วงอายุ 3-4 ปี (ตารางที่ 14) จากการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงพบว่า การติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในเพศชายจะมากกว่าเพศหญิงเล็กน้อย คือ 2 : 1



รูปที่ 15 แสดงการกระจายอายุผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV

ตารางที่ 14 แสดงรายละเอียดของช่วงอายุและเพศที่ติดเชื้อ hMPV ในแต่ละปี

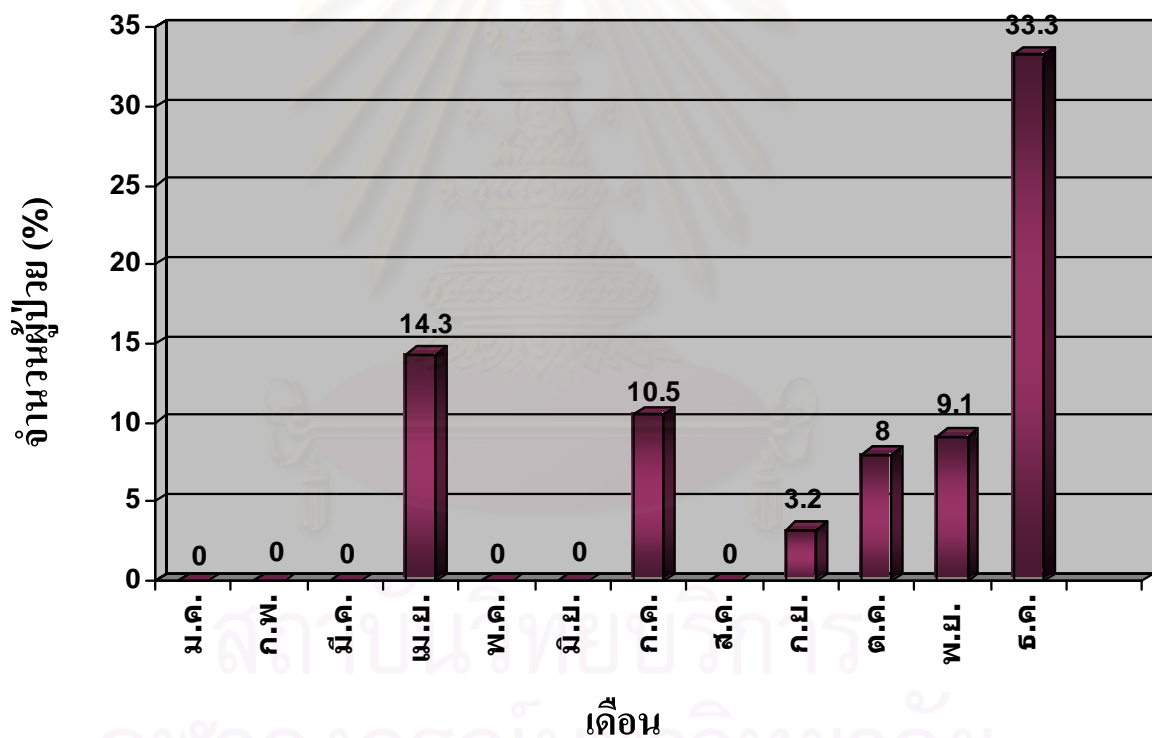
ช่วงอายุ	ชาย			หญิง			รวม		
	ทั้งหมด (คน)	ติดเชื้อ hMPV (คน)	การติดเชื้อ (%)	ทั้งหมด (คน)	ติดเชื้อ hMPV (คน)	การติดเชื้อ (%)	ทั้งหมด (คน)	ติดเชื้อ hMPV (คน)	การติดเชื้อ (%)
<1 ปี	62	2	3.2	41	0	0	103	2	1.9
1-2 ปี	54	4	7.4	39	2	5.1	93	6	6.5
3-4 ปี	15	3	20.5	6	1	16.7	21	4	19.0
> 5 ปี	1	0	0	3	0	0	4	0	0

หมายเหตุ – ตารางนี้ไม่รวมถึงผู้ป่วยที่ไม่ทราบเพศ 1 คนและไม่ทราบอายุจำนวน 5 คน

ช่วงการระบาดของ hMPV

การติดเชื้อ hMPV ในการศึกษาครั้งนี้พบมากในฤดูฝนถึงฤดูหนาว ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม และการติดเชื้อ hMPV พบมากที่สุดในเดือนธันวาคม (33.3% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมดที่พบในเดือนธันวาคม) แต่การติดเชื้อ hMPV ก็สามารถพบได้ในเดือนเมษายน ซึ่งเป็นฤดูร้อนเช่นกัน

เมื่อจำแนกการติดเชื้อ hMPV ตามปีที่ทำการศึกษากันทั้ง 3 ปี พบการติดเชื้อ hMPV มากที่สุดจำนวน 10 รายจากผู้ป่วยจำนวน 116 รายในปี พ.ศ. 2545 ซึ่งคิดเป็น 8.6% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกในปี พ.ศ. 2545 นอกจากนั้นพบน้ำล้างโพรงหลังจมูกในปี พ.ศ. 2544 อีก 2 รายจากผู้ป่วยจำนวน 38 ราย คิดเป็น 5.3% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกในปี พ.ศ. 2544 และไม่พบการติดเชื้อ hMPV ในพ.ศ. 2546 (ในปีนี้มีผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 73 ราย) (ตารางที่ 15)



รูปที่ 16 แสดงช่วงเวลาการระบาดของ hMPV ที่เกิดขึ้นในการศึกษานี้

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งหมดในแต่ละปี

	พ.ศ. 2544			พ.ศ. 2545			พ.ศ. 2546			รวม		
	ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV (คน)	ผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	% hMPV	ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV (คน)	ผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	% hMPV	ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV (คน)	ผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	% hMPV	ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV (คน)	ผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	% hMPV
ชาย	1	23	4.3	8	77	10.4	0	37	0	9	137	6.6
หญิง	1	15	6.7	2	39	5.1	0	36	0	3	90	3.3
รวม	2	38	5.3	10	116	8.6	0	73	0	12	227	5.3

การติดเชื้อร่วมกับ hRSV

จากการศึกษาในหลายประเทศพบว่าช่วงการระบาดของ hMPV อาจมีช่วงเดียวกับ hRSV จึงได้ทำ RT-PCR ของ hRSV ผลปรากฏว่าจากการทำ RT-PCR ของ hRSV ในผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ hMPV ทั้ง 12 รายพบผู้ป่วย 1 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 10 ตามตารางที่ 16) ให้ผลบวกกับการเพิ่มจำนวน hRSV แสดงว่าผู้ป่วยรายนี้มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจร่วมกับ hRSV

อาการและอาการแสดงของผู้ป่วย hMPV

อาการและอาการแสดงส่วนใหญ่ที่พบในเด็กที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV RNA ทั้ง 12 คน คือ มีไข้ (100%), ไอ (100%), หอบหายใจเร็ว (91.7%), มีเสมหะ (75%), มีน้ำมูก (58.3%) และหายใจเสียงดัง (25%) จะเห็นว่าเด็กทั้ง 12 รายที่ติดเชื้อ hMPV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกทุกรายมีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจทั้งสิ้น นอกจากอาการทางระบบทางเดินหายใจแล้วยังพบเด็กที่มีอาการท้องเสียร่วมด้วยจำนวน 3 ราย (25%) ผู้ป่วยเด็กที่ให้ผลบวกกับ hMPV ทุกรายได้ทำการเอ็กซเรย์ปอด ผลการเอ็กซเรย์ของผู้ป่วยทุกรายผิดปกติ ส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยเป็น perihilar infiltration (66.7%) และผู้ป่วยทุกราย (100%) ได้รับการวินิจฉัยเป็นปอดอักเสบ (pneumonia)

ผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในการศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็นผู้ป่วยนอกจำนวน 1 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 4) และที่เหลือจำนวน 11 ราย (91.7%) เป็นผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล ระยะเวลาเฉลี่ยของการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลของผู้ป่วยเด็กทั้ง 11 รายนี้คือ 6 วัน (1-14 วัน)

ผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV นั้นมีโรคประจำตัวทั้งหมด 6 คน (50%) แบ่งเป็น

1. เด็กที่มีโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นโรคประจำตัว 3 คน (25%) ได้แก่
 - 1.1 ผู้ป่วยรายที่ 6
 - 1.2 ผู้ป่วยรายที่ 8
 - 1.3 ผู้ป่วยรายที่ 11
2. เด็กที่มีโรคปอดเป็นโรคประจำตัว 3 คน (25%) ได้แก่
 - 2.1 ผู้ป่วยรายที่ 3
 - 2.2 ผู้ป่วยรายที่ 4
3. เด็กที่มีโรคอื่นเป็นโรคประจำตัว 1 คน (8.3%)
 - 3.1 ผู้ป่วยรายที่ 12 เป็น congenital rubella syndrome, delay milestone และ deaf

ตารางที่ 16 แสดงรายละเอียดของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV RNA

ผู้ป่วย	เพศ	อายุ	โรคประจำตัว	เดือนที่พบ การติดเชื้อ	อาการแสดง							ผลเอกซเรย์ปอด	การวินิจฉัย	จำนวนวันที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล
					ไข้	ไอ	หอบ	เสมหะ	น้ำมูก	หายใจเสียงดัง	ท้องเสีย			
1	ชาย	9 เดือน	-	ตุลาคม	√	√	√	√	√	√	√	infiltrate both lower lung	pneumonia	5 วัน
2	หญิง	3 ปี	-	ธันวาคม	√	√	√	√	√	-	-	perihilar infiltrate	pneumonia	2 วัน
3	หญิง	1 ปี	√	เมษายน	√	√	√	√	√	√	-	patchy infiltration at right upper and middle lobe	pneumonia	10 วัน
4	ชาย	3 ปี	√	เมษายน	√	√	-	-	-	√	-	perihilar infiltrate	pneumonia	ผู้ป่วยนอก
5	ชาย	1 ปี	-	เมษายน	√	√	√	√	√	-	-	hyperaeration and perihilar infiltration	pneumonia	2 วัน
6	ชาย	3 ปี	√	กรกฎาคม	√	√	√	-	-	-	-	perihilar infiltration	pneumonia	8 วัน
7	ชาย	3 ปี	-	กรกฎาคม	√	√	√	√	√	-	-	perihilar infiltration	pneumonia	1 วัน
8	ชาย	2 ปี	√	กรกฎาคม	√	√	√	-	-	-	-	CXR-RML infiltrate	pneumonia	14 วัน
9	ชาย	1 ปี	-	กรกฎาคม	√	√	√	√	√	-	-	perihilar infiltration	pneumonia	5 วัน
10	ชาย	9 เดือน	-	กันยายน	√	√	√	√	√	-	√	CXR-RML infiltrate	pneumonia	7 วัน
11	หญิง	2 ปี	√	ตุลาคม	√	√	√	√	-	-	-	perihilar infiltration	pneumonia	7 วัน
12	ชาย	1 ปี	√	พฤศจิกายน	√	√	√	√	-	-	√	perihilar infiltration with right lower lung infiltration	pneumonia	5 วัน

ผลของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene

BLAST

ผลจากการทำ RT-PCR ในส่วน N gene มีจำนวนน้ำล้างโพรงหลังจุ่มที่ให้ผลบวกกับ N gene ทั้งหมด 12 ราย เมื่อนำผลผลิตของ gene ในส่วนนี้ทั้งหมดมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าโปรแกรม BLAST ปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ทุกเส้นใกล้เคียงกับ hMPV มากที่สุด

CLUSTAL X

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดเข้าโปรแกรม CLUSTAL X เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงความเหมือนหรือความแตกต่างอย่างชัดเจนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของการศึกษาในครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337) และลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ของ APV-C (accession No. AY176590) (รูปที่ 14) หากพิจารณาตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสี่เหลี่ยม 25 ตำแหน่งในรูปที่ 17 จะเห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันใน 25 ตำแหน่งนี้อาจแบ่ง hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่มตามกรอบเส้นประ คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12

PHYLOGENETIC ANALYSIS

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 12 ราย สร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C (accession No. AY176590) โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 (รูปที่ 18) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ CLUSTAL X คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

615

10N	-----C--A-----G--A--A-----TA-AA-T-----A--T--TA-A-G--A-G-	กลุ่มที่ 1
9N	-----C--A-----G--A--A-----TA-AG-T-----A--T--TA-A-G--A-G-	
8N	-----G--A--A-----TA-AG-T-----A--T--TA-A-G--A-G-	
11N	-----G--A--A-----TA-AG-T-----A--T--TA-A-G--A-G-	
4N	A-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	
2N	-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	กลุ่มที่ 2
3N	-----C--A-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	
7N	-----C--A-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	
6N	A-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	
12N	-A-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	
1N		
5N	-----C--A-----G--A--A-----CA-AG-C-----A--T--CC-T-A--A-G-	
AF371337	-----C--A-----G--A--A-----CA-AG-C-----G--T--CC-T-A--A-G-	
APVC	GCATCAACAATCGAAGTTGGGCTGGAGACAGCTGTTAGAAGGGCAAACCGTGTGCTGAAT	

675

10N	G----C-C--A--A--A--T--GG-A-T--A--A--G-----T--A--T--T--A	กลุ่มที่ 1
9N	G----C-C--A--A--A--T--GG-A-T--A--A--G-----T--A--T--T--A	
8N	G----C-C--A--A--A--T--GG-A-T--A--A--G-----T--A--T--T--A	
11N	G----C-C--A--A--A--T--GG-A-T--A--A--G-----T--A--T--T--A	
4N	A----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	
2N	G----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	กลุ่มที่ 2
3N	G----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	
7N	G----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	
6N	G----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	
12N	G----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	
1N		
5N	G----C-C--A--A--A--T--AA-G-C--A--A--A-----T--A--C--C--C	
AF371337	G----C-C--G--A--A--T--AA-G-C--A--A--G-----T--A--C--C--C	
APVC	GATGCATTGAAAAGGTTCCCAAGATTGACATCCCCAAAATTGCGAGGTCCTTTATGAT	

735

10N	C-A-----A--A-----G--CT--A--T--A--C--T-----C--A-----TT-A--C	กลุ่มที่ 1
9N	C-A-----A--A-----G--CT--A--C--A--C--T-----C--A-----TT-A--C	
8N	C-A-----A--A-----G--CT--A--T--A--C--T-----C--A-----TT-A--C	
11N	C-A-----A--A-----G--CT--A--T--A--C--T-----C--A-----TT-A--C	
4N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
2N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	กลุ่มที่ 2
3N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
7N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
6N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
12N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
1N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
5N	T-A-----A--A-----G--TT--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
AF371337	T-A-----A--A-----G--TC--A--T--G--C--T-----T--C-----AT-A--C	
APVC	CTGTTTGAGCAGAAAGTTTACTACAGGAGCTTGTTTATAGAGTATGGCAAAGCCCTTGGG	

795

10N	--A--T--A-----A-----A-----TT--G--T--A-----A--T-----	กลุ่มที่ 1
9N	--A--T--A-----A-----A-----TT--G--T--A-----A--T-----	
8N	--A--T--A-----A-----A-----TT--G--T--A-----A--T-----	
11N	--A--T--A-----A-----A-----TT--G--T--A-----A--T-----	
4N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	กลุ่มที่ 2
2N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
3N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
7N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
6N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
12N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
1N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
5N	--A--C--T-----C-----A-----TT--A--C--T-----A--C-----	
AF371337	--A--A--T-----C-----A-----TC--A--T-----A--C-----	
APVC	TCTTCTTCCACAGGAAGCAAGGCAGAAAGCCTGTTTGTGAATATTTTCATGCAAGCTTAT	

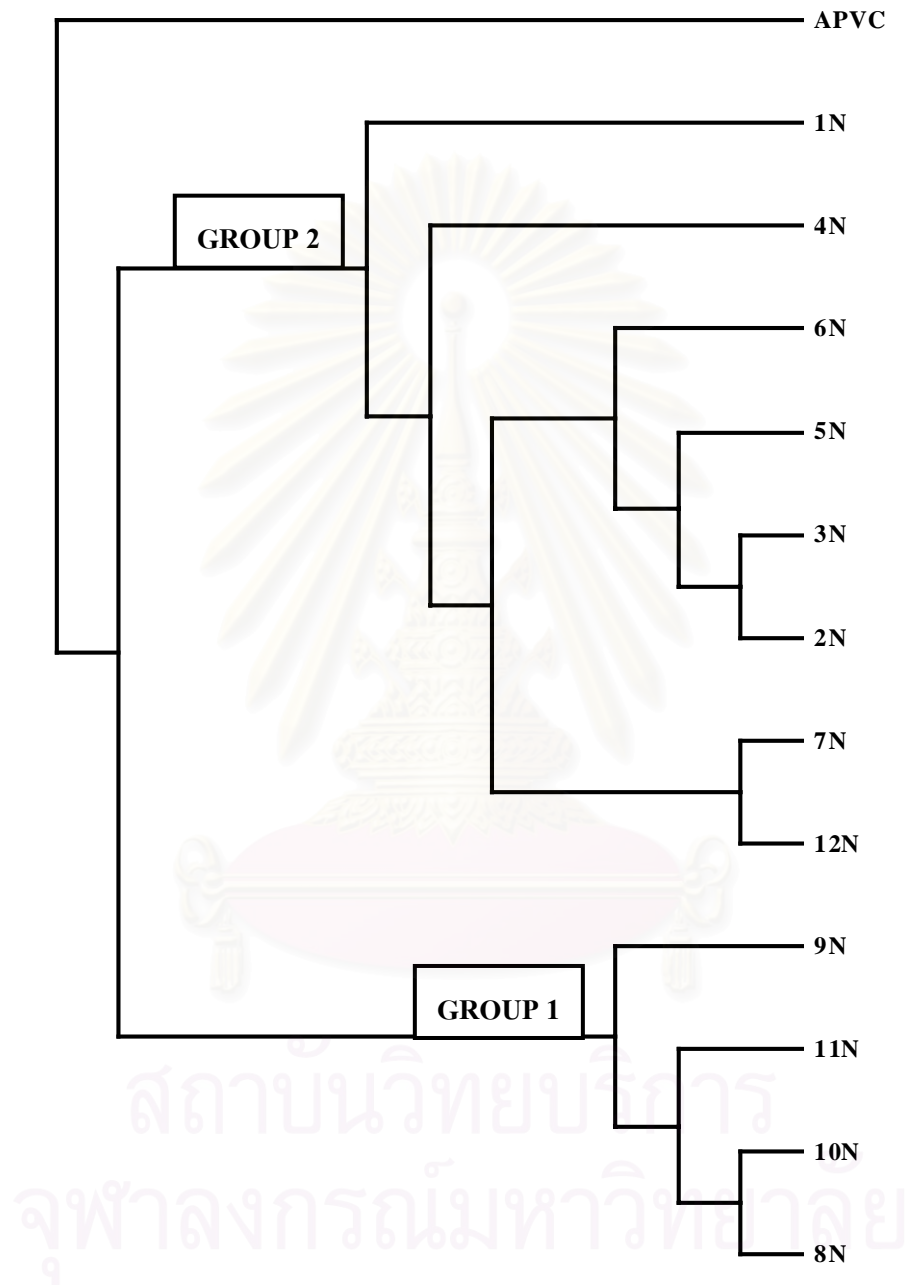
814

10N	--G--C--
9N	--G--C-
8N	--G--C-----A-----
11N	--G--C-----A-----
4N	--G--C-
2N	--G--C-
3N	--G--C-
7N	--G--C-----A-----
6N	--G--C-----A-----
12N	--G--C-----A-----
1N	--G--C--
5N	--G--C-----A-----
AF371337	--G--C-----A-----
APVC	GGTGCAGGTCAGACAATGC

รูปที่ 17

แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

โดยที่ 1N ถึง 12N คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้, accession No. AF371337 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์, APVC คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของ avian pneumovirus - แทนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง, อักษรแสดงความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์, กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแบ่ง hMPV ออกได้เป็น 2 กลุ่ม, กรอบเส้นประแสดง hMPV ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม



รูปที่ 18 แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 เฉพาะในส่วน N gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยที่ 1N ถึง 12N คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ APVC คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ avian pneumovirus type C

จากนั้นทำการเปรียบเทียบ % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ด้วยตนเอง (ตารางที่ 17) จากการอ้างอิงกลุ่มของ hMPV จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 นั้น (รูปที่ 18) ผลปรากฏว่า

1. กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยที่ 8-11 มี % nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 99-100%
2. กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ 1-7 และ 12 มี % nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 99-100%
3. % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 2 กลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 87-88%

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

	1N	2N	3N	4N	5N	6N	7N	12N	8N	9N	10N	11N
1N	100	100	100	100	100	100	100	100	88	87	88	88
2N	100	100	100	99	100	100	100	100	88	88	88	88
3N	100	100	100	99	100	100	100	100	88	88	88	88
4N	100	99	99	100	99	99	99	99	88	87	87	88
5N	100	100	100	99	100	100	100	100	88	88	88	88
6N	100	100	100	99	100	100	100	100	88	88	88	88
7N	100	100	100	99	100	100	100	100	88	88	88	88
12N	100	100	100	99	100	100	100	100	88	88	88	88
8N	88	88	88	88	88	88	88	88	100	99	99	100
9N	87	88	88	87	87	87	87	87	99	100	99	99
10N	88	88	88	87	88	88	88	88	99	99	100	99
11N	88	88	88	88	88	88	88	88	100	99	100	99

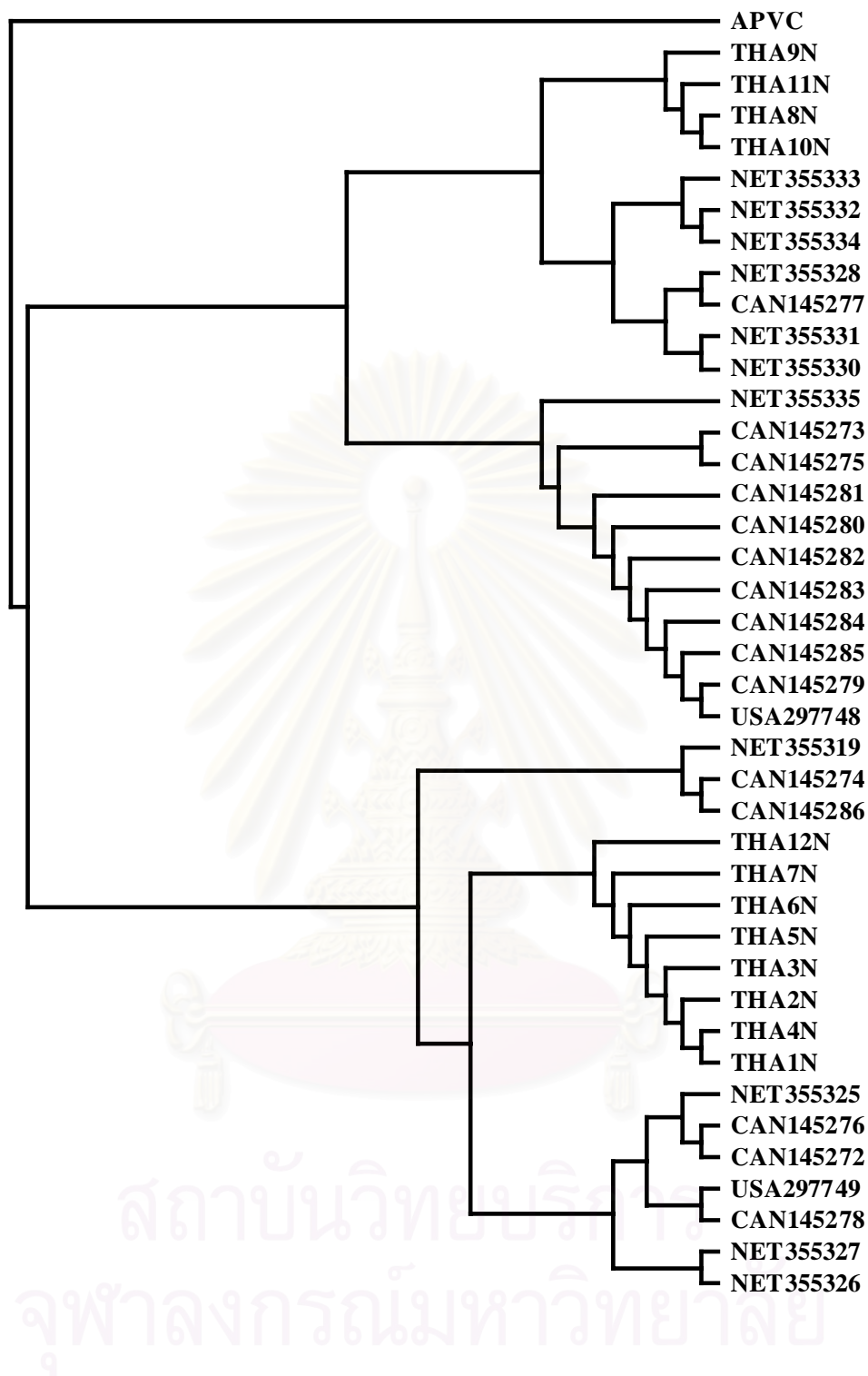
หมายเหตุ – ตารางในกรอบสีเทาแสดงถึง % nucleotide similarity ภายใน hMPV กลุ่มเดียวกัน และ ตารางในกรอบสีขาวแสดงถึง % nucleotide similarity ระหว่าง hMPV 2 กลุ่ม

ทำการสร้าง phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ทั้ง 2 กลุ่มที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้จาก

1. ประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession Nos. AY355330-AY355335, AY355338, AY355319 และ AY355325-AY355327)
2. ประเทศแคนาดา (accession Nos. AY145272-AY145279 และ AY145280-AY145286)
3. ประเทศสหรัฐอเมริกา (accession Nos. AY297748 และ AY297749)
4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C (accession No. AY176590)

โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 ผลที่ได้ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังรูปที่ 15 และผลที่ได้เหมือนกับการสร้าง phylogenetic tree ข้างต้น และเหมือนกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ CLUSTAL X คือ สามารถแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12



รูปที่ 19 แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ในส่วน N gene เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

โดยที่ 1N ถึง 12N คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จากการศึกษาคั้งนี้, APVC คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ avian pneumovirus type C, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV แทนชื่อประเทศด้วยตัวอักษร 3 ตัวแรกตามด้วย accession No. ดังนี้ CAN คือประเทศแคนาดา, NET คือประเทศเนเธอร์แลนด์, USA คือประเทศสหรัฐอเมริกาและTHA คือประเทศไทย

จากนั้นทำการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้และลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession Nos. AY355319 และ AY355331), ประเทศแคนาดา (accession Nos. AY145276 และ AY145277), ประเทศสหรัฐอเมริกา (accession Nos. AY297749 และ AY297748) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C (accession No. AY176590) (ตารางที่ 18) จากการอ้างอิงกลุ่มของ hMPV จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP นั้น (รูปที่ 19) ผลปรากฏว่า

1. กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยที่ 8-11 และ accession Nos. AY355379, AY145276 และ AY297749 มี % nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 96-97%
2. กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ 1-7, 12 และ accession Nos. AY355331, AY145277 และ AY297748 มี % nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 94-98%
3. % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 2 กลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 86-87%
4. %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้กับ APV-C มีค่าระหว่าง 77-79%

ตารางที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-C

	NET355319	CAN145276	USA297749	NET355331	CAN145277	USA297748	APV-C
1N	96	96	96	86	87	86	79
2N	97	97	96	86	86	86	77
3N	97	97	96	86	86	86	77
4N	96	96	96	85	86	86	77
5N	97	97	96	86	86	86	77
6N	97	97	96	86	86	86	77
7N	97	97	96	86	86	86	77
12N	97	97	96	86	86	86	77
8N	86	87	87	97	98	94	77
9N	86	86	86	97	97	94	77
10N	86	86	86	97	97	94	77
11N	86	87	87	97	98	94	77

หมายเหตุ – ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ภายใน hMPV กลุ่มเดียวกัน และ ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ระหว่าง hMPV 2 กลุ่ม

ลำดับกรดอะมิโนในส่วน N gene

BLAST

เมื่อแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำลำดับกรดอะมิโนทุกเส้นเข้าโปรแกรม BLAST ปรากฏว่าลำดับกรดอะมิโนเกือบทั้งหมดใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ยกเว้นลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยรายที่ 1 เท่านั้นที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ APV-C

CLUSTAL X

จากนั้นนำเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์ และลำดับกรดอะมิโนของ APV-C ในส่วน N โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X ผลที่ได้ คือ ลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยรายที่ 1 ไม่มีความแตกต่างกับลำดับกรดอะมิโนของ APV-C แต่ลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยรายอื่นมีความใกล้เคียงกับ hMPV มากกว่า APV-C (รูปที่ 20) พบการแทนที่ของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ

1. ในผู้ป่วยรายที่ 4 มีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก Aspartic (D) เป็น Asparagine (N)
2. ในผู้ป่วยรายที่ 10 มีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก Valine (V) เป็น Isoleucine (I)

เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปที่ 14 กรดอะมิโนในกรอบสี่เหลี่ยม 2 ตำแหน่งจากรูปที่ 16 แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโน 2 ตำแหน่งนี้อาจแบ่ง hMPV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่มตามเส้นประ ในรูปที่... และผลที่สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มนี้ มีความสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์และจาก phylogenetic tree ในรูปที่ 15 คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

10N	-----TI-----SD-----V-----E-----Y-----	กลุ่มที่ 1
9N	-----TV-----SD-----V-----E-----Y-----	
8N	-----TV-----SD-----V-----E-----Y-----	
11N	-----TV-----SD-----V-----E-----Y-----	
4N	-----TV-----SN-----M-----D-----Y-----	กลุ่มที่ 2
1N	-----D-----Y-----	
5N	-----TV-----SD-----M-----D-----Y-----	
12N	-----TV-----SD-----M-----D-----Y-----	
6N	-----TV-----SD-----M-----D-----Y-----	
2N	-----TV-----SD-----M-----D-----Y-----	
7N	-----TV-----SD-----M-----D-----Y-----	
3N	-----TV-----SD-----M-----D-----Y-----	
AF371337	-----TV-----SD-----M-----D-----H-----	
APVC	ASTIEVGLLETAVRRANRVLNDALKRFPRIDIPKIARSFYDLFEQKVYRSLFIEYGKALG	

10N	-----
9N	-----
8N	-----
11N	-----
4N	-----
1N	-----
5N	-----
12N	-----
6N	-----
2N	-----
7N	-----
3N	-----
AF371337	-----
APVC	SSSTGSKAESLFVNI FMQAYGAGQTM *****

รูปที่ 20 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ในส่วน N gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับ ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง โดยที่ 1N ถึง 12N คือ ลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้, AF371337 คือ ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์, APVC คือ ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงของ avian pneumovirus, - แทนกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง, อักษรตัวหนาแสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน, กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สามารถแบ่ง hMPV ออกได้เป็น 2 กลุ่ม, กรอบเส้นประแสดง hMPV ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

ผลสรุปในส่วน N gene

ผลจากการใช้โปรแกรม CLUSTAL X เพื่อสังเกตความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน และผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP95 ในการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน N gene ให้ผลตรงกัน คือ hMPV ที่ได้จากการศึกษานี้ทั้ง 12 ตัวอย่างสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11 โดยมี % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 99-100%
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12 โดยมี % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 99-100%



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน F gene

BLAST

จากการทำ RT-PCR ในส่วน N gene มีจำนวนน้ำล้างโพรงหลังจุมูกที่ให้ผลบวกกับ N gene ทั้งหมด 12 ราย จึงนำน้ำล้างโพรงหลังจุมูกทั้ง 12 รายทำ RT-PCR ส่วน F gene แต่น้ำล้างโพรงหลังให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ในส่วนนี้เพียง 10 รายเท่านั้น ขาดผู้ป่วยรายที่ 4 และ 5 เมื่อนำผลผลิตของ gene ในส่วนนี้ทั้ง 10 ราย ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าโปรแกรม BLAST ปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน F gene ทุกเส้นใกล้เคียงกับ hMPV มากที่สุด

CLUSTAL X

ใช้โปรแกรม CLUSTAL X ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด 10 รายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน F gene ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337) และลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน F gene ของ APV-C (accession No. AF187152) (รูปที่ 21) หากพิจารณาตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสี่เหลี่ยม 48 ตำแหน่งในรูปที่ 20 จะเห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันใน 48 ตำแหน่งนี้สามารถแบ่ง hMPV ออกเป็น 2 กลุ่มตามกรอบเส้นประ คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

PHYLOGENETIC ANALYSIS

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน F gene ที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 10 ราย สร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C (accession No. AY187152) โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 (รูปที่ 22) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ CLUSTAL X คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

                                                    3762
8F          -----
10F
9F          ---T-G-C-----A--T-----AT-G-CC--A--T--ATC-----A-----
11F          -----
1F          ---A--T-----AC-A-CC--G--C--TTC-----G-----
12F
6F
3F
7F          G--C-----A--T-----AC-A-CC--G--C--TTC-----G-----
2F          -----
AF371337    ---T-G-C-----A--T-----AC-A-CC--A--T--TTC-----A-----
APVC        TCTCTAGATTTAATGACTGACGCTGAGCTTGTAAGAGCTGTAAGCAACATGCCACATCT
    
```

```

                                                    3822
8F          G---A--GA-A--AC-----T-G--G--C--C-----AA-G--A--A--A--T--A
10F          ---C-----AA-G--A--A--A--T--A
9F          G---G--GA-A--AC-----T-G--G--C--C-----AA-G--A--A--A--T--A
11F          G---A--GA-A--AC-----T-G--G--C--C-----AA-G--A--A--A--T--A
1F          G---A--AA-A--AT-----T-G--A--C--T-----GC-A--G--G--G--C--A
12F          -G--A--C--T-----GC-A--G--G--G--C--A
6F          ---A--AT-A--AT-----T-G--A--C--T-----GC-A--G--G--G--C--A
3F          -AA-A--AT-----T-G--A--C--T-----GC-A--G--G--G--C--A
7F          G---A--AA-A--AT-----T-G--A--C--T-----GC-A--G--G--G--C--A
2F          G---A--AA-A--AT-----T-G--A--C--T-----GC-A--G--G--G--C--A
AF371337    G---A--AA-A--AC-----T-G--G--C--T-----AA-A--A--A--G--C--A
APVC        TCAGGACAGATCAATCTGATGCTTGGAATCGGGCAATGGT CAGAAGGAAAGGATTTGGG
                ** ***** * ** ** ** ** **
    
```

กลุ่มที่ 1
 กลุ่มที่ 2

```

                                                    3882
8F          A-CC-A--A--G--C--C--A-----T--GA-T--C--G--T--AT-G--G--C--T--T
10F          A-CC-A--A--G--C--C--A-----T--GA-T--C--G--T--AT-G--G--C--T--T
9F          A-CC-A--A--G--C--C--A-----T--GA-T--C--G--T--AT-G--G--C--T--T
11F          A-CC-A--A--G--C--C--A-----T--GA-T--C--G--T--AT-G--G--C--T--T
1F          A-CC-G--A--G--C--C--G-----C--AA-T--C--G--G--GC-G--A--C--T--C
12F          A-CC-G--A--G--C--C--G-----C--AA-T--C--G--G--GC-G--A--C--T--C
6F          A-CC-G--A--G--C--C--G-----C--AA-T--C--G--G--GC-G--A--C--T--C
3F          A-CC-G--A--G--C--C--G-----C--AA-T--C--G--G--GC-G--A--C--T--C
7F          A-CC-G--A--G--C--C--G-----C--AA-T--C--G--G--GC-G--A--C--T--C
2F          A-CC-G--A--G--C--C--G-----C--AA-T--C--G--G--GC-G--A--C--T--C
AF371337    T-CC-G--A--A--T--C--A-----C--AA-T--C--G--G--AC-G--A--C--T--G
APVC        ATTTTGATTGGAGTTTATGGTAGCTCTGTGGTCTATATAGTGCAGCTTCCATATTTTCGGT
    
```

กลุ่มที่ 1
 กลุ่มที่ 2

3942

8F	--C---T-A-T-T---TAA-C-G-A-T-C-CT-C-A-AA--A-C-G	กลุ่มที่ 1
10F	--C---T-A-T-T---TAA-C-G-A-T-C-CT-C-A-AA--A-C-G	
9F	--C---T-A-T-T---TAA-C-G-A-T-C-CT-C-A-AA--A-C-G	
11F	--C---T-A-T-T---TAA-C-G-A-T-C-CT-C-A-AA--A-C-G	
1F	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-C-AA--A-G-A	กลุ่มที่ 2
12F	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-C-AA--A-G-A	
6F	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-C-AA--A-G-A	
3F	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-C-AA--A-G-A	
7F	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-C-AA--A-G-A	
2F	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-C-AA--A-G-A	
AF371337	--T---C-G-T-C---TAG-A-A-A-C-T-CT-T-A-GA--A-G-A	
APVC	GTGATAGATACCCGTGTTGGAAGGTGAAGGCTGCTCCATTATGTTTCAGGGAAAGACGGG	

4002

8F	--T---T-C-C-AA--G-T---G-----A-----A-A-C-T	กลุ่มที่ 1
10F	--T---T-C-C-AA--G-T---G-----A-----A-A-C-T	
9F	--T---T-C-C-AA--G-T---G-----A-----A-A-C-T	
11F	--T---T-C-C-AA--G-T---G-----A-----A-A-C-T	
1F	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	กลุ่มที่ 2
12F	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	
6F	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	
3F	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	
7F	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	
2F	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	
AF371337	--C---T-C-T-AA--A-C---A-----C-----A-G-A-T	
APVC	AATTATGCATGTCTCTTGCGAGAGACCAAGGTGGTATTGTCAAAATGCTGGATCCACA	

4062

8F	---C-C-----AA-A-----AC---G-T-T---T---T---	กลุ่มที่ 1
10F	---C-C-----AA-A-----AC---G-T-T---T---T---	
9F	---C-C-----AA-A-----AC---G-T-T---T---T---	
11F	---C-C-----AA-A-----AC---G-T-T---T---T---	
1F	---C-C-----GA-A-----AC---GA-C---C---C---	กลุ่มที่ 2
12F	---C-C-----GA-A-----AC---GA-C---C---C---	
6F	---C-C-----GA-A-----AC---GA-C---C---C---	
3F	---C-C-----GA-A-----AC---GA-C---C---C---	
7F	---C-C-----GA-A-----AC---GA-C---C---C---	
2F	---C-C-----GA-A-----AC---GA-C---C---C---	
AF371337	---C-C-----AA-A-----AC---GA-C---C---C---	
APVC	GTTTATTATCCAAATGAGGAGGACTGTGAAGTAAGAAGTGATCATGTGTTTTGTGACACA	

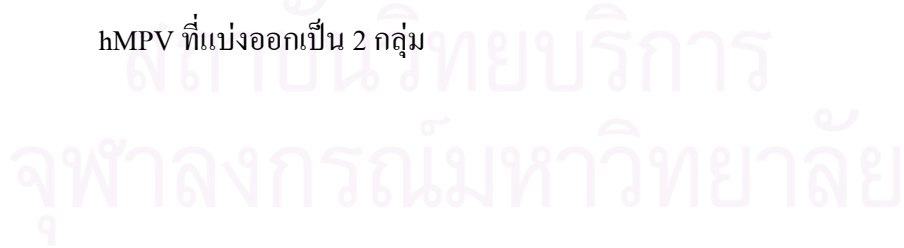
4122

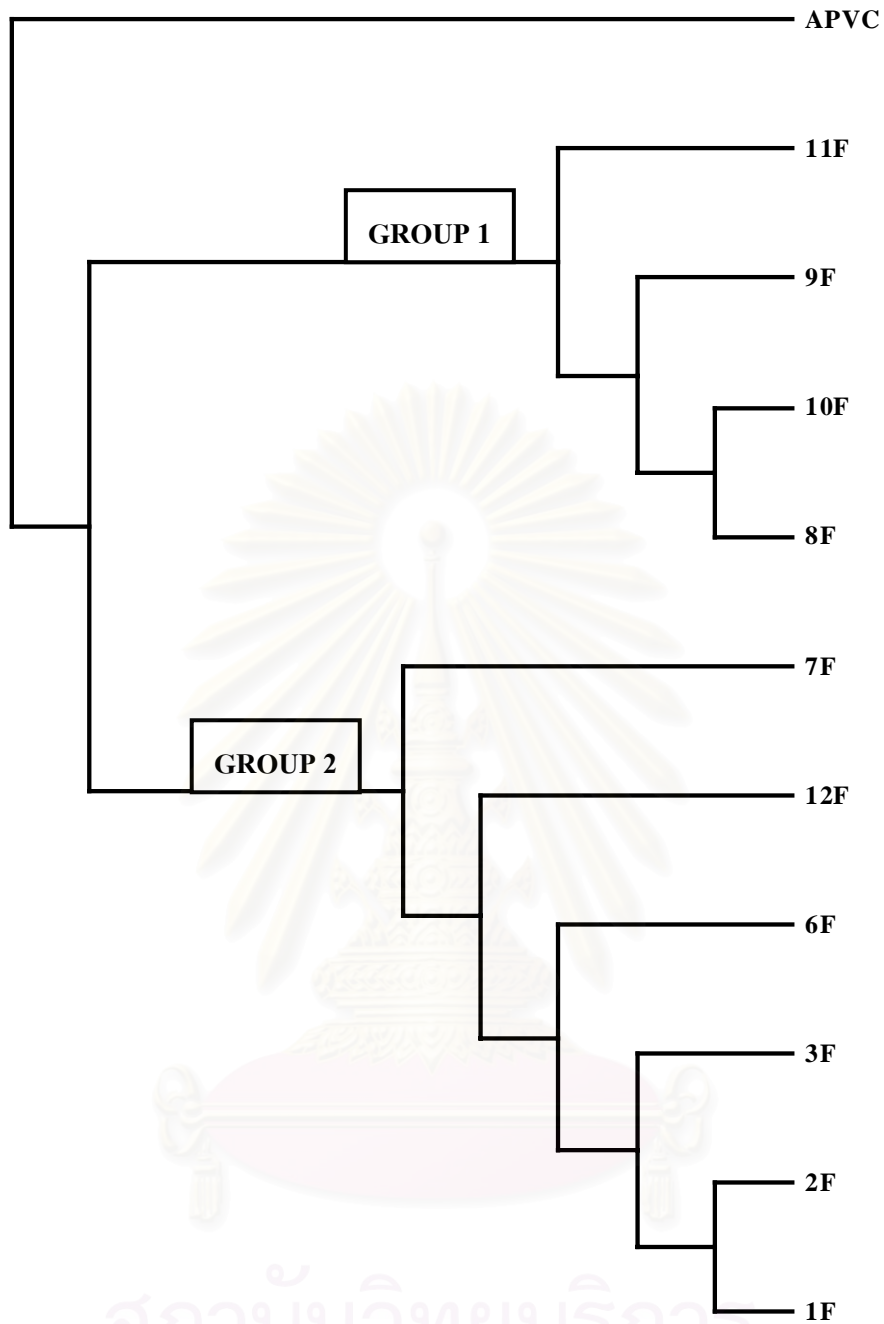
8F	---A-G-C---T-TG-C-A---AGA--A-----TC--C--A--T--T--C	กลุ่มที่ 1
10F	---A-G-C---T-CG--	
9F	---A-G-C---T-TG-C-A---AGA--A-----TC--C--A--T--T--C	
11F	---A-G---	
1F	---A-A-T---T-TG-C-A---AAG--G-----TC--C--A--C--C--A	กลุ่มที่ 2
12F	---A-A-T---T-TG-C-A---AAG--G-----TC--C--A-	
6F	---A-A-T---A-TG-C-A---AAG--G----	
3F	---A-A---	
7F	---A-A---	
2F	---A-A-T---T--T	
AF371337	---A-A-C---T-TG-C-G---AAG--G-----TA--C--A--T--T--T	
APVC	GCAGCTGGGATAAATGTAGCAAAGGAGTCAGAAGAGTGCAACAGGAATATCTCAACAACA	

4154

8F	--C-----A-----A--T--C-----AA-A--
10F	
9F	--C--
11F	
1F	--T-----A-----A--T-
12F	
6F	
3F	
7F	
2F	
AF371337	--T-----A-----A--T--C-----AA-A--
APVC	AAGTACCCTTGCAAGGTAAGTACAGGGCGTCA

รูปที่ 21 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยที่ 1F ถึง 3F และ 6F ถึง 12F คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้, AF371337 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์, APVC คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของ avian pneumovirus, - แทนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง, อักษรตัวหนาแสดงความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์, กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแบ่ง hMPV ออกได้เป็น 2 กลุ่ม, กรอบเส้นประแสดง hMPV ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม





รูปที่ 22 แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 เฉพาะในส่วน F gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยที่ 1F ถึง 3F และ 6F ถึง 12F คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ APVC คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ avian pneumovirus type C

จากนั้นทำการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษานี้ด้วยตัวเอง (ตารางที่ 19) จากการอ้างอิงกลุ่มของ hMPV จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 นั้น (รูปที่ 21) ผลปรากฏว่า

1. กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยที่ 8-11 มี %nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 97-100%
2. กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ 1-7 และ 12 มี %nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าเท่ากับ 100%
3. %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 2 กลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 81-84%

ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษานี้

	1F	2F	3F	6F	7F	12F	8F	9F	10F	11F
1F	100	100	100	100	100	100	84	84	81	84
2F	100	100	100	100	100	100	84	84	81	84
3F	100	100	100	100	100	100	84	84	81	84
6F	100	100	100	100	100	100	84	84	81	84
7F	100	100	100	100	100	100	84	84	81	84
12F	100	100	100	100	100	100	84	84	81	84
8F	84	84	84	84	84	84	100	100	97	100
9F	84	84	84	84	84	84	100	100	97	100
10F	81	81	81	81	81	81	97	97	100	97
11F	84	84	84	84	84	84	100	100	97	100

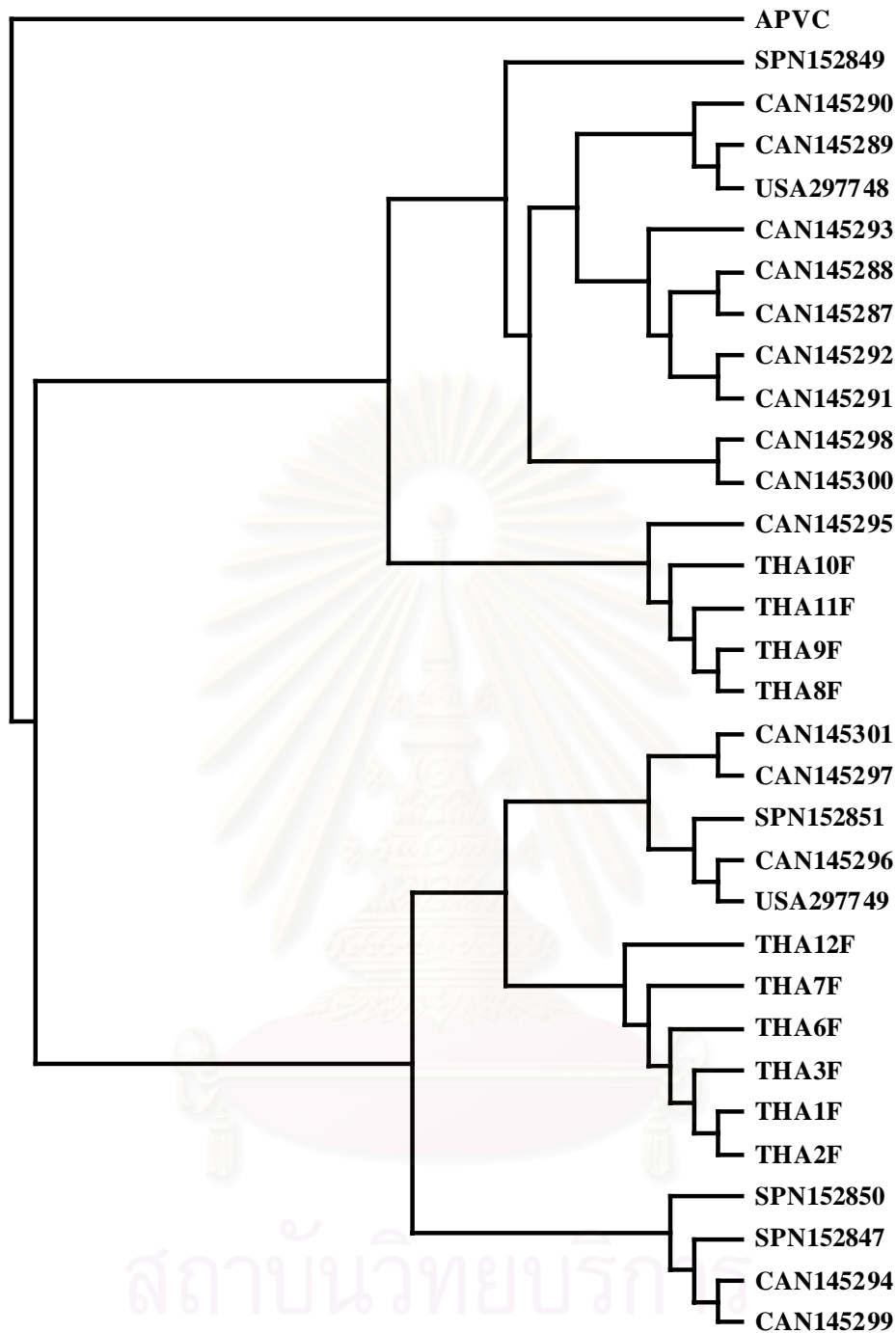
หมายเหตุ – ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ภายใน hMPV กลุ่มเดียวกัน และ ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ระหว่าง hMPV 2 กลุ่ม

ทำการสร้าง phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ทั้ง 2 กลุ่มที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้จาก

1. ประเทศสเปน (accession Nos. AY152847 และ AY152849-AY152851)
2. ประเทศแคนาดา (accession Nos. AY145300, AY145287-AY145296 และ AY145298-AY145299)
3. ประเทศสหรัฐอเมริกา (accession Nos. AY297748 และ AY297749)
4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C (accession No. AY187152)

โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 ผลที่ได้ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังรูปที่ 23 และผลที่ได้เหมือนกับการสร้าง phylogenetic tree ข้างต้น และเหมือนกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ CLUSTAL X คือ สามารถแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

3. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
4. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12



รูปที่ 23 แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบ

เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

โดยที่ 1F ถึง 3F และ 6F ถึง 12F คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้, APVC

คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ avian pneumovirus type C, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV จะ

แทนชื่อประเทศด้วยตัวอักษร 3 ตัวแรกตามด้วย accession No. ดังนี้ CAN คือประเทศแคนาดา, SPN

คือประเทศสเปน, USA คือประเทศสหรัฐอเมริกา และ THA คือประเทศไทย

จากนั้นทำการเปรียบเทียบ % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษานี้และลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจาก ประเทศแคนาดา (accession Nos. AY145297 และ AY145295), ประเทศสหรัฐอเมริกา (accession Nos. AY297749 และ AY297748), ประเทศสเปน (accession Nos. AY152850 และ AY145849), และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C (accession No. AY187152) (ตารางที่ 20) จากการอ้างอิงกลุ่มของ hMPV จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 นั้น (รูปที่ 23) ผลปรากฏว่า

1. กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยที่ 8-11 และ accession Nos. AY355379, AY145276 และ AY297749 มี %nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 94-99%
2. กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ 1-7, 12 และ accession Nos. AY355331, AY145277 และ AY297748 มี % nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 95-97%
3. %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 2 กลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 83-86%
4. %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษานี้กับ APV-C มีค่าระหว่าง 75-79%

ตารางที่ 20 แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-C

	CAN145297	USA297749	SPN152850	CAN145295	USA297748	SPN145849	APV-C
1F	97	97	95	84	85	85	75
2F	97	97	95	84	85	85	75
5F	97	97	95	84	85	85	75
6F	97	97	95	84	85	85	75
7F	97	97	95	84	85	85	75
12F	97	97	95	84	85	85	75
8F	84	83	86	99	94	95	79
9F	84	83	86	99	94	95	79
10F	84	83	86	99	94	95	79
11F	84	83	86	99	94	95	79

หมายเหตุ – ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ภายใน hMPV กลุ่มเดียวกัน และ ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ระหว่าง hMPV 2 กลุ่ม

ลำดับกรดอะมิโนในส่วน F gene

BLAST

เมื่อแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วเข้าโปรแกรม BLAST ปรากฏว่าลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยทั้ง 10 รายใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ hMPV มากที่สุด

CLUSTAL X

จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337) และลำดับกรดอะมิโนของ APV-C (accession No. AF187152) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X ผลที่ได้ คือ ลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยทั้ง 10 รายมีความใกล้เคียงกับ hMPV มากกว่า APV-C (รูปที่ 24) จากรูปที่ 21 พบว่าผู้ป่วยรายที่ 9 มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยรายอื่น 1 ตำแหน่ง คือ เปลี่ยนจาก A เป็น G แต่ไม่ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งนั้นเปลี่ยนแปลงไป ยังคงเป็น Glycine (G) เช่นเดิม นอกจากนั้นยังพบว่า ยังพบ cysteine ที่ conserved ในส่วน F gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง⁽³¹⁾ อีกด้วย และตำแหน่งที่สับสน คือ ตำแหน่งที่สามารถแยกจีโนมของ paramyxovirus ได้ คือ หากเป็นจีโนม *Pneumovirus* ในตำแหน่งที่ถูกสับสนในรูปที่ 24 จะต้องมีการเพิ่มกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 2 ตัว แต่ถ้าเป็นจีโนม *Metapneumovirus* จะขาดกรดอะมิโน 2 ตัวนี้ไป และลำดับกรดอะมิโนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ก็ขาดกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้ไป เพราะฉะนั้นก็เป็นการยืนยันได้ว่า hMPV ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นลำดับกรดอะมิโนของจีโนม *Metapneumovirus*

เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปที่ 21 กรดอะมิโนในกรอบสีเทา 3 ตำแหน่งจากรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโน 3 ตำแหน่งนี้อาจแบ่ง hMPV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่มตามเส้นประ และผลที่สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มนี้ มีความสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ และจาก phylogenetic tree คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

8F          -A---K-----I-----I-M-----
10F          -----I-----I-M-----
9F          -----A-----A---K-----I-----I-M-----
11F          -----A-----K-----I-----I-M-----
3F          -----K-----I-----I-M-----
7F          -----A-----A---K-----I-----I-M-----
1F          -----A-----A---K-----I-----I-M-----
12F          -----I-----I-M-----
6F          -----K-----I-----I-M-----
2F          -----A-----K-----I-----I-M-----
AF371337    -----A-----A---K-----F-----I-M-----
APVC        SLDLMTDAELVRAVSNMPTSSGQINLMLENRAMVRRKGFGLIGVYGSSVVYIVQLPIFG
    
```

```

8F          II  $ E N          K          K  T-G
10F         II  $ E N          K          K  T-G
9F          II  $ E N          K          K  T-G
11F         II  $ E N          K          K  T-G
3F          IV  $ E K          Q          K  T-G
7F          IV  $ E K          Q          K  T-G
1F          IV  $ E K          Q          K  T-G
12F         IV  $ E K          Q          K  T-G
6F          IV  $ E K          Q          K  T-G
2F          IV  $ E K          Q          K  T-G
AF371337    IV  $ G K          Q          K  T-G
APVC        VIDTFCWKVKAAPLCSGKDGNYACLRLREDQGWYCNAGSTVYYPNNEEDCEVRSDHVFCDT
    
```

```

8F          -Q-RE- I - - - N - - - -
10F          - - - - -
9F          -Q-RE- I - - - N
11F          - - - - -
3F          - - - - -
7F          - - - - -
1F          -Q-KE- I - - - N - - -
12F         -Q-KE- I - - - -
6F          -Q-KE- - - - - -
2F          - - - - -
AF371337    -Q-KE- I - - - N - - -
APVC        AAGINVAKESSEECNRNISTTKYPCKVSTGR
***
    
```

รูปที่ 24 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ในส่วน F gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง

โดยที่ 1F ถึง 3F และ 6F ถึง 12F คือ ลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้, AF371337 คือ ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์, APVC คือ ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงของ avian pneumovirus, - แทนกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง, ลูกศรแสดงตำแหน่งการขาดหายไปของไวรัสที่อยู่ในจีโนม *Metapneumovirus*, อักษรตัวหนาแสดงความแตกต่างของกรดอะมิโน, กรอบสี่เหลี่ยม คือ cysteine ที่ conserved ของไวรัสในแฟมิลี *Paramyxoviridae*, กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สามารถแบ่ง hMPV ออกได้เป็น 2 กลุ่ม, กรอบเส้นประแสดง hMPV ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

ผลสรุปในส่วน F gene

จากการใช้โปรแกรม CLUSTAL X กับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน และใช้โปรแกรม PHYLIP95 ในการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน F gene ให้ผลตรงกัน คือ hMPV ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11 โดยมี % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 97-100%
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12 โดยมี %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 100%

ใน gene ส่วนนี้พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์โดยไม่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ในผู้ป่วยรายที่ 9 เปลี่ยนจาก GGA เป็น GGG แต่กรดอะมิโนยังคงเป็น Glycine (G) เช่นเดิม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene

BLAST

จากการทำ RT-PCR ในส่วน N gene มีจำนวนน้ำล้างโพรงหลังจุ่มกึ่งที่ให้ผลบวกกับ N gene ทั้งหมด 12 ราย จึงนำน้ำล้างโพรงหลังจุ่มกึ่งทั้ง 12 รายทำ RT-PCR ส่วน L gene แต่น้ำล้างโพรงหลังจุ่มกึ่งให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ในส่วนนี้เพียง 9 รายเท่านั้น เมื่อนำผลผลิตของ gene ในส่วนนี้ทั้ง 9 ราย ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าโปรแกรม BLAST ปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ทุกเส้นใกล้เคียงกับ hMPV มากที่สุด

CLUSTAL X

ใช้โปรแกรม CLUSTAL X ในการเปรียบเทียบที่ได้ทั้งหมด 9 รายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ (รูปที่ 25) เนื่องจากในธนาคารรหัสพันธุกรรมยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-C ในส่วน L gene ในตำแหน่งเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ศึกษาในครั้งนี้ เพราะฉะนั้นการเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV จากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337) เท่านั้น หากพิจารณาคำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสี่เหลี่ยม 7 ตำแหน่งในรูปที่ 25 จะเห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันใน 7 ตำแหน่งนี้สามารถแบ่ง hMPV ออกเป็น 2 กลุ่มตามกรอบเส้นประ คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

PHYLOGENETIC ANALYSIS

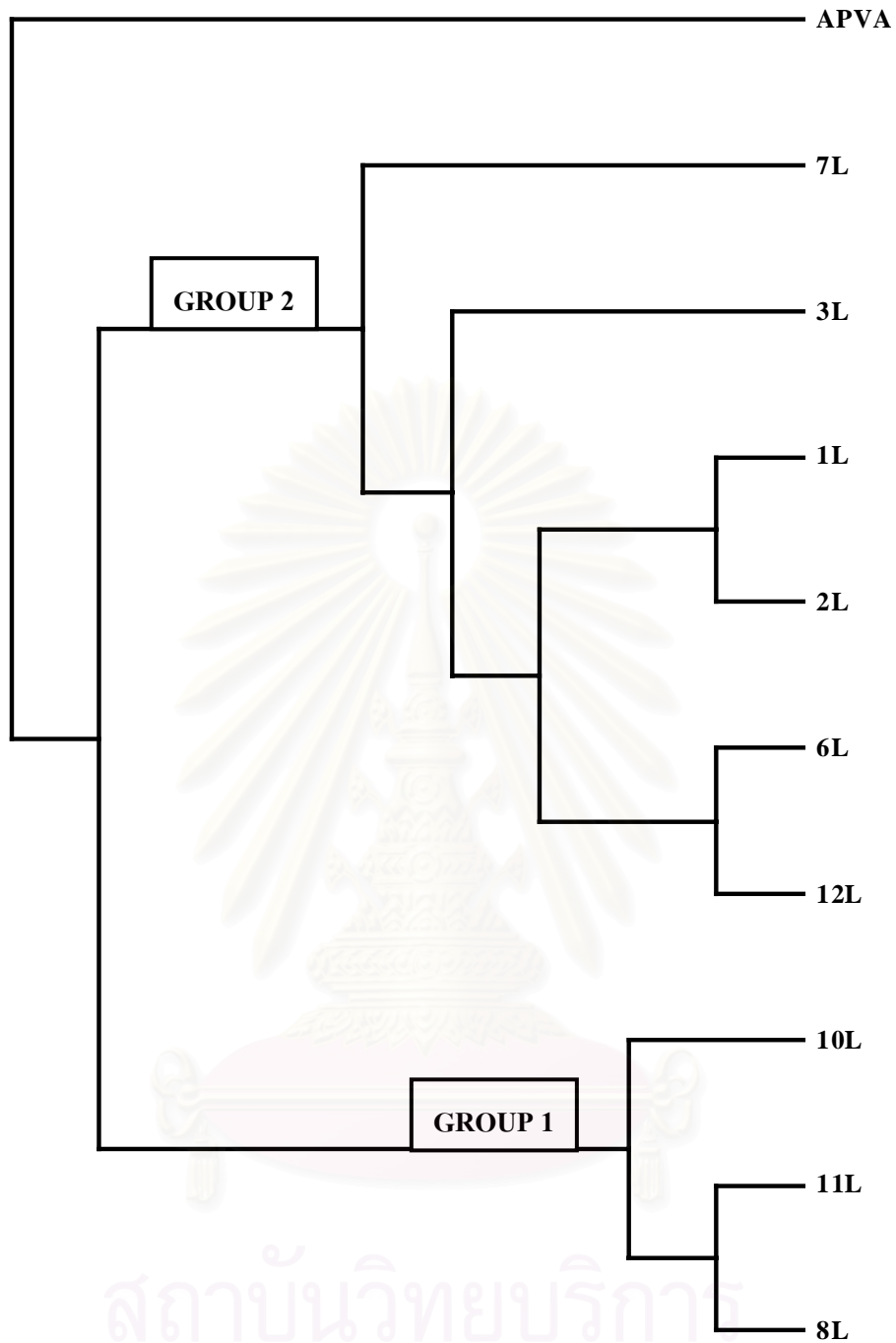
จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 9 ราย สร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-A โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 (รูปที่ 26) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ CLUSTAL X คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

		11379									
8L	-----A-----T-G-C-----	กลุ่มที่ 1									
11L	-----A-----T-G-C-----										
10L	-----A-----T-G-C-----										
7L	-----T-----T-A-T-----	กลุ่มที่ 2									
12L	-----A-----T-A-T-----										
2L	-----A-----T-A-T-----										
1L	-----A-----T-A-T-----										
6L	-----A-----T-A-T-----										
3L	-----A-----T-G-T-----										
AF371337	TCATGCCCACTATAAAAGGTCAGAAAACAGATCAGTTCCTGAACAAGAGAGAGAATTATT										
		11439									
8L	-----G-T-----G-----G-----	กลุ่มที่ 1									
11L	-----G-T-----G-----G-----										
10L	-----G-T-----G-----G-----										
7L	-----A-C-----A-----A-----	กลุ่มที่ 2									
12L	-----A-C-----A-----A-----										
2L	-----A-C-----A-----A-----										
1L	-----A-C-----A-----A-----										
6L	-----A-C-----A-----A-----										
3L	-----A-C-----A-----A-----										
AF371337	TCCATGGGAATAATCTTATTGAGTCTTTGTCAGCAGCGTTAGCATGTCATTGGTGTGGGA										
		11492									
8L	-----A-----T-----	กลุ่มที่ 1									
11L	-----A-----T-----										
10L	-----A-----T-----										
7L	-----A-----C-----	กลุ่มที่ 2									
12L	-----A-----C-----										
2L	-----A-----C-----										
1L	-----A-----C-----										
6L	-----A-----C-----										
3L	-----A-----C-----										
AF371337	TATTAACAGAGCAATGTATAGAAAATAATATTTTCAAGAAAGACTGGGGTGAC										

รูปที่ 25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยที่ 1L ถึง 3N, 6L ถึง 8L และ 10L ถึง 12L คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้, AF371337 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์, - แทนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง, อักษรตัวหนาแสดงความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์, กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแบ่ง hMPV ออกได้เป็น 2 กลุ่ม, กรอบเส้นประแสดง hMPV ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม



รูปที่ 26 แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 เฉพาะในส่วน L gene ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยที่ 1L ถึง 3L, 6L ถึง 8F และ 10L ถึง 12L คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ APVA คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ apvian pneumovirus serotype A

จากนั้นทำการเปรียบเทียบ % nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ด้วยกันเอง (ตารางที่ 21) จากการอ้างอิงกลุ่มของ hMPV จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP นั้น (รูปที่ 26) ผลปรากฏว่า

1. กลุ่มที่ 1 คือ ผู้ป่วยที่ 8 และ 10-11 มี %nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าเท่ากับ 100%
2. กลุ่มที่ 2 คือ ผู้ป่วยที่ 1-7 และ 12 มี %nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันมีค่าระหว่าง 98-100%
3. %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 2 กลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 95-96%

ตารางที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

	1L	2L	3L	6L	7L	12L	8L	10L	11L
1L	100	100	99	100	99	100	95	95	95
2L	100	100	99	100	99	100	95	95	95
3L	99	99	100	99	98	99	96	96	96
6L	100	100	99	100	99	100	95	95	95
7L	99	99	98	99	100	99	95	95	95
12L	100	100	99	100	99	100	95	95	95
8L	95	95	96	95	95	95	100	100	100
10L	95	95	96	95	95	95	100	100	100
11L	95	95	96	95	95	95	100	100	100

หมายเหตุ – ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ภายใน hMPV กลุ่มเดียวกัน และ ตารางในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึง % nucleotide similarity ระหว่าง hMPV 2 กลุ่ม

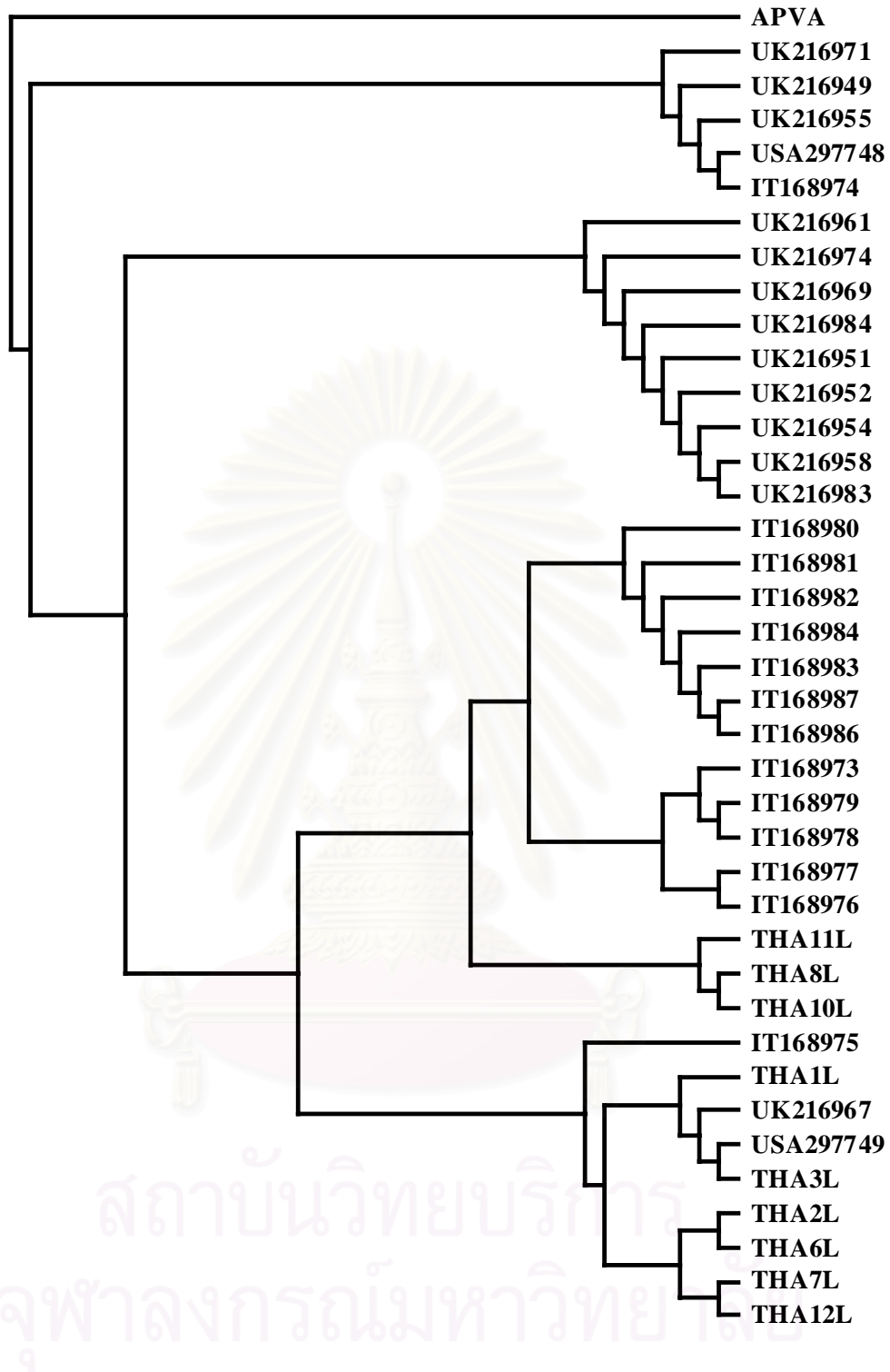
จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 9 รายโดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 สร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ทั้ง 2 กลุ่มที่ได้ ทำการศึกษาก่อนหน้านี้จาก

1. ประเทศอังกฤษ (accession Nos. AY216949, AY216951-AY216955, AY216958, AY216961, AY216967, AY216969, AY216971, AY216974 และAY216984)
2. ประเทศอิตาลี (accession Nos. AY168973-AY163984 และ AY168986-AY168987)
3. ประเทศสหรัฐอเมริกา (accession Nos. AY297748 และ AY297749)
4. APV-A

ผลที่ได้ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกได้ เป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่งจะรวมเป็นกิ่งเดียวกัน ดังรูปที่ 27

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 แสดงผลจากการใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

โดยที่ 1L ถึง 3L, 6L ถึง 8L และ 10L ถึง 12L คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้, APVA คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ avian pneumovirus type A, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV จะแทนชื่อประเทศด้วยตัวอักษรตามด้วย accession No. ดังนี้ USA คือ ประเทศสหรัฐอเมริกา, IT คือ ประเทศอิตาลี, UK คือ ประเทศอังกฤษ และ THA คือ ประเทศไทย

จากนั้นทำการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษานี้และลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจาก ประเทศอิตาลี (accession Nos. AY168973 และ AY168974), ประเทศสหรัฐอเมริกา (accession Nos. AY297749 และ AY297748), ประเทศอังกฤษ (accession Nos. AY216967 และ AY216971), และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ APV-A (ตารางที่ 22) จากการอ้างอิงกลุ่มของ hMPV จากการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP95 นั้น (รูปที่ 26) ผลปรากฏว่าไม่สามารถแยก hMPV ออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน เมื่อให้ accession Nos. AY297749, AY168973 และ AY216967 เป็นตัวแทนในกลุ่มที่ 1 และ accession Nos. AY297748, AY 168974 และ AY216971 เป็นตัวแทนอีกกลุ่ม ผลปรากฏว่า hMPV ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษานี้มีความเหมือนกันกับ accession Nos. กลุ่มแรกมากกว่า และ hMPV ในส่วน L gene นี้มี %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษานี้กับ APV-A เท่ากับ 48-50%

ตารางที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบ %nucleotide similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-A

	USA297749	IT168973	UK216967	USA297748	IT168974	UK216971	APV-A
1L	99	94	99	87	87	84	50
2L	99	94	99	87	87	84	50
3L	98	95	98	86	86	83	49
6L	99	94	99	87	87	84	50
7L	99	94	99	87	87	84	50
12L	99	94	99	87	87	84	50
8L	93	98	93	85	85	82	48
10L	93	98	93	85	85	82	48
11L	93	98	93	85	85	82	48

ลำดับกรดอะมิโนในส่วน L gene

เมื่อแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วเข้าโปรแกรม BLAST ปรากฏว่าลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยทั้ง 9 รายใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ hMPV

จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์ (accession No. AF371337) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X ผลที่ได้ คือ ลำดับกรดอะมิโนของผู้ป่วยทั้ง 9 เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ใช้อ้างอิง 100% (รูปที่ 28) เพราะฉะนั้น gene ในส่วน L นี้ เมื่อแปลงเป็นกรดอะมิโนแล้วไม่สามารถแยกความแตกต่างของ hMPV ทั้ง 2 กลุ่มได้

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment

```

1L      -----
2L      -----
3L      -----
6L      -----
7L      -----
8L      -----
10L     -----
12L     -----
AF371337 MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQCIENNIFFKDWGD

```

รูปที่ 28 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ในส่วน L gene ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง โดยที่ 1L ถึง 3L, 6L ถึง 8L และ 10L ถึง 12L คือ ลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้, AF371337 คือ ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงจากประเทศเนเธอร์แลนด์, - แทนกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลสรุปในส่วน L gene

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ของ hMPV ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้อาจไม่สามารถแยก hMPV ออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน และลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ก็ไม่สามารถจำแนกกลุ่มของ hMPV ได้ อย่างไรก็ตามการใช้โปรแกรม CLUSTAL X กับลำดับนิวคลีโอไทด์ และผลจากโปรแกรม PHYLIP95 ในการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ในส่วน F gene ให้ผลตรงกัน คือ สามารถแบ่ง hMPV ที่ได้จากการศึกษานี้ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 3 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12

ใน gene ส่วนนี้พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์โดยไม่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในผู้ป่วยรายที่ 7 เปลี่ยนจาก ATA เป็น ATT แต่กรดอะมิโนในตำแหน่งนั้นยังคงเป็น Isoleucine (I) เช่นเดิม

ผลสรุปของ hMPV ในส่วน N, F และ L gene

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์, ลำดับกรดอะมิโน และการทำ phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 gene คือ N และ F gene ผลปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม และแยกออกจาก APV-C ได้ อย่างชัดเจน ดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12

ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene จะไม่สามารถแบ่งกลุ่มของ hMPV ออกได้ อย่างชัดเจน แต่การศึกษาในครั้งนี้ก็ให้ผลสอดคล้องกับ N และ F gene คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12

Nucleotide accession No.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการ submitted ลงใน GenBank เป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยมี accession Nos. ดังนี้ AY158463-AY158465 และ AY550148 ถึง AY550156

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจ ในผู้ป่วยเด็กไทยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 227 ราย ภายในระยะเวลา 2 ปี 7 เดือน โดยการนำ RT-PCR ของ hMPV RNA ในส่วน N, F และ L gene ผลปรากฏว่าพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ hMPV ทั้งหมด 12 ราย จาก 227 ราย คิดเป็น 5.3% ของผู้ป่วยที่ได้ทำการเก็บน้ำล้างโพรงหลังหลังจมูกทั้งหมด โดยมีอัตราส่วนของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจาก hMPV ในเพศชายมากกว่าเพศหญิงเล็กน้อย คือ 3 : 1 แต่หากพิจารณาการติดเชื้อต่อจำนวนประชากรที่แท้จริงแล้วนั้นจะพบว่าอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงของการติดเชื้อ hMPV นั้นเป็น 2 : 1 (ตารางที่ 15) คือ จะพบเพศชายที่ติดเชื้อทั้งหมด 6.6% และเพศหญิง 3.3% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ที่พบอัตราการติดเชื้อ hMPV ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง^(34, 37)

จากการศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อ hMPV ในประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁰⁾ พบว่าผู้ที่อายุมากกว่า 5 ปีจะมีแอนติบอดีต่อ hMPV แล้วทุกราย แสดงว่าการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจจะเกิดขึ้นในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี และการศึกษาในครั้งนี้ก็เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁰⁾ คือ ผู้ที่ติดเชื้อ hMPV ทุกคนมีอายุน้อยกว่า 5 ปีทั้งสิ้น เมื่อพิจารณาช่วงอายุที่เกิดการติดเชื้อมากที่สุด ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV ทั้งหมดจะพบว่า 50% ของผู้ป่วยเด็กทั้งหมดที่ติดเชื้อ hMPV เป็นผู้ป่วยเด็กที่มีช่วงอายุ 1-2 ปี แต่เมื่อพิจารณาเทียบกับผู้ป่วยที่ได้ทำการเก็บน้ำล้างโพรงหลังหลังจมูกทั้งหมดจะพบว่าการติดเชื้อ hMPV มากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุ 3-4 ปี เพราะในช่วงอายุนี้มีผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาน้อยแต่พบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมากที่สุดทั้งในเพศชายและเพศหญิง อาจกล่าวได้ว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ได้รับเชื้อ hMPV ครั้งแรกนั้นอาจเป็นผู้ที่มีอายุอยู่ในช่วง 3-4 ปี ซึ่งเป็นช่วงที่เด็กออกจากบ้านบ่อยขึ้นกว่าเด็กที่อายุน้อย เพราะฉะนั้นจึงมีโอกาสที่เด็กในช่วงอายุนี้อาจได้รับเชื้อ hMPV จากสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามผลของการศึกษาไม่เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์⁽³⁷⁾ ซึ่งพบว่าอายุที่พบการติดเชื้อ hMPV มากที่สุด คือ เด็กที่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี และในการศึกษาของประเทศแคนาดา⁽⁵⁰⁾ ที่พบว่าการติดเชื้อ hMPV จะมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนประชากรในช่วงอายุ 3-4 ปีน้อยมากเพียง 21 คนเท่านั้น เพราะฉะนั้นการที่จะให้ได้ผลที่แม่นยำขึ้นก็ควรจะเพิ่มประชากรในกลุ่มนี้ให้มากขึ้นด้วย

การศึกษาในเรื่องช่วงการระบาดของการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจนั้น มีขึ้นเพื่อให้สามารถประเมินชนิดของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อเพื่อประโยชน์ในการรักษา รวมถึงการป้องกันและควบคุมโรค การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยนั้นจะเกิดมากที่สุดในช่วงปลายฤดูร้อนถึงฤดูฝน เพราะฉะนั้นการติดเชื้อ hMPV จึงน่าจะอยู่ในช่วงปลายฤดูร้อนถึงฤดูฝนเช่นกัน แต่ในการศึกษาค้นคว้านี้ พบว่าการติดเชื้อ hMPV นั้นเกิดมากในช่วงฤดูฝนถึงฤดูหนาว คือ เริ่มตั้งแต่เดือนกรกฎาคมและจะพบการติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เดือนกันยายนและจะมากที่สุดในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นฤดูหนาว ซึ่งการติดเชื้อ hMPV ในเดือนธันวาคมนั้นคิดเป็น 33.3% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมด แสดงว่าการติดเชื้อ hMPV นั้นจะเกิดการระบาดมากที่สุดฤดูหนาว แต่สามารถพบการระบาดของการติดเชื้อ hMPV ได้ในฤดูร้อน คือ เดือนเมษายน คิดเป็น 14.3% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นเพราะภูมิอากาศของประเทศไทยนั้นไม่ค่อยแน่นอน หรืออาจเป็นเพราะช่วงอากาศที่กำลังจะเปลี่ยนเข้าฤดูฝน จึงทำให้พบการติดเชื้อ hMPV ในเดือนเมษายน

ช่วงการระบาดของการติดเชื้อ hRSV ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่รุนแรงในเด็กมากที่สุดนั้น จะมีช่วงการระบาดกว้างกว่า hMPV ในประเทศไทยพบว่าช่วงการระบาดของการติดเชื้อ hRSV นั้นจะอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ดังนั้นการติดเชื้อ hRSV และ hMPV ในระบบทางเดินหายใจนั้นในช่วงคาบเกี่ยวกัน เพราะฉะนั้นจึงอาจพบการติดเชื้อร่วมของ hRSV และ hMPV ในผู้ป่วยรายเดียวกันได้ และในการศึกษาค้นคว้านี้พบผู้ป่วย 1 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 10) ที่มีการติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัส 2 ชนิดนี้ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อร่วมกันของไวรัส 2 ชนิดนี้อาจมีมากกว่านี้ เนื่องจาก hMPV นั้นเป็นไวรัสที่มีระยะฟักตัวนาน และการเก็บส่งตรวจในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจที่นั่นต้องเก็บทันทีที่มีอาการ ดังนั้นเมื่อตรวจพบเชื้อ hRSV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกด้วยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแล้วก็ไม่ได้ทำการเก็บน้ำล้างโพรงจมูกในวันอื่นต่อ ซึ่งอาจเป็นช่วงที่มี hMPV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกน้อยเพราะอาการที่เกิดขึ้นเป็นอาการที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสอื่นไม่ใช่อาการที่เกิดจากการติดเชื้อ hMPV ดังนั้นปริมาณไวรัสที่น้อยก็อาจทำให้ตรวจไม่พบการติดเชื้อ hMPV ก็เป็นไปได้

เมื่อจำแนกการพบการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจตามรายปีพบว่าในพ.ศ. 2545 พบการติดเชื้อ hMPV ที่มากกว่าทุกปี คิดเป็น 8.6% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมดในปี พ.ศ. 2545 ในขณะที่พ.ศ. 2544 พบการติดเชื้อ hMPV 5.3% ของน้ำล้างโพรงหลังจมูกทั้งหมดในปี พ.ศ. 2544 และไม่พบการติดเชื้อ hMPV ในปีพ.ศ. 2546 เพราะการศึกษาในเรื่องของช่วงการระบาดของการติดเชื้อ hMPV ในครั้งนี้พบว่ามี การติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจมากที่สุดฤดูหนาวโดยเฉพาะในเดือนธันวาคม แต่การเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกในปี พ.ศ. 2546 นั้นได้เก็บถึงเดือนตุลาคม เพราะฉะนั้นจึงทำให้พลาดการเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกในช่วงการเกิดการระบาดมากที่สุดไป จึงทำให้ตรวจไม่พบการติดเชื้อ hMPV ในที่สุด อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อ hMPV อาจมากในบางปีดังประเทศดังการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽³⁹⁾ พบว่าอัตราการติดเชื้อ hMPV ในปี พ.ศ. 2544 เท่ากับ 7% และในปีต่อมาพบอัตราการติดเชื้อ hMPV เท่ากับ 1.5% และในประเทศอิตาลี⁽³⁸⁾ ก็ได้ทำการศึกษากการติดเชื้อ hMPV เป็นระยะเวลา 3 ปี พบการติดเชื้อในแต่ละ

ปีไม่เท่ากัน คือ 7%, 37% และ 43% และอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อ hMPV มีอัตราการติดเชื้อที่น้อยในปี พ.ศ. 2546 ดังการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอิตาลีก็เป็นได้ คือ จะพบการติดเชื้อ hMPV มากในปี พ.ศ. 2545 และอาจพบการติดเชื้อ hMPV บ้างในปี พ.ศ. 2544 และ พ.ศ. 2546 แต่ในปี พ.ศ. 2546 นั้นไม่ได้ทำการเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกในช่วงการระบาด จึงทำให้ไม่พบการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในปีนั้นเอง

พบว่าอาการส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCT ของ hMPV RNA มักมีไข้และไอทุกคน ส่วนอาการหอบหายใจเรื้อรังพบในผู้ป่วยเกือบทุกราย (11/12 คน) ซึ่งอาการและอาการแสดงส่วนใหญ่เป็นอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง จึงสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ hMPV กับการมีไข้^(35-36, 42), ไอ^(34-36, 39, 42, 50,) และหอบหายใจเรื้อรัง^(35, 37) แต่การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽³⁹⁾ กล่าวว่าสามารถแยกอาการของการติดเชื้อ hMPV ออกจากการติดเชื้อ influenza ได้จากการมีไข้ เพราะจากการศึกษา hMPV ไม่ทำให้เกิดไข้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเด็กทุกรายมีไข้ บางการศึกษาพบว่าอาการของการติดเชื้อ hMPV นั้นจึงมีความสัมพันธ์กับอาการหายใจเสียงดัง (wheeze)⁽⁴³⁾ แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ hMPV และอาการหายใจเสียงดังเพียง 25% เท่านั้น พบว่าการหายใจเสียงดังจะสัมพันธ์กับผู้ที่มีประวัติครอบครัวเป็น allergic disease และในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ hMPV มีประวัติครอบครัวเป็น allergic disease ดังนั้น hMPV เพราะฉะนั้นจึงทำให้การศึกษารหัส hMPV ในครั้งนี้มีความสัมพันธ์กับอาการหายใจเสียงดังน้อย

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การติดเชื้อ hMPV นั้นมักทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและส่วนล่าง โดยเฉพาะหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) และปอดอักเสบ (pneumonia) และการติดเชื้อ hRSV และ influenza นั้นจะทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้เช่นกัน จึงทำให้ไม่สามารถแยกจากอาการของการติดเชื้อ hRSV^(30, 35, 39, 43-44, 48-49) และ influenza^(46, 50) ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ก็เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาในประเทศอื่นๆ ที่พบว่า hMPV นั้นทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เพราะผู้ป่วยเด็กที่ให้ผลบวกกับการทำ RT-PCR ของ hMPV ทุกรายนั้นได้รับการวินิจฉัยจากกุมารแพทย์ว่าเป็นปอดอักเสบ นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติในการเอกซเรย์ปอดของผู้ป่วยทุกราย ซึ่ง 66.7% เป็นการผิดปกติแบบ perihilar infiltration จึงสามารถสรุปได้ว่าการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กนั้นสัมพันธ์กับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างจริง เพราะอาการและอาการแสดง รวมถึงการวินิจฉัยจากแพทย์และการเอกซเรย์ปอดก็สัมพันธ์กับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างทั้งสิ้น

นอกจากอาการที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินหายใจแล้ว hMPV อาจทำให้เกิดอาการในระบบอื่นๆ ได้เช่นกัน เช่นในการศึกษาในประเทศฝรั่งเศสและฮ่องกง^(36, 44) ที่พบการติดเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียและมีไข้สูงแต่ไม่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ หรือมีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและมีอาการท้องเสียร่วมด้วย และในการศึกษาครั้งนี้อาการทางระบบทางเดินอาหารด้วย 3 ราย คือ ท้องเสีย ในผู้ป่วยรายที่ 1, รายที่ 10 และผู้ป่วยรายที่ 12 แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย ซึ่งอาจเป็นเพราะการติดเชื้อร่วมกับ Rotavirus ที่เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการท้องเสียที่สำคัญในเด็กก็เป็นได้ และ Rotavirus นั้นเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียที่มีช่วงการระบาดในฤดูหนาว และช่วงการระบาดของเชื้อ hMPV ในครั้งนี้ก็เป็นช่วงฤดูหนาวเช่นกัน และผู้ป่วยเด็ก 3 รายนี้ก็เป็นการติดเชื้อ hMPV ในช่วงฤดูหนาว จึงเป็นไปได้ที่จะพบการติดเชื้อร่วมกับ Rotavirus

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า 91.7% ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ทั้งหมด ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยที่มีระยะเวลาในการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเฉลี่ย คือ 6 วัน (1-14 วัน) แสดงว่าการติดเชื้อ hMPV ก็มีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการที่รุนแรง เพราะเด็กถึง 11 ราย (91.7%) ที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล แต่ด้วยการออกแบบการศึกษาในครั้งนี้เน้นการเก็บน้ำล้างโพรงหลังจมูกในเด็กที่มีอาการของติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กมักมีอาการรุนแรง ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่จะพบการติดเชื้อ hMPV เฉพาะที่มีอาการรุนแรงเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าจะมีผู้ป่วยเด็ก 1 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 4) ที่ไม่ได้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลก็ตาม เพราะเป็นผู้ป่วยเด็กรายเดียวที่ไม่มีอาการหอบหายใจลำบาก แพทย์จึงให้กลับไปรักษาตัวที่บ้านได้โดยไม่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล แต่การวินิจฉัยจากแพทย์ยังคงระบุว่าผู้ป่วยเด็กรายนี้เป็นปอดอักเสบ อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าการติดเชื้อ hMPV นั้นสัมพันธ์กับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่รุนแรง

ผู้ป่วยเด็กที่พบว่าติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในการศึกษาครั้งนี้ประมาณครึ่งหนึ่งที่มีโรคประจำตัว ไม่ว่าจะเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด 3 คน (25% ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ทั้งหมด), โรคปอด 2 คน (16.7% ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ทั้งหมด) และ congenital rubella syndrome 1 คน (8.3% ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ทั้งหมด) ผู้ป่วยเด็กที่มีโรคประจำตัวทั้ง 6 คนมีแนวโน้มการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่มีระยะเวลานานกว่าผู้ป่วยเด็กที่ไม่มีโรคประจำตัว นั่นคือ ผู้ป่วยเด็กที่มีโรคประจำตัวจะมีระยะเวลาการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลตั้งแต่ 0-14 วัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเท่ากับ 7.3 วัน ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่มีโรคประจำตัวนั้นมีระยะเวลาการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่สั้นกว่า คือ ตั้งแต่ 1-7 วัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเท่ากับ 3.7 วัน จะเห็นว่าผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวจะมีแนวโน้มการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลที่นานกว่า ซึ่งอาจหมายถึงอาการของการติดเชื้อ hMPV ที่รุนแรงกว่าก็เป็นได้ ดังนั้นจึงอาจมีความความสัมพันธ์ของการมีโรคประจำตัวต่อความรุนแรงของอาการเมื่อผู้ป่วยติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาที่พบว่าพบว่ามี 1 ใน 3 ของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อ hMPV จะมีประวัติของการคลอดก่อนกำหนดหรือเป็นโรคหัวใจ และการศึกษาผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปีในประเทศแคนาดา⁽³⁵⁾ พบว่า 4 ใน 12 รายที่

พบการติดเชื้อ hMPV นั้นคลอดก่อนกำหนดหรือมีโรคประจำตัว ซึ่งอาจเป็นเพราะการมีโรคประจำตัวนั้นทำให้ร่างกายมีความอ่อนแออยู่แล้ว เมื่อเกิดการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจซ้ำอีก ก็อาจยิ่งส่งผลทำให้เกิดอาการที่รุนแรงกว่าเด็กปกติได้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยรายที่ 4 มีโรคปอดเป็นโรคประจำตัว ถึงแม้ว่าผู้ป่วยรายนี้จะได้รับการวินิจฉัยเป็นปอดอักเสบก็ตาม แต่ก็ไม่ได้มีอาการรุนแรงจนกระทั่งต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล สามารถสรุปได้ว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงกับการติดเชื้อ hMPV กับผู้ที่มีโรคประจำตัว ถึงแม้ว่าจะผู้ป่วยรายหนึ่งที่มีโรคประจำตัวแต่ไม่ได้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลก็ตาม แต่ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวที่เหลือ 5 คนก็มีระยะเวลาการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลนานกว่าเด็กปกติ

ในการศึกษาจากประเทศสหรัฐอเมริกาก่อนหน้านี้⁽⁵⁷⁾ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N, F และ L gene นั้นเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงน้อย (conserved) ทั้ง 3 ส่วน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV โดยใช้วิธี RT-PCR ในส่วน N gene เหตุผลที่เลือก N gene ในการตรวจกรองคือ ในขณะที่ได้ทำการออกแบบการทดลองนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV อยู่ใน GenBank เพียงเส้นเดียว คือ ส่วน N gene (accession No. AF371337) จึงได้ทำการออกแบบ primers ในส่วน N gene และตรวจกรองน้ำล้างโพรงหลังจมูกในส่วน N gene เมื่อมีการรายงานการพบการติดเชื้อ hMPV ที่มากขึ้น จึงได้ศึกษาถึงการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในส่วนอื่น คือ F gene และ L gene และจากการศึกษาต่อมาพบว่า hMPV ในส่วน N gene นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ APV-C (ซึ่งเป็นไวรัสที่เหมือนกับ hMPV มากที่สุด แต่ไม่สามารถก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) 52% และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ hRSV (เป็นไวรัสของมนุษย์ที่ใกล้เคียงกับ hMPV มากที่สุด และทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอย่างรุนแรงในเด็ก) เพียง 70% เท่านั้น เพราะฉะนั้นการเกิด cross-reaction ในการเพิ่มจำนวนของ APV-C หรือ hRSV จึงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV โดยใช้ N gene จึงเป็นทางเลือกที่ดี เพราะไม่มีปัญหาในการเกิดการเพิ่มจำนวนไวรัสอื่น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดผลบวกปลอมได้

เพื่อไม่ให้เป็นการสิ้นเปลืองวัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง การออกแบบการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV โดยเพิ่มจำนวน hMPV เพียงส่วนเดียวเท่านั้น คือ ส่วน N gene จึงนำน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวกทำการเพิ่มจำนวนในส่วน F gene และ L gene ต่อไป แต่การเพิ่มจำนวน hMPV RNA ของผู้ป่วยรายที่ 4, 5 และ 9 นั้นได้ไม่ครบทั้ง 3 gene เนื่องจากน้ำล้างโพรงจมูกไม่เพียงพอในการทำการศึกษา

การออกแบบการทดลองในครั้งนี้ได้ใช้ β -actin เป็น internal control ในการทำ RT-PCR ไม่ว่าจะเป็นการตรวจกรองการติดเชื้อ hMPV ในส่วน N gene หรือการเพิ่มปริมาณ hMPV RNA ในส่วน F gene และ L gene ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกที่ให้ผลบวก ผลปรากฏว่าการทำ RT-PCR ของ β -actin ควบคู่ไปกับการทำ RT-PCR ของ hMPV ทุกครั้ง β -actin จะให้ผลบวกเสมอ ถึงแม้ว่าเมื่อเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสแล้ว ไวรัสจะมีกระบวนการในการสร้างโปรตีนเพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ mRNA ของ host เพื่อที่จะได้ทำการ translate โปรตีนของไวรัสเองได้อย่างเต็มที่ จากนั้นเมื่อสร้างโปรตีนในการยับยั้งการสร้าง mRNA ของ host แล้ว ไวรัสจึงจะทำการเพิ่มจำนวน (replication) และเริ่มกระบวนการ transcription และกระบวนการ translation ของไวรัสต่อไป แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยทุกรายให้ผลบวกกับ β -actin และผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับ hMPV ก็ให้ผลบวกกับ β -actin เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะ paramyxovirus บางตัวจะมีผลต่อการยับยั้งการสร้าง mRNA ของ host น้อยมาก และกระบวนการอาจไม่ใช่การยับยั้งการสร้าง mRNA ของ host ก็ได้ อาจเป็นเพียงกระบวนการยับยั้งการขนส่ง mRNA จาก nucleus สู่ cytoplasm ก็เป็นไปได้ และกระบวนการในด้านนี้ของ hMPV ก็ยังไม่ได้มีผู้ใดทำการศึกษา

หลังจากการทำ RT-PCR ในส่วน N, F และ L gene และนำผลผลิตที่ได้ของผู้ป่วยแต่ละรายในแต่ละ gene ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยการใช้ทั้ง forward primer และ reverse primer เมื่ออ่านผลเทียบกันแล้วปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทุกเส้นให้ผลที่ตรงกันทั้ง forward primer และ reverse primer ผู้ป่วยแต่ละรายที่ให้ผลบวกกับ hMPV RNA จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ทั้งหมด 3 gene คือ N, F และ L gene ยกเว้นผู้ป่วยรายที่ 4 และ 5 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงส่วน N gene เท่านั้น และผู้ป่วยรายที่ 9 ที่ขาดลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เข้าโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกเส้นทั้ง 3 gene ใกล้เคียงกับ hMPV ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้มากที่สุด แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV จริง เพราะมีความใกล้เคียงกับ hMPV มากที่สุด แต่ผลจากการใช้โปรแกรมเดียวกันในการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของลำดับกรดอะมิโน ผลคือลำดับกรดอะมิโนเกือบทุกเส้น มีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ทั้งสิ้น ยกเว้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยรายที่ 1 ในส่วน N gene เท่านั้นที่มีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ APV-C ซึ่งอาจเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N gene ของผู้ป่วยรายนี้อ่านได้สั้นมากเมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยรายอื่น คือ เพียง 159 เบสเท่านั้น ในขณะที่ผู้ป่วยรายอื่นอ่านได้มากกว่า 230 bp ดังนั้นเมื่อแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นโปรตีนก็就会有ความยาวของลำดับกรดอะมิโนเพียง 52 amino acid เท่านั้น แต่ผู้ป่วยรายอื่นอ่านลำดับกรดอะมิโนได้มากกว่า 70 amino acid ดังนั้นการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจึงได้เพียงช่วงสั้นเท่านั้น อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยรายนี้เมื่อใช้โปรแกรม BLAST แล้วยังคงให้ผลเหมือนกับ hMPV มากที่สุด แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผู้ป่วยรายที่ 1 นั้นเป็นลำดับกรดอะมิโนของ hMPV แต่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นเกินไป จึงทำให้เกิดปัญหาในการแปลงเป็นโปรตีน

ผลจากการใช้โปรแกรม CLUSTAL X ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 gene พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 gene นั้นมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน และเป็นไปในทางเดียวกันทั้ง 3 gene นั่นคือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11 และ กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12 และสำหรับการใช้โปรแกรม CLUSTAL X ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 3 gene พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ N และ F gene นั้นมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน และเป็นไปในทางเดียวกัน นั่นคือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11 และ กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12 แต่ลำดับกรดอะมิโนในส่วน L gene นั้นไม่สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มได้เลย อาจเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้สั้นมาก เพียง 171 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น เพราะฉะนั้นการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนในส่วนนี้จึงมีความยาวเพียง 56 amino acid เท่านั้น และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์นั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตัวหลังสุดของ codon ดังนั้นจึงไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง หรืออาจเป็นเพราะ hMPV เป็น negative single-stranded RNA virus ดังนั้นจึงต้องมีเอนไซม์ RNA dependent RNA polymerase ในการสร้าง mRNA จาก RNA และ L gene มีหน้าที่ในการสร้าง เอนไซม์นี้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ gene ส่วนนี้จะเป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนน้อย (conserved) เพราะการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์นั้นจะเป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนไปด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโปรตีนของเอนไซม์นั้นอาจทำให้เอนไซม์เสียหายได้ เพราะฉะนั้นใน gene ส่วนนี้จึงเป็น gene ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนน้อยเพื่อคงหน้าที่ไว้

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (hMPV accession No. AF371337 และ APV-C) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (base substitution) ดังนี้

1. ส่วน N gene - พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในผู้ป่วย 2 ราย คือ
 - ผู้ป่วยรายที่ 4 (4N) เป็นการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A เป็นการแทนที่แบบ transition เพราะเป็นการแทนที่ของเบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีน และการแทนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจาก D เป็น N (missense mutation)
 - ผู้ป่วยรายที่ 10 (10N) เป็นการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A เป็นการแทนที่แบบ transition และการแทนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจาก V เป็น I (missense mutation)
2. ส่วน F gene - พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในผู้ป่วย 1 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 9 (9F) เป็นการแทนที่จาก G เป็น A เรียกว่าเป็นการแทนที่แบบ transition แต่การแทนที่ในตำแหน่งนี้ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปยังคงเป็น G เช่นเดิม (silent mutation)
3. ส่วน L gene - พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในผู้ป่วย 1 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 7 (7L) เป็นการแทนที่จาก A เป็น T เรียกว่าเป็นการแทนที่แบบ transversion เพราะเป็นการแทนที่ของเบสพิวรีน

ด้วยเบสไพริมิดีน แต่การแทนที่ในตำแหน่งนี้ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปยังคงเป็น I เช่น เดิม (silent mutation)

Van Den Hoogen และคณะ⁽³¹⁾ พบว่าลำดับกรดอะมิโนของไวรัสในแฟมิลี *Paramyxoviridae* ในส่วน F นั้นจะประกอบไปด้วยหน่วยย่อย F₁ และ F₂ ซึ่งจะเชื่อมกันด้วย fusion domain และทั้ง 2 หน่วยย่อยนี้จะมีกรดอะมิโน Cysteine (C) ที่ conserved ทั้งหมด 14 ตำแหน่ง แบ่งเป็น F₁ จะมี cysteine ที่ conserved ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง และ F₂ จะมี cysteine ที่ conserved อีก 2 ตำแหน่ง จึงได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 10 รายกับลำดับกรดอะมิโนในส่วน F gene พบว่า hMPV ในส่วนที่ทำการศึกษานั้นเป็นช่วงหนึ่งของ F₁ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงแล้ว ช่วงที่ทำการศึกษาคงต้องมี cysteine ที่ conserved ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง และในผู้ป่วยที่ทำการศึกษาทั้ง 10 รายก็พบ cysteine ที่ conserved ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ดังรูปที่ 19 จึงกล่าวได้ว่าไวรัสที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นไวรัสที่เป็นสมาชิกของในแฟมิลี *Paramyxoviridae* จริง

นอกจากนั้นลำดับกรดอะมิโนของจีโนมของไวรัส *Metapneumovirus* ในส่วน F ที่มี APV-C เป็นสมาชิกนั้นจะสั้นกว่าลำดับกรดอะมิโนของจีโนมของไวรัส *Pneumovirus* ที่มี hRSV เป็นสมาชิกหลายตำแหน่ง จากตำแหน่งที่รหัสในรูปที่ 19 จะสามารถบอกได้ว่าหากลำดับกรดอะมิโนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีเป็นลำดับกรดอะมิโนของจีโนม *Pneumovirus* จะต้องมีการเพิ่มขึ้นมาอีก 2 ตัว เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าลำดับกรดอะมิโนของ hMPV ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นลำดับกรดอะมิโนของจีโนม *Metapneumovirus*

การทำ phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 gene คือ N, F และ L gene กับ APV-C หรือ APV-A โดยไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงปรากฏว่าผลการทำ phylogenetic tree ให้ผลตรงกัน คือ สามารถจำแนก hMPV ในการศึกษาครั้งนี้จากผู้ป่วยจำนวน 12 คน ออกเป็น 2 กลุ่ม นอกจากนั้นผลที่ได้ยังสอดคล้องกับการใช้โปรแกรม CLUSTAL X (โดยการสังเกตจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน) ดังที่กล่าวข้างต้น นั่นคือ

1. กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11
2. กลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12

นอกจากนั้นการคำนวณ %nucleotide similarity ในส่วน N และ F gene นั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกันมากภายในกลุ่มเดียวกัน คือ 99-100% และ 97-100% ตามลำดับ ซึ่งให้ %nucleotide similarity ใกล้เคียงกับประเทศอื่นๆ ที่มี % nucleotide similarity ของ 2 gene นี้ในช่วง 93-100% ทั้ง 2 gene^(32, 45, 47, 50, 56) และ %nucleotide similarity ระหว่าง hMPV 2 กลุ่มในส่วน N และ F gene มีค่าเท่ากับ 87-88% และ 81-84% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับ % nucleotide similarity ใกล้เคียงกับประเทศอื่นเช่นกัน^(32, 45, 47, 50, 56-57) เพราะฉะนั้นการทำ phylogenetic tree ของทั้ง 2 gene นี้จึงสามารถแยกกลุ่มของ hMPV ออกได้อย่างชัดเจน ในทางตรงกันข้าม hMPV ในส่วน L gene นั้นมี %nucleotide similarity ภายในกลุ่มเดียวกันเท่ากับ 98-100% ซึ่งใกล้เคียงกับ %nucleotide similarity ในประเทศอื่น⁽⁵⁶⁾ และ %nucleotide similarity ระหว่างกลุ่มเหมือนกันสูงมาก คือ 94-96% ซึ่งเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในส่วน L gene นี้มีการเปลี่ยน

แปลงน้อยมาก (conserved) จากการศึกษาค่า % nucleotide similarity ในส่วน L gene ในประเทศอื่นพบว่ามีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 83-85%^(56, 58) จะเห็นว่า % nucleotide similarity ของ hMPV ในส่วน L gene ที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าในครั้งนี้สูงกว่าประเทศอื่นมาก แต่อย่างไรก็ตามการทำ phylogenetic tree ในส่วน L gene ก็ยังสามารถแยก hMPV ออกได้เป็น 2 กลุ่มเช่นกัน

ผลจากการทำ phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม PHYLIP 95 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N และ F gene ยังคงให้ผลตรงกับการทำ phylogenetic tree เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกันเอง คือ สามารถแบ่ง hMPV จากการศึกษาค้นคว้าในครั้งนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 8, 9, 10 และ 11 และกลุ่มที่ 2 จำนวน 8 ราย คือ ผู้ป่วยรายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 12 และ %nucleotide similarity ของทั้ง 2 gene ทั้งภายในกลุ่มผลระหว่างกลุ่มยังคงให้ผลไม่แตกต่างจากเดิม แต่ผลการสร้าง phylogenetic tree ในส่วน L gene เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและ APV-A ให้ผลต่างออกไป คือ ไม่สามารถแยกกลุ่มของ hMPV ออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อยเท่านั้น เพราะการเปรียบเทียบ % nucleotide similarity ระหว่าง 2 กลุ่มใน gene ส่วนนี้มีสูงมากคืออยู่ในช่วง 95-96% ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า % nucleotide similarity ของทั้ง 2 กลุ่มจะมีค่าประมาณ 83-85%^(56, 58) แต่ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันสูงกว่ามากจึงเป็นสาเหตุที่ไม่สามารถแบ่ง hMPV จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นกลุ่มอย่างชัดเจน จากตารางการคำนวณ %nucleotide similarity ระหว่าง L gene กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงนั้นให้ผลต่างจาก N และ F gene เพราะ hMPV ที่คาดว่าจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มนั้น ที่ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงเพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น อีกกลุ่มหนึ่งก็มีความเหมือนเพียง 80% เท่านั้น ดังนั้นการทำ phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจึงไม่สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มได้ อย่างไรก็ตามการแบ่ง hMPV ในส่วนนี้ออกเป็นกลุ่มย่อยก็ยังให้ผลตรงกับการใช้โปรแกรม CLUSTAL X และการสร้าง phylogenetic tree (โดยใช้เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ศึกษาในครั้งนี้กับ APV-A เท่านั้น) คือ สามารถแบ่งนิวคลีโอไทด์ในส่วน L gene ออกได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับการแบ่งกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน N และ F gene และอาจสรุปได้ว่า hMPV ที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยมาก (conserved) เพราะการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้เป็นลำดับกรดอะมิโนให้ผลเหมือนกันทั้ง 2 กลุ่ม ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น

จากการคำนวณ %nucleotide similarity ของ hMPV ที่ได้ทำการศึกษาทั้ง 3 gene กับ APV-C และ APV-A ให้ผลว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ที่ทำการศึกษานั้นมีความเหมือนกับ APV น้อย โดยเฉพาะกับ APV-A เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า hMPV นั้นไม่ใช่ APV และเป็นไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *Paramyxoviridae* และอยู่ในจีนัส *Metapneumovirus* ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กไทยในครั้งนี้ให้ผลสรุปว่า hMPV ที่พบในประเทศไทยนั้นมี 2 สายพันธุ์ และหากต้องการการแยกสายพันธุ์ hMPV ที่คืนนั้น ควรจะใช้การเพิ่มจำนวน hMPV ในส่วน N และ/หรือ F gene มากกว่า L gene และการพบ hMPV 2 สายพันธุ์นี้อาจกล่าวได้ว่า hMPV มีความหลากหลายของแอนติเจน (antigenic diversity) หมายความว่า hMPV ที่เกิดขึ้นทั้ง 2 สายพันธุ์อาจทำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน เพราะฉะนั้นการเกิดการติดเชื้อ (reinfection) ซ้ำของ hMPV จึงสามารถเกิดขึ้นได้จากการติดเชื้อ hMPV ต่างสายพันธุ์กันนั่นเอง แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถแยกอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจทั้ง 2 กลุ่มนี้ได้

ในปี พ.ศ. 2545 พบการติดเชื้อ hMPV ทั้ง 2 กลุ่มภายในปีเดียวกันเช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศแคนาดา⁽³⁵⁾ ที่พบการระบาดของ hMPV 2 สายพันธุ์ในปีเดียวกัน โดยสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยรายที่ 8-11 เป็นสายพันธุ์เดียวกันและ hMPV ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เหลือเป็นอีกหนึ่งสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยรายที่ 8-11 นั้นเป็นช่วงเวลาที่ดีกัน คือ ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าช่วงเดือนดังกล่าวอาจเป็นช่วงการระบาดของ hMPV ในสายพันธุ์นี้ก็เป็นได้ เพราะการพบ hMPV ในผู้ป่วยที่เหลือเป็นช่วงเวลาที่ยากก่อนและหลังจากช่วงนี้

การศึกษาการติดเชื้อ hMPV ในผู้ป่วยเด็กในประเทศไทยโดยการทำ RT-PCR ของ hMPV RNA ในยีนส่วน N, F และ L พบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อเท่ากับ 5.3% โดยพบอัตราการติดเชื้อในเด็กชายมากกว่าเด็กหญิงเล็กน้อย ช่วงการระบาดของ การติดเชื้อ hMPV นั้นจะเกิดขึ้นในช่วงปลายฤดูฝนถึงฤดูหนาว แต่การติดเชื้อจะเกิดมากในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นฤดูหนาว ซึ่งเป็นช่วงที่มีการระบาดของ การติดเชื้อ hRSV ในระบบทางเดินหายใจจึงทำให้พบการติดเชื้อร่วมกับการติดเชื้อ hRSV ในผู้ป่วยเด็กรายหนึ่ง อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ hMPV นั้นมักเป็นอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง คือ ไข้, ไอ และหอบหายใจลำบาก รวมถึงมีความผิดปกติในการเอกซเรย์ปอด และการวินิจฉัยจากกุมารแพทย์พบว่าเด็กที่ติดเชื้อ hMPV ทุกรายเป็นปอดอักเสบ และการมีโรคประจำตัวก็อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้การติดเชื้อ hMPV ในระบบทางเดินหายใจมีอาการที่รุนแรงขึ้น และการศึกษาสายพันธุ์ของ hMPV ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย พบว่า hMPV สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ และการระบาดของทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถเกิดได้ภายในปีเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา hMPV ควรมีการศึกษาในด้านอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้ผลของการศึกษากว้างขึ้นในหลายด้าน เช่น

1. การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเท่านั้น ฉะนั้นยังคงมีกลุ่มเด็กที่เกิดมีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน เพราะฉะนั้นจึงยังขาดการศึกษาการติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่มนี้ เนื่องจากการศึกษาบางการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า hMPV สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างได้บ้างเช่นกัน ดังนั้นควรจะทำการศึกษาในผู้ที่มีอาการน้อยด้วย

2. นอกจาก hMPV จะทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กแล้ว hMPV ก็ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในผู้ใหญ่ได้เช่นกัน เพราะฉะนั้นในการศึกษาต่อไปก็ควรศึกษาในประชากรกลุ่มนี้ เพื่อสังเกตอุบัติการณ์การติดเชื้อที่เกิดขึ้นด้วย
3. บางการศึกษาก่อนหน้านี้พบการติดเชื้อ hMPV ในน้ำล้างโพรงหลังจมูกแต่ไม่มีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เพราะฉะนั้นการศึกษานี้จึงเป็นที่น่าสนใจ เพราะเป็นผู้ที่มีเชื้อไวรัสอยู่ในร่างกาย แต่ร่างกายมีกลไกในการทำให้ไม่เกิดอาการขึ้นได้
4. การศึกษาการติดเชื้อ hMPV เพิ่มในพื้นที่อื่นก็เป็นที่น่าสนใจในการทำการศึกษาต่อ เพราะการติดเชื้อ hMPV นั้นอาจไม่เท่ากันในหลายพื้นที่ เนื่องจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ภาวะโภชนาการ ดังนั้นการศึกษารูปร่างของการติดเชื้อ hMPV ที่แน่นอนในประเทศไทยก็ควรจะทำการศึกษาในหลายที่หลายจังหวัดอีกด้วย
5. การติดเชื้อร่วมกับไวรัสหรือแบคทีเรียอื่นก็ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในด้านของการทำให้เกิดอาการของการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้นหรือไม่
6. จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าจะแยกความแตกต่างของ 2 กลุ่ม คือ hRSV-A และ hRSV-B ซึ่งเป็นไวรัสที่อยู่ใน subfamily เดียวกับ hMPV โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน G gene ถึงแม้ว่าทั้ง G gene และ F gene จะเป็น surface protein ที่ใช้ในการจับกับ host receptor ก็ตาม แต่ส่วน F gene ของ hRSV นั้นมีการเปลี่ยนแปลงน้อย และส่วน G gene ค่อนข้างมีการเปลี่ยนแปลงมาก⁽⁶³⁻⁶⁴⁾ เพราะฉะนั้นในกรณีของ hRSV จึงใช้ G gene ในการแยกกลุ่ม การศึกษาก่อนหน้านี้⁽³¹⁾ พบว่าทั้ง 2 gene นี้ของ hMPV ไม่มีความใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตใดๆ จึงคาดว่า SH และ G gene น่าจะเป็น gene ที่กำหนด host range ของ hMPV และในส่วน SH และ G gene มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มของ hMPV เพียง 59% และ 39% ตามลำดับ⁽⁵⁷⁾ นอกจากนี้ถึงแม้ว่า F gene จะเป็น surface protein ด้วยก็ตาม แต่หลายการศึกษาก็ให้ผลตรงกันว่า F gene เป็นส่วนที่เปลี่ยนแปลงน้อย ดังนั้นการจำแนกกลุ่มของ hMPV ที่ชัดเจนควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SH และ G gene ด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้แม้จะพบว่า hMPV ในส่วน L gene นั้นไม่สามารถแยกกลุ่มออกได้อย่างชัดเจนก็ตาม แต่การแยกกลุ่มของ hMPV ที่อาจให้ความถูกต้องมากขึ้นก็ควรจะใช้ G และ/หรือ SH gene ในการยืนยันการแยกกลุ่มของ hMPV ด้วย

รายการอ้างอิง

1. Hwikkinen T, Jarvinen. The common cold. **Lancet** 2003 ; 361 : 51-9.
2. ประมวล สุนากร, ลดาวัลย์ ชื่นจิต, สมเกียรติ นิลวัช, มุกดา หวังวีรวงศ์, ชื่นฤดี ไชยวสุ, อัญชลี เครือตราชู และคณะ. โรคติดเชื้อเฉียบพลันของทางเดินหายใจชนิดรุนแรงในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี การศึกษาสาเหตุและอาการทางคลินิก. แผนงาน THA RPD 003.
3. Puthavathana P, Wasi P, Kositanont U, Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Kantakamalakul W, et al. A hospital-base study of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children, with emphasis on laboratory diagnosis. **Rev Infect Dis** 1990 ; 12 : S988-94.
4. Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Watthana-kasetr, Sirinavin S, Ruangkanhanasetr S, Hotrakitya S, et al. A study of nonbacterial agent of acute lower respiratory tract infection in Thai children. **Rev Inf Dis** 1990 ; 12 : S923-8.
5. Bulla A, Hrrze KL. Acute respiratory infections: a review. **Bulletin of the world health organization** 1978 ; 56 : 481-98.
6. ประสาทนีย์ จันท. การควบคุมการติดเชื้อในการดูแลรักษาทางระบบหายใจ. ใน : ชีรชัย ฉันทโรจน์ศิริ, สุภรี สุวรรณจุฑะ, ดรุณี ชุมพะวัต, เสริมศรี สันคิต, บรรณาธิการ. **ปัญหาที่พบบ่อยทางระบบหายใจในเด็ก การวินิจฉัยและการบำบัดรักษา**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : ห้างหุ้นส่วนจำกัดภาพพิมพ์ ; 2531 : 197-9.
7. Milner AD, O'Callaghan CL. Acute respiratory infections in children. In : Brewis RAL, Corrin B, Geddes DM, Gibson GJ, editors. **Respiratory medicine**. London : W.B. Saunders ; 1995 : 747.
8. Murray CJL, Lopez AD, Malthers CD, Stein C. The global burden of disease 2000 project: aims, methods and data sources. **Global Programme on Evidence for health policy**. Geneva, Switzerland : World Health Organization ; 2001.
9. Darnage SC, Rajapaksa LC, Fernando DN. Risk factors of acute lower respiratory tract infections in children under five years of age. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 1996. ; 27 ; 107-10.
10. World Health Organization. The world health report 2000. **Health systems: improving performance**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.

11. Wattanasri S. Epidemiology of acute respiratory infections. In : Bowornkiti S, Pusapakorn R, editors. **Respiratory infections**. Bangkok : Aksornsmmai Press, 1988 : 793-816.
12. Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. **World Health Stat Q** 1992 ; 45 : 180-91.
13. Milner AD, O'Callaghan CL. Acute respiratory infections in children. In : Brewis RAL, Corrin B, Geddes DM, Gibson GJ, editors. **Respiratory medicine**. 2nd ed. London : W.B. Saunders ; 1995 : 747.
14. Glezen WP, Denny FW. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. **N Engl Med** 1973 ; 288 : 498.
15. Van Woensel JBM, Van Aalderen WMC, Kimpen JLL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. **BMJ** 2003 ; 327 : 36-40.
16. Glezen WP. Diagnosis of viral respiratory illness. In : Chernick V, Kindig EL, editors. **Kindig's disorders of the respiratory tract in children**. Philadelphia : W.B. Saunders ; 1990 : 388-90.
17. Deforest A, Mortensen JE. Rapid laboratory diagnosis of viral and bacterial respiratory infections. In: Schidlow DV, Smith DS, editors. **A practical guide to pediatric respiratory diseases**. 1st ed. Philadelphia : Hanley & Belfus ; 1994 : 271.
18. Rose RM, Pinkston P, O' Donnell C, Jensen WA. Viral infection of the lower respiratory tract. **Clin Chest Med** 1987 ; 8 : 405-18.
19. ประสงค์ ตู้อินดา, ประมวณ สุนากร, สุภรี สุวรรณจูงทะ, พูนเกษม เจริญพันธุ์, วิศิษฐ์ อุดมพานิชย์, ประพนธ์ คล่องสู้ศึก, และคณะ. ปัจจัยส่งเสริมการเจ็บป่วย. **มาตรฐานการบำบัดรักษาโรคติดเชื้อที่ทางเดินหายใจส่วนบน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ; 2531 : 12.
20. Treanor JJ. Respiratory infections. In : Richman DD, Whitly RJ, Hayden FG, editors. **Clinical virology**. Washington DC : ASM press ; 2002 : 7-27. (clinical virology)
21. ประสงค์ ตู้อินดา, ประมวณ สุนากร, สุภรี สุวรรณจูงทะ, พูนเกษม เจริญพันธุ์, วิศิษฐ์ อุดมพานิชย์, ประพนธ์ คล่องสู้ศึก, และคณะ. ปัจจัยส่งเสริมการเจ็บป่วย. **มาตรฐานการบำบัดรักษาโรคติดเชื้อที่ทางเดินหายใจส่วนบน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ; 2531 : 11.

22. ประกิต วาทีสาธกิจ, พูนเกษม เจริญพันธุ์, สว่าง แสงหิรัญ วัฒนา, สุมาลี เกียรติบุญศรี. การติดเชื่อในปอดของผู้ป่วยภูมิคุ้มกันอ่อนแอ. ใน : สมชัย บวรกิตติ, รั้งสรรค์ ปุษาปาคม, บรรณาธิการ. **โรคติดเชื้อระบบการหายใจ**. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรสมัย ; 2539 : 652-4.
23. Soldatou A, Davies EG. Respiratory virus infections in the immunocompromised host. **Paediatr Respir Rev** 2003 ; 4 : 193-204.
24. Weber WW, Greenwood BMM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. **Trop Med Int Health** 1998 ; 3 : 268-80.
25. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. **Am J Med** 2002 ; 112 : 4S-12S.
26. Weber MW, Mullholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. **Trop Med Int Health** 1998 ; 3 : 268-80.
27. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM, Messner MK. Nosocomial respiratory syncytial virus infection. **N Engl J Med** 1975 ; 293 : 1343-6.
28. Dennehy PH. Rapid diagnosis of viral respiratory infections. In : Hilman BC, editor. **Pediatric respiratory disease : diagnosis and treatment**. Philadelphia : W.B. Saunders ; 1993 : 123-6.
29. Stockton J, Stephenson J, Fleming D, Zambon M. Human Metapneumovirus as a cause of community- acquired respiratory illness. **Emerg Inf Dis** 2002; 8: 897-901.
30. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat Med** 2001 ; 7 : 719-24.
31. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. **Virology** 2002 295 : 119-32.
32. Bastein N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TCT, Boivin G, et al. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. **Virus Res** 2003 ; 93 : 51-62.
33. Lamb RA, Kolakofsky D. *Paramyxoviridae*: The viruses and their replication. In : Fields DM, Knipe PM, Howley PM, editors. **Fields Virology**. 3 rd ed. Philadelphia : Lippincott – Reven Publishers ; 1996 : 1177-89.

34. William JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. **N Engl J Med** 2004 ; 350 : 443-50.
35. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. **J Infect Dis** 2002 ; 186 : 1330-4.
36. Peiris JSM, Tang WH, Chan KH, Khong PK, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. **Emerg Infect Dis** 2003 ; 9 : 628-33.
37. van den Hoogen BG, van Doornum GJJ, Frockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WEP, Groot RD, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. **J Infect Dis** 2003 ; 188 : 1571-7.
38. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. **J Clin Microbiol** 2003 ; 41 : 2987-91.
39. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. **J Infect Dis** 2003 ; 187 : 785-90.
40. Thanasugarn W, Samransamruajkit R, Vanapongtipagorn P, Prapphal P, van den Hoogen BG, Osterhaus ADME, et al. Human metapneumovirus infection in Thai children. **Scand J Infect Dis** 2003 ; 35 : 754-6.
41. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. **Emerg Infect Dis** 2002 ; 8 : 897-901.
42. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infections in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. **Pediatrics** 2003 ; 111 : 1407-10.
43. Jartti T, Van den Hoogen BG, Garofalo RP, Osterhaus ADME, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. **Lancet** 2002 ; 360 : 1393-4.
44. Freymuth F, Vabret A, Legrand L, Etteradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, et al. Presence of the human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. **J Ped Inf Dis** 2003 ; 22 : 92-4.

45. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Rogendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. **J Clin Microbiol** 2003 ; 41 : 3043-5.
46. Bastien N, Ward D, Caeseela PV, Brandt K, Kee SHS, McNabb G. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. **J Clin Microbiol** 2003 ; 41 : 4642-46.
47. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. **Emerg Infect Dis** 2003 ; 9 : 602-3.
48. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Emerg Infect Dis** 2003 ; 9 : 372-5.
49. Cuevas L, Nasser AMB, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. **Emerg Infect Dis** 2003 ; 9 : 1626-8.
50. Boivin G, Serres GD, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. **Emerg Infect Dis** 2003 ; 9 : 634-40.
51. Nissen M, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. **Med J Aust** 2002 ; 176 : 188.
52. Pelletier G, Dery P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the human metapneumovirus in an immunocompromised child. **Emerg Infect Dis** 2002 ; 8 : 976-8.
53. Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegen CD, Osterhaus ADME. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. **Bone Marrow Transplant** 2003 ; 31 : 309-10.
54. Wolf DG, Zakay-Rones Z, Fadeela A, Greenberg D, Dagen R. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. **J Infect Dis** 2003 ; 188 : 1865-7.
55. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Yoshioka M, Ma X, et al. Sero-prevalence of human metapneumovirus in Japan. **J Med Virol** 2003 ; 70 : 281-3.

56. Peret TCT, Boivin G, LI Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in north america. **J Infect Dis** 2002 ; 185 : 1660-3.
57. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. **Virology** 2003 ; 315 : 1-9.
58. Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Szymis MW, Whiley Dm, et al. Molecular assay for detection of human metapneumovirus. **J Clin Microbiol** 2003 ; 41 : 100-5.
59. Deforest A, Mortensen JE. Rapid laboratory diagnosis of viral and bacterial respiratory infections. In: Schidlow DV, Smith DS, editors. **A practical guide to pediatric respiratory diseases**. 1st ed. Philadelphia : Hanley & Belfus; 1994 : 273. (practical2)
60. Becher B, Dodelet V, Fedorowicz V, Antel JP. Soluble tumor necrosis factor receptor inhibits interleukin 12 production by stimulate human adult microglial cells in vitro. **J Clin Invest** 1996 : 98 ; 1539-43.
61. Samransamruajkit R, Moonvirivakit K, Vanapongtipagorn P, Prapphal N, Deelodegenavong J, Poovorawan Y. Plasma endothelin-1 in infants and young children with acute bronchiolitis and viral pneumonia. **Asian Pac J Allerg Immunol** 2002 : 20 ; 229-34.
62. Chan KS, Tam JS, Lam CW, Chan E, Wu A, Li CK. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. **Emerg Infect Dis** 2003 ; 9 : 1058-63.
63. Johnson PR, Collins PL. The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B : sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. **J Gen Virol** 1988 ; 69 : 2623-8.
64. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus of subgroup A and B : extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987 ; 84 : 5625-9.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 5 x Tris borate buffer (5 x TBE)

Tris – base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1 x Tris borate buffer (1 x TBE)

5 x TBE	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

3. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	กรัม
1 x TBE	200	มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

4. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

5. loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

6. 0.1% Diethyl pyrocarbonate (DEPC)

Diethyl pyrocarbonate	400	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

แช่ที่ 37 °C ซ้ำมคืน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 23

แสดงการแปลงนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวเป็นกรดอะมิโน 1 ตัว

		2 nd				
1 st	C	U	A	G	3 rd	
C	Proline [<i>Pro</i> , P]	Leucine [<i>Leu</i> , L]	Histidine [<i>His</i> , H]	Arginine [<i>Arg</i> , R]	C	
	Proline [<i>Pro</i> , P]	Leucine [<i>Leu</i> , L]	Histidine [<i>His</i> , H]	Arginine [<i>Arg</i> , R]	U	
	Proline [<i>Pro</i> , P]	Leucine [<i>Leu</i> , L]	Glutamine [<i>Gln</i> , Q]	Arginine [<i>Arg</i> , R]	A	
	Proline [<i>Pro</i> , P]	Leucine [<i>Leu</i> , L]	Glutamine [<i>Gln</i> , Q]	Arginine [<i>Arg</i> , R]	G	
U	Serine [<i>Ser</i> , S]	Phenylalanine [<i>Phe</i> , F]	Tyrosine [<i>Tyr</i> , Y]	Cysteine [<i>Cys</i> , C]	C	
	Serine [<i>Ser</i> , S]	Phenylalanine [<i>Phe</i> , F]	Tyrosine [<i>Tyr</i> , Y]	Cysteine [<i>Cys</i> , C]	U	
	Serine [<i>Ser</i> , S]	Leucine [<i>Leu</i> , L]	Stop	Stop	A	
	Serine [<i>Ser</i> , S]	Leucine [<i>Leu</i> , L]	Stop	Tryptophan [<i>Trp</i> , W]	G	
A	Threonine [<i>Thr</i> , T]	Isoleucine [<i>Ile</i> , I]	Asparagine [<i>Asn</i> , N]	Serine [<i>Ser</i> , S]	C	
	Threonine [<i>Thr</i> , T]	Isoleucine [<i>Ile</i> , I]	Asparagine [<i>Asn</i> , N]	Serine [<i>Ser</i> , S]	U	
	Threonine [<i>Thr</i> , T]	Isoleucine [<i>Ile</i> , I]	Lysine [<i>Lys</i> , K]	Arginine [<i>Arg</i> , R]	A	
	Threonine [<i>Thr</i> , T]	Methionine [<i>Met</i> , M]	Lysine [<i>Lys</i> , K]	Arginine [<i>Arg</i> , R]	G	
G	Alanine [<i>Ala</i> , A]	Valine [<i>Val</i> , V]	Aspartic acid [<i>Asp</i> , D]	Glycine [<i>Gly</i> , G]	C	
	Alanine [<i>Ala</i> , A]	Valine [<i>Val</i> , V]	Aspartic acid [<i>Asp</i> , D]	Glycine [<i>Gly</i> , G]	U	
	Alanine [<i>Ala</i> , A]	Valine [<i>Val</i> , V]	Glutamic acid [<i>Glu</i> , E]	Glycine [<i>Gly</i> , G]	A	
	Alanine [<i>Ala</i> , A]	Valine [<i>Val</i> , V]	Glutamic acid [<i>Glu</i> , E]	Glycine [<i>Gly</i> , G]	G	

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. วนิตา ชนสุกาญจน์, ยง ภู่วรรณ. ปอดอักเสบ Humanmetapneumovirus โรคเก่าที่พบใหม่. *คลินิกวารสารเวชปฏิบัติและการใช้ยา* 2547 : 1 ; 31-5.
2. Thanasugarn W, Samransamruajkit R, Vanapongtipagorn P, Prapphal P, van den Hoogen BG, Osterhaus ADME, et al. Human metapneumovirus infection in Thai children. **Scand J Infect Dis** 2003 : 35 ; 754-6.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ปอดอักเสบ Human metapneumovirus โรคเก่าที่พบใหม่

รหัสกิจกรรม 3-23-000-9877/0401

วัตถุประสงค์ของบทความ

1. เพื่อทราบถึงสาเหตุใหม่ของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอย่างฉับพลัน
2. เพื่อทราบถึงลักษณะทั่วไปของ human metapneumovirus
3. แนวทางการตรวจวินิจฉัยโรคปอดอักเสบ human metapneumovirus



วนิดา ธนสุกาญจน์, นิสิตมหาบัณฑิต หลักสูตรอนุชิววิทยาทางการแพทย์, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ยง ภู่วรรณ พ.บ., ศาสตราจารย์, ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสดัดแปลง, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การติดเชื้อไวรัสทางเดินหายใจพบบ่อยในเด็ก เป็นสาเหตุให้เกิดปอดอักเสบ และจำเป็นต้องรับไว้รักษาในโรงพยาบาลจำนวนมาก.^{1,2} โรคทางเดินหายใจ อักเสบในเด็กส่วนใหญ่จะมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ได้แก่ respiratory syncytial virus (RSV), influenza A, B, parainfluenza virus, adenovirus coronavirus (229E, OC43) เป็นต้น. สำหรับ human metapneumovirus เป็นไวรัสที่พบใหม่โดยทีมนักวิทยาศาสตร์จากสถาบันไวรัสวิทยา มหาวิทยาลัย Erasmus ประเทศเนเธอร์แลนด์ ในปี พ.ศ. 2544.³

การค้นพบ human metapneumovirus³

จากการที่มีเด็กป่วยเป็นโรคปอดอักเสบ หลอดลม อักเสบ หอบ มีลักษณะอาการทางคลินิกคล้ายกับโรคปอดอักเสบจากไวรัส เช่น bronchiolitis โดยเฉพาะในเด็กเล็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี. ทีมนักวิทยาศาสตร์

ของสถาบันไวรัสที่มหาวิทยาลัย Erasmus ได้หาสาเหตุของไวรัสที่รู้จักกันดีในปัจจุบัน เช่น RSV, influenza, parainfluenza, adenovirus เป็นต้น แต่ตรวจไม่พบไวรัสดังกล่าว มีเด็กหลายรายที่มีอาการมาก ต้องนอนโรงพยาบาล และใช้เครื่องช่วยหายใจ. ทีมนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า มีไวรัสเป็นสาเหตุ และไวรัสนี้ไม่เคยรู้จักกันมาก่อน จึงได้เริ่มทำการศึกษาค้นคว้าหาสาเหตุโรคดังกล่าว.

การศึกษาได้เริ่มต้นโดยการนำเถ้าล้างโพรงจมูก และคอของเด็กที่ป่วย โดยที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสก่อโรคที่ทราบในปัจจุบัน มาทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง พบเซลล์ปรากฏมี cytopathic. ในวันที่ 10-14 หลังเพาะเลี้ยง ตรวจพบจากภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีลักษณะคล้ายกับไวรัสในกลุ่ม paramyxovirus จึงทำการหาลักษณะของไวรัสด้วยหลักการอนุชีววิทยา โดยทำการสกัด RNA จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้ ran-

ตารางที่ 1. แสดงการตรวจพบ hMPV ในผู้ที่ป่วยเป็นโรกระบบทางเดินหายใจ พ.ศ. 2545-2546.

ประเทศ	กลุ่มอายุ	จำนวน	ตรวจพบ จำนวน	hMPV %	อ้างอิง
ออสเตรเลีย	ไม่ไต่กล่าว	329	32	9.7	4
อังกฤษ	ทุกช่วงอายุ	405	9	2.2	7
แคนาดา	0-3 ปี	208	12	5.8	5
ไทย	0-15 ปี	120	5	4.2	9
ฮ่องกง	0-18 ปี	587	32	5.5	10
เยอรมนี	0-2 ปี	63	11	17.5	6
อิตาลี	1-24 เดือน	90	23	25.6	11
ฟินแลนด์	3 เดือน-16 ปี	132	10	8.0	12
สเปน	0-3 ปี	147	6	4.1	13
สหรัฐอเมริกา	0-5 ปี	296	19	6.4	8

genus metapneumovirus.

hMPV กับ SARS

ในระยะแรกของการค้นหาสาเหตุของ severe acute respiratory syndrome (SARS) ได้มีการกล่าวถึง hMPV อาจเป็นสาเหตุของ SARS โดยมีการตรวจพบ hMPV ในผู้ป่วย SARS ในประเทศแคนาดาและฮ่องกง แต่เมื่อได้มีการตรวจยืนยันและทราบถึงสาเหตุของ SARS coronavirus แล้ว hMPV ก็ไม่ได้อยู่เป็นเหตุของ SARS รวมทั้งการพิสูจน์สัญพจน์ของ Koch โดยที่มหาวิทยาลัยเนเธอร์แลนด์ที่เปรียบเทียบการเกิดโรคในลิงของ SARS coronavirus, hMPV และ hMPV ร่วมกับ SARS coronavirus ก็ทำให้สามารถคัดแยกเอา hMPV ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด SARS ได้. ในช่วงที่มี SARS ระบาดทำให้มีแพทย์และนักวิทยาศาสตร์อีกจำนวนมากได้รู้จัก hMPV เพิ่มขึ้น.

hMPV เป็นแล้วเป็นซ้ำอีกได้

ได้มีการศึกษาถึงเด็กป่วยด้วยโรคทางเดินหายใจในประเทศแคนาดา¹⁵ ในผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised child) พบการติดเชื้อ hMPV

สามารถเกิดการติดเชื้อซ้ำได้อีกในปีต่อมา โดยการติดเชื้อต่างสายพันธุ์. วิธีการติดต่อน่าจะเป็นระบบทางเดินหายใจ เช่นเดียวกับไวรัสโรคทางเดินหายใจ จึงพบได้บ่อยในเด็กเล็ก.

การติดเชื้อ hMPV ในประเทศไทย

จากการศึกษาถึงสาเหตุของการติดเชื้อปอดอักเสบในเด็กที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปี พ.ศ. 2545 จำนวน 120 ราย โดยการดูเอาน้ำล้างโพรงจมูกและคอของเด็กไปทำการตรวจหา hMPV โดยวิธีการ RT-PCR ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบบค คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถตรวจพบ hMPV ได้จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 4) ของผู้ป่วยเด็กดังกล่าว เด็กหลายรายมีอาการทางเดินหายใจและจำเป็นต้องรับไว้รักษาในโรงพยาบาล. ลักษณะของพันธุกรรม (www.ncbi.nlm.nih.gov) จำนวน 3 สายพันธุ์ (AF158463-5) มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ที่พบทางตะวันตก โดยมีความคล้ายคลึงถึงร้อยละ 96. ในส่วนที่ทำการศึกษานิวคลีโอโปรตีน ยีนในขนาด 259 bases มีความแตกต่างของ nucleotide เพียง 6 bases. ทางศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบบคกำลังศึกษาลักษณะสายพันธุ์ใน

ประเทศไทย โดยเฉพาะการศึกษาในลักษณะของ N, F และ L gene.

ลักษณะอาการเด็กติดเชื้อ hMPV

อาการเด็กติดเชื้อ hMPV จะเหมือนกับอาการเด็กป่วยเป็นโรคทางเดินหายใจทั่วไปที่มีทั้งเป็นหวัด ไอ หลอดลมอักเสบ จนถึงอาการหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) ปอดบวม. ความรุนแรงของโรคมืดั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงมากขนาดต้องนอนรักษาในโรงพยาบาล ส่วนใหญ่จะเป็นกับเด็กเล็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี.

การรักษาและการป้องกัน

ปอดอักเสบ hMPV สาเหตุจากไวรัส จึงไม่มียา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบบี คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กองทุนส่งเสริมการวิจัยแห่งประเทศไทย สกว. ในส่วนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ที่ได้สนับสนุนกลุ่มวิจัย โดยเฉพาะการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่.

เอกสารอ้างอิง

1. Puthavathana P, Wasi P, Kositanont U, et al. A hospital-base study of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children, with emphasis on laboratory diagnosis. *Rev Infect Dis* 1990;12:S988-94.
2. Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Wathana-kasetr, et al. A study of nonbacterial agent of acute lower respiratory tract infection in Thai children. *Rev Infect Dis* 1990;12: S923-8.
3. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus ADME. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7: 719-24.
4. Mackay IM, Jacob KC, Woolhiuse D, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:100-5.
5. Boivin G, Serres GD, Cote S, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:634-40.
6. Viazov S, Ratjen F, Scheidhaur R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:3043-5.
7. Stockton J, Stephenson J, Fleming D, Zambon M. Human Metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:897-901.
8. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martnello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States : clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;6:1407-10.
9. Thanasugarn W, Samransamruajkit R, Wanapongtipagorn P, et al. Human metapneumovirus infection in Thai children. *Scan J Infect Dis* 2003;35:754-6.
10. Peiris JSM, Tang WH, Chan KH, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect dis* 2003;9:628-33.
11. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987-91.
12. Jartti T, Van den Hoogen BG, Garofalo RP, Osterhaus ADME, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;2:1393-4.
13. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquires respiratory-illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:602-3.
14. Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 2002;295:119-32.
15. Pelletier G, Dery P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* 2002;8: 976-9.

รักษาจำเพาะ มีเพียงการรักษาตามอาการรอเวลาให้ร่างกายฟื้นคืนสู่ปกติ. ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนในการป้องกัน.

บทสรุป

การติดเชื้อ hMPV ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี เป็นโรคที่มีอยู่เดิมและด้วยความก้าวหน้าทางด้านอนุชีววิทยาและเทคโนโลยีสมัยใหม่ทำให้สามารถให้การวินิจฉัยได้. การติดเชื้อ hMPV ที่พบได้ในเด็กทั่วโลก จำเป็นต้องมีการศึกษาทางคลินิก และความสำคัญของโรคเพิ่มขึ้น. ปัจจุบันได้มีการพยายามหาวิธีการวินิจฉัยให้ง่ายขึ้น เช่น พัฒนาการใช้ serodiagnosis, molecular diagnosis และแนวทางในการป้องกันโดยเฉพาะวัคซีนในอนาคต.

dom primers เปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA แล้วใช้ random arbitrary primers เพิ่มจำนวนแบบสุ่ม. เมื่อได้ชิ้นส่วนพันธุกรรม (DNA) ที่เพิ่มจำนวนแล้ว ก็ทำการถอดรหัสพันธุกรรม และทำการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมที่ได้บางส่วนกับรหัสพันธุกรรมที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม โดยการใช้ BLAST program รวมทั้งการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการความเหมือนของพันธุกรรม phylogenetic analysis เทียบความใกล้เคียงกับไวรัสที่ทราบในปัจจุบันโดยการทำ phylogenetic tree. ผลที่ได้พบว่าไวรัสดังกล่าวมีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ Avian pneumovirus เป็นไวรัสในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบในนก. จากข้อมูลที่ได้จึงมีข้อสงสัยว่าเป็นไวรัสที่ได้ข้ามสายพันธุ์จากนก หรือมีอยู่ในคนอยู่แล้ว.

Human pneumovirus หรือ human metapneumovirus เป็นไวรัสของคน

คณะนักวิทยาศาสตร์ดังกล่าวได้ทำการพิสูจน์ต่อตามสัญพจน์ของ Koch โดยการเลือกใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือ ไก่วงแทนนก (Avian) และลิงหางยาว *Cynomolgus macaques* แทน primate. นำเอาเชื้อ human metapneumovirus จากน้ำล้างโพรงจมูกและคอเด็กมาหยอดจมูกให้กับไก่วงรุ่นกระตังและไก่รุ่น และลิงหางยาววัยรุ่น. ผลปรากฏว่าไก่วงและไก่ไม่ป่วยเป็นอะไรเลย แต่ลิงหางยาวมีอาการคล้ายกับหวัดและมีอาการในระบบทางเดินหายใจไม่รุนแรง. จากการทดลองดังกล่าวเป็นการพิสูจน์ว่าไวรัสดังกล่าวไม่ได้พัฒนามาจาก Avian pneumovirus น่าจะเป็นไวรัสที่อยู่ในคนหรือสัตว์ primate จึงตั้งชื่อว่า human metapneumovirus (hMPV).

hMPV อุบัติใหม่หรือมีอยู่เดิมแล้ว

การศึกษาเพื่อให้ได้คำตอบดังกล่าวได้ดำเนินขึ้นโดยการพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อ hMPV ในเลือด โดยการตรวจดังกล่าวเพื่อยืนยันว่าเคยติดเชื้อมาก่อน โดยการตรวจหาภูมิปฏิกิริยาต่อ hMPV จาก seroprevalence. คณะผู้วิจัยได้นำเอาน้ำเหลือง

ประชากรกลุ่มอายุต่างๆ ตั้งแต่ 1-90 ปี ที่เก็บแช่แข็งไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2501. ผลปรากฏว่าตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าวในอัตราเพิ่มมากขึ้นตามอายุในช่วง 5 ขวบปีแรก และตรวจพบทุกคนในอายุที่เกิน 5 ปี ดังตารางที่ 1. แสดงให้เห็นว่า hMPV เป็นโรคที่เกิดขึ้นในวัยเด็ก และมีการติดเชื้อมาแล้วเมื่อก่อน 40 ปีที่ผ่านมา. แสดงว่าโรคปอดและทางเดินหายใจอักเสบที่เกิดจากเชื้อ hMPV ไม่ใช่โรคอุบัติใหม่ เป็นโรคที่มีอยู่เดิมกว่า 40 ปีมาแล้ว แต่เพิ่งมีวิธีการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบัน.

hMPV เป็นโรคที่พบได้ทั่วโลก

หลังจากที่มีการเผยแพร่เชื้อไวรัสใหม่ hMPV ในวารสาร Nature Medicine ปี พ.ศ. 2544³ ก็ได้มีการศึกษาสาเหตุของปอดอักเสบจาก hMPV ในเด็กทั่วโลก โดยมีรายงานการตรวจพบที่ประเทศออสเตรเลีย⁴, แคนาดา⁵, เยอรมนี⁶, อังกฤษ⁷, สหรัฐอเมริกา⁸, รวมทั้งในประเทศไทย⁹ ก็มีการตรวจพบไวรัสดังกล่าวได้. อุบัติการณ์การตรวจพบ hMPV ในเด็กประเทศต่างๆ พบได้ตั้งแต่ร้อยละ 2 จนถึงร้อยละ 25 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลุ่มอายุผู้ป่วย พบในอัตราสูงในเด็กอายุน้อยกว่า 2 ปี แสดงในตารางที่ 1.

ไวรัสวิทยา human metapneumovirus¹⁴

hMPV เป็นไวรัสใน genus *Metapneumovirus* subfamily *Pneumovirinae* ใน family *Paramyxoviridae*. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบลักษณะ pleiomorphic คล้ายภาพที่พบในกลุ่ม paramyxovirus มีเปลือกชั้นๆ ยื่นออกมา. ไวรัส hMPV เป็น RNA virus สายเดี่ยวมีความยาว 13.3 kb ลักษณะ genome มีความใกล้เคียงกับ Avian pneumovirus type C ที่ทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจในไก่วง. มีการสร้างโปรตีน nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M) และมี fusion protein (F) ถัดจาก F protein เป็น putative 22K protein (M2), small hydrophobic protein (SH), attachment glycoprotein (G) และ large protein (L) ลักษณะดังกล่าวจึงทำให้ไวรัสนี้อยู่ใน

ชุดที่ 80

เรื่อง "ปอดอักเสบ human metapneumovirus โรคเก่าที่พบใหม่"

จงเลือกคำตอบที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อเดียว

1. Human metapneumovirus
 - ก. เป็นโรคในเด็กต่ำกว่า 5 ปี
 - ข. เป็น DNA ไวรัส
 - ค. พบได้เฉพาะประเทศทางตะวันตก
 - ง. ติดต่อมาจากสัตว์
2. การวินิจฉัยโรคปอดอักเสบ metapneumovirus ใช้วัตถุใดส่งตรวจ
 - ก. เลือด
 - ข. อุจจาระ
 - ค. น้ำล้างโพรงจมูก คอ
 - ง. ปัสสาวะ
3. ข้อใดไม่ใช่คุณสมบัติของไวรัสที่อยู่ใน family *Paramyxoviridae*
 - ก. เป็น envelope virus
 - ข. เป็นไวรัสที่มี RNA หลายท่อน
 - ค. ที่ envelope มี spike สั้นๆ
 - ง. เป็น RNA virus
4. การรักษาปอดอักเสบ metapneumovirus
 - ก. Penicillin ร่วมกับ gentamicin
 - ข. Supportive treatment
 - ค. Ribavirin
 - ง. IVIg
5. โรค human metapneumovirus
 - ก. เป็นโรคที่มีอยู่เดิมแล้ว
 - ข. เป็นโรคอุบัติใหม่ข้ามมาจากนก
 - ค. ประชากรส่วนใหญ่ยังไม่ภูมิของโรคดังกล่าว
 - ง. พบครั้งแรกที่ทวีปออสเตรเลีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SHORT COMMUNICATION

Human Metapneumovirus Infection in Thai Children

WANIDA THANASUGARN¹, RUJIPAT SAMRANSAMRUJKIT²,
PIJITRA VANAPONGTIPAGORN¹, NUANCHAN PRAPPHAL², BERNADETTE VAN
DEN HOOGEN³, ALBERT D. M. E. OSTERHAUS³ and YONG POOVORAWAN¹

From the ¹Viral Hepatitis Research Unit and ²Respiratory Unit, Department of Paediatrics, Chulalongkorn University, Thailand, and ³Department of Virology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Human metapneumovirus (hMPV) associated with clinical respiratory tract infection (RTI) in children was first isolated in the Netherlands. Of 120 Thai paediatric patients with RTI examined, 5 cases (4.2%) showed detectable hMPV based on N-gene-specific RT-PCR. All of them were negative for hRSV infection. Aligning the sequences with a reference strain revealed some nucleotide differences, which necessitates future investigation to evaluate clinical significance and genotype variation.

Yong Poovorawan, Viral Hepatitis Research Unit, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand (Tel. +662 256 4909, fax. +662 256 4929, e-mail. Yong.P@chula.ac.th)

INTRODUCTION

Respiratory tract infection (RTI) is a major public health problem that causes morbidity and mortality among children worldwide (1, 2). The major aetiological agents of RTI are viruses, e.g. human respiratory syncytial virus (hRSV), influenza A virus, influenza B virus, human parainfluenza virus type 1–3, adenovirus and rhinovirus (3). However, in only 60% of patients with RTI could the causative agent be identified (4). Recently, human metapneumovirus (hMPV), a new human virus first described in the Netherlands, has been isolated from children with severe respiratory tract disease (5, 6).

hMPV is a member of the Metapneumovirus genus within the *Pneumovirinae* subfamily, and belongs to the *Paramyxoviridae* family. Electron microscopy shows paramyxovirus-like pleiomorphic particles with short envelope projections. The nucleocapsid contains approximately 13.3 kb single-stranded, non-segmented RNA of negative polarity (5, 6). The genomic constellation is most closely related to avian pneumovirus (APV) serotype C, which causes upper respiratory tract disease in turkeys (5, 6). The clinical symptoms of hMPV are similar to those of hRSV infection, ranging from mild respiratory symptoms to severe cough, bronchiolitis and pneumonia (5–8). Serological surveys in the Netherlands have shown that all children over the age of 5 y had been exposed to hMPV. Moreover, the virus has been circulating in the human population for at least 50 y (5).

In 2002, hMPV was also found in North America (9), Australia (7, 8) and the UK (4), suggesting that it is likely to exist globally (5, 9). As commercially available diagnostic test kits for hMPV are not yet available, data on the prevalence of this virus are limited. This study was designed to investigate the prevalence of hMPV in nasopharyngeal secretions of infants and young children who presented with clinical symptoms of RTI, using the reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

MATERIALS AND METHODS

Population study

120 nasopharyngeal secretions were collected from paediatric patients with clinical symptoms of RTI. None of them was immunocompromised or undergoing immunosuppressive therapy. The patients had either attended the outpatient clinic or been admitted to the paediatric ward, Chulalongkorn Hospital, Bangkok, in March 2001 to September 2002. The specimens were collected and stored at -70°C until further testing.

Human metapneumovirus detection

RNA extraction was performed according to the guanidine method (10). The RNA pellet was resuspended in 10 μl diethylpyrocarbonate-treated sterile water (Dep-C water) and directly used as a template for complementary DNA (cDNA) synthesis. The RNA template was added to 20 μl cDNA reaction mixture containing 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 10 mM dNTP, 20 U RNase inhibitor (Promega, WI, USA) and 25 U multireverse transcriptase (Promega), and incubated at 37°C for 1 h.

At the time of the study, 1 virus sequence originating from the Netherlands had been published in GenBank, on which the de novo primer design was based. Two pairs of oligonucleotide primers, 10 pmol each, specifically designed to amplify regions in the nucleoprotein (N) gene (GenBank accession no. AF371337) were used for nested PCR. The primer sequences were: 5' ACG GGG TAG AGA AGA GCT GG 3' [nucleotides (nt) 389–408] for the outer forward primer MPVP F, 5' GCA AAG TTG GGA CAG TTG GC 3' (nt. 985–1004) for the outer reverse primer MPVP R, 5' GCA TCA ACC ATA GAA GTG GGA C 3' (nt. 556–577) for the inner forward primer MPVN F, and GCA TTG TTT GAC CGG CCC CA 3' (nt. 795–814) for the inner reverse primer MPVN R.

The first PCR amplification round was performed in a total volume of 50 μl containing both outer forward and reverse primers, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 2 U *Taq* polymerase (Finnzymes, CA, USA) and 10 mM dNTP. The PCR conditions comprised 1 initial denaturation cycle at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min (denaturation), 54°C for 1 min (primer annealing), 72°C for 1 min (extension) and a final extension step at 72°C for 7 min. The first round PCR product was further amplified using the inner sense and anti-sense primers. Otherwise, the conditions were identical to those applied in the first round. The second round PCR products were separated by

electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide on preparation. Under ultraviolet light, the 259 bp products became visible.

To confirm the PCR results, the second round PCR product was purified from the agarose gel using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The Big Dye Terminator V. 3.0 Cycle Sequencing ready reaction kit (PE Biosystems, CA, USA) was used based on the manufacturer's specifications to sequence the PCR product using the inner sense primer, and the result was confirmed with the inner anti-sense primer. All labelled products were analysed using an Abi-prism™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus, Branchburg, NJ, USA). The results were analysed by the sequence Navigator program and submitted to the GenBank database (accession nos AY 158463-5). The nucleotide sequences were also compared with the sequences published previously in GenBank, applying the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

Human respiratory syncytial virus detection

Screening for hRSV RNA was also done, to detect hRSV infection. The details of the method have been published elsewhere (11).

Ethics and consent

The study protocol was approved by the ethics committee, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Before their recruitment, the patients and their legal guardians were informed about the study objective and their written consent was obtained.

RESULTS

120 infants and children (77M, 43F) were tested. Their age ranged from 1 month to 14 y (mean age 18.6 months, median 12 months). There were 21 cases from the outpatient clinic and the rest were inpatients. Approximately half of them were below the age of 1 y.

All 120 nasopharyngeal secretions were tested by RT-PCR. Positive results were found in 5 specimens (4.2%) (4M, 1F). All children positive for hMPV were negative for hRSV by RT-PCR. The details of demographic data, clinical signs and symptoms and laboratory investigations are shown in Table I.

To confirm whether positive specimens were indeed hMPV infections, 3 positive specimens were confirmed by DNA sequencing (AY 158463-5) and applying the BLAST program. The sequences were most closely (96%) related to (reference strain) hMPV accession no. AF371337 at GenBank. Subsequently, all positive sequences were aligned with those hMPV sequences using the CLUSTAL X program, which shows differences in 6-9 nucleotide positions.

DISCUSSION

RTI is usually highly prevalent during the rainy and winter season and commonly occurs during childhood, especially in immunocompromised hosts (12). This study was designed to investigate the prevalence of hMPV in Thai children by RT-PCR, using primers specific for the N gene. The results showed a prevalence of hMPV in 4.2% of the patients tested. These results are comparable to those previously reported from England and Wales (2.2%) (9). In Australia, 25-33% of

Table I. Demographic data and clinical presentations of patients positive for human metapneumovirus

Pt	Age (y, mo)	Gender	Primary diagnosis	Underlying disease	Duration of symptoms	Progression	RD	Breath sound	Treatment	WBC (mm ³)	RSV RNA	Chest X-ray
1	2.6	M	Viral pneumonia	Truncus arteriosus (total correction)	5 d high fever, productive cough	Rapid	Severe	Medium rales, bilat. rhonchi	Admitted, hydration, BD, O ₂ antibiotics	16,500	Negative	Perihilar infiltrate, hyperaeration
2	1.7	M	Viral pneumonia	None	7 d fever, cough, running nose	Rapid desaturation	Severe	Rales, bilat. rhonchi	Admitted, hydration, BD, O ₂	15,800	Negative	Bilat. lower lobe infiltrate
3	4.0	F	Viral pneumonia	CP, mild BPD	4 d high fever, dry cough	Rapid clinical dehydration	Severe	Bilat. rales	Admitted, hydration, O ₂	6200	Negative	Perihilar infiltrate, mild hyperaeration
4	1.6	M	Viral pneumonia	None	Low-grade fever for 1 week	Slow progress desaturation	Moderate	Rales, rhonchi	Admitted, hydration, O ₂	16,500	Negative	Perihilar infiltrate, hyperaeration
5	3.6	M	URI/BPD exacerbation	BPD	Low-grade fever 2-3 d, intractable cough	Slow	Mild	Rhonchi, wheezing	Outpatient, BD, steroids	nd	Negative	nd

The average length of stay was 5.25 ± 2.8 d. All admissions received oxygen supplementation. On average, oxygen was required for 4.25 ± 2.2 d.

Pt. patient; mo, months; M, male; F, female; URI, upper respiratory tract infection; BPD, bronchopulmonary dysplasia; CP, cerebral palsy; RD, respiratory distress; bilat., bilateral; BD, bronchodilator; WBC, white blood cells; RSV, respiratory syncytial virus; nd, not done.

nasopharyngeal aspiration samples collected from children with respiratory tract disease have proven positive for bacterial or viral pathogens (7). Among those negative for any known pathogens, hMPV was present in 40 of 525 samples (8). However, the prevalence may be higher than that, as hMPV infection may remain asymptomatic (4, 9). Although the clinical symptoms evoked by hMPV are similar to those encountered during hRSV infection, based on the RT-PCR results hRSV could be excluded as the source of RTI among the positive specimens in this study.

By aligning the sequences of the positive specimens with the hMPV sequence, 6–9 nucleotides were found to be different, but only 1 amino acid changed. Reinfection with the virus could occur (9), which may be due to potential variations in the subtypes. Yet, most viral RTIs, such as hRSV and parainfluenza virus, recur without evidence of known antigen variations (13), as may also be the case for hMPV. Moreover, the 3 short (approx. 300 bp) sequences obtained from the nucleoprotein gene would be insufficient to draw any conclusions regarding polymorphism, subtypes or reasons for reinfection. Hence, additional gene sequencing should be performed to elucidate the geographical distribution of hMPV.

The hMPV-infected children developed upper respiratory tract symptoms for a few days which progressed to a lower respiratory tract disease. In 1 child, clinical respiratory distress with underlying bronchopulmonary dysplasia ensued, and another patient who suffered from severe respiratory distress required prolonged hospitalization as his pre-existing congenital heart disease was further complicated. These findings suggest the clinical significance of this respiratory virus and highlight the potential severity of disease in young children. Misdiagnosis could lead to inappropriate antibiotic use and adverse effects to administered drugs.

The seroprevalence found in the Netherlands showed that children under the age of 5 y were at risk of hMPV infection and, likewise, all positive children in this study were below the age of 5 y. These findings indicate that hMPV is associated with RTI in young children. hMPV has also been found in adults (4, 9) and reinfections have also been reported (12), implying that further studies should be performed in all age groups.

The hMPV infection could develop into a life-threatening disease, particularly in certain high-risk groups or immunocompromised hosts (12). Thus, the appropriate management and judicious use of antibiotics when indicated should help to reduce the morbidity of the patients.

So far, hMPV has been reported in the Netherlands (5, 6), the UK (4), North America (9) and Australia (7, 8) and, based on this report, also in Thailand. Hence, further investigation will be required to understand its clinical

significance, as well as the clinical incidence of hMPV infections of different genotypes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Center of Excellence Research Fund, Chulalongkorn University, the Thailand Research Fund, Senior Research Scholar and Sophia Foundation for Medical Research project number 378. The authors would like to thank Ms P. Hirsch and Venerable Dr M. Bhikkhu of Wat Rajaorasaram, Bangkok, for reviewing the manuscript. Lastly, we deeply appreciate the hard work of all the paediatric staff at King Chulalongkorn Memorial Hospital who assisted in collecting the specimens.

REFERENCES

1. Puthavathana P, Wasi P, Kositanont U, Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Kantakamalakul W, et al. A hospital-base study of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children, with emphasis on laboratory diagnosis. *Rev Infect Dis* 1990; 12: S988–94.
2. Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Watthana-kasetr, Srinavin S, Ruangkanchanasetr S, Hotrakitya S, et al. A study of non-bacterial agent of acute lower respiratory tract infection in Thai children. *Rev Infect Dis* 1990; 12: S923–8.
3. Bulla A, Hitze KL. Acute respiratory infections: a review. *Bull World Health Organ* 1978; 56: 481–98.
4. Stockton J, Stephenson J, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 897–901.
5. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719–24.
6. Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 2002; 295: 119–32.
7. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* 2002; 176: 188.
8. Howe M. Australian find suggests worldwide reach for metapneumovirus. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 202.
9. Peret TCT, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, et al. Characterisation of human metapneumovirus isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002; 185: 1660–3.
10. Cha TA, Kolberg J, Trvine B, Stempien M, Beall E, Yano M, et al. Use of a signature nucleotide sequence of hepatitis C virus for detection of viral RNA in human serum and plasma. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2528–34.
11. Samransamruajkit R, Moonvirivakit K, Vanapongtipagorn P, Prapphal N, Deelodegenavong J, Poovorawan Y. Plasma endothelin-1 in infants and young children with acute bronchiolitis and viral pneumonia. *Asian Pac J Allerg Immunol* 2002; 20: 229–34.
12. Pelletier G, Dery P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 976–9.
13. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344: 1917–28.

Submitted November 14, 2002; accepted January 20, 2003

ภาคผนวก ง

แสดงรายงานการ submitted ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hMPV ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ลงใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY158463 159 bp RNA linear VRL 17-DEC-2002
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 9 nucleocapsid protein gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY158463
 VERSION AY158463.1 GI:27227542
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 159)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Vanapongtipagorn,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Human metapneumovirus infection in Thai children
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 159)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Vanapongtipagorn,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-OCT-2002) Pediatrics, Chulalongkorn University, Rama
 4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..159
 /organism="Human metapneumovirus"
 /virion
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="9"
 /db_xref="taxon:162145"
CDS <1..>159
 /note="N protein"
 /codon_start=2
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAN85574.1"
 /db_xref="GI:27227543"
 /translation="IPKIARSFYDLFEQKVYYRSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVN
 IFMQAYGAG"
 ORIGIN
 1 cataccaaaa attgctagat ctttctatga cttatttgaa caaaaagtgt attacagaag
 61 tttgttcatt gagtatggca aagcattagg ctcatcctct acaggcagca aagcagaaag
 121 tttattcgtt aatatattca tgcaagctta tggggccgg
 //

LOCUS AY158464 235 bp RNA linear VRL 17-DEC-2002
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 40 nucleocapsid protein gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY158464
 VERSION AY158464.1 GI:27227544
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 235)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Vanapongtipagorn,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Human metapneumovirus infection in Thai children
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 235)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Vanapongtipagorn,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-OCT-2002) Pediatrics, Chulalongkorn University, Rama
 4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..235
 /organism="Human metapneumovirus"
 /virion
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="40"
 /db_xref="taxon:162145"
CDS <1..>235
 /note="N protein"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAN85575.1"
 /db_xref="GI:27227545"
 /translation="EVGLETTVRRANRVLS DALKRYPRMDIPKIAR SFYDLFEQKVYY
 RSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGA"
 ORIGIN
 1 gaagtgggac tagagaccac agtcagaaga gctaaccgtg tactaagtga tgcactcaaa
 61 agatacccta gaatggacat accaaaaatt gctagatcct tctatgactt atttgaacaa
 121 aaagtgtatt acagaagttt gttcattgag tatggcaaag cattaggctc atcctctaca
 181 ggcagcaaag cagaaagttt attcgtaat atattcatgc aagcttatgg ggccg
 //

LOCUS AY158465 236 bp RNA linear VRL 17-DEC-2002
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 58 nucleocapsid protein gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY158465
 VERSION AY158465.1 GI:27227546
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 236)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Vanapongtipagorn,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Human metapneumovirus infection in Thai children
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 236)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Vanapongtipagorn,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-OCT-2002) Pediatrics, Chulalongkorn University, Rama
 4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..236
 /organism="Human metapneumovirus"
 /virion
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="58"
 /db_xref="taxon:162145"
CDS <1..>236
 /note="N protein"
 /codon_start=2
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAN85576.1"
 /db_xref="GI:27227547"
 /translation="EVGLETTVRRANRVLSNALKRYPRMDIPKIARSFYDLFEQKVYY
 RSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGA"
 ORIGIN
 1 agaagtgga ctagagacca cagtcagaag agctaaccgt gtactaagta atgcactcaa
 61 aagatacct agaatggaca taccaaaaat tgctagatcc ttctatgact tatttgaaca
 121 aaaagtgtat tacagaagtt tttcattga gtatggcaaa gcattaggct catcctctac
 181 aggcagcaaa gcagaaagtt tattcgtaa tatattcatg caagcttatg gggccg
 //

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550148 247 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 54N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550148
 VERSION AY550148.1 GI:45385889
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 247)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..247
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="54N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
 gene <1..>247
 /gene="N"
 CDS <1..>247
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59790.1"
 /db_xref="GI:45385890"
 /translation="ASTIEVGLETTVRRANRVLSALKRYPRMDIPKIARSFYDLFEQ
 KVYYRSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGA"
 ORIGIN
 1 gcatcaacca tagaagtggg actagagacc acagtcagaa gagctaaccg tgtactaagt
 61 gatgcactca aaagataccc tagaatggac ataccaaaaa ttgctagatc cttctatgac
 121 ttatttgaac aaaaagtgta ttacagaagt ttgttcattg agtatggcaa agcattaggc
 181 tcacctccta caggcagcaa agcagaaagt ttattcgta atatattcat gcaagcttat
 241 ggggccg
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550149 259 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 63N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550149
 VERSION AY550149.1 GI:45385891
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 259)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..259
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="63N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>259
 /gene="N"
CDS <1..>259
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59791.1"
 /db_xref="GI:45385892"
 /translation="ASTIEVGLETTVRRANRVLSALKRYPRMDIPKIARSFYDLFEO
 KVVYRSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGAGQTM"
 ORIGIN
 1 gcatcaacca tagaagtggg actagagacc acagtcagaa gagctaaccg tgtactaagt
 61 gatgactca aaagataccc tagaatggac ataccaaaaa ttgctagatc ctctatgac
 121 ttatttgaac aaaaagtgta ttacagaagt ttgttcattg agtatggcaa agcattaggc
 181 tcacctccta caggcagcaa agcagaaagt ttattcgta atatattcat gcaagcttat
 241 ggggccggtc aaacaatgc
 //

LOCUS AY550150 248 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 88N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550150
 VERSION AY550150.1 GI:45385893
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 248)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..248
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="88N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>248
 /gene="N"
CDS <1..>248
 /gene="N"
 /codon_start=2
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59792.1"
 /db_xref="GI:45385894"
 /translation="EVGLETTVRRANRVLSDALKRYPRMDIPKIARSFYDLFEQKVYY
 RSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLNVNIFMQAYGAGQTM"
 ORIGIN
 1 agaagtggga ctgagacca cagtcagaag agctaaccgt gtactaagtg atgcactcaa
 61 aagataccct agaatggaca taccaaaaat tgctagatcc ttctatgact tatttgaaca
 121 aaaagtgtat tacagaagtt tgttcattga gtatggcaaa gcattaggct catcctctac
 181 aggcagcaaa gcagaaagtt tattcgtaa tatattcatg caagcttatg gggccggtca
 241 aacaatgc
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550151 259 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 89N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550151
 VERSION AY550151.1 GI:45385895
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 259)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..259
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="89N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>259
 /gene="N"
CDS <1..>259
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59793.1"
 /db_xref="GI:45385896"
 /translation="ASTIEVGLETTVRRANRVLSALKRYPRMDIPKIARSFYDLFEO
 KVVYRSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGAGQTM"
 ORIGIN
 1 gcatcaacca tagaagtggg actagagacc acagtcagaa gagctaaccg tgtactaagt
 61 gatgactca aaagataccc tagaatggac ataccaaaaa ttgctagatc ctctatgac
 121 ttatttgaac aaaaagtgta ttacagaagt ttgtcattg agtatggcaa agcattaggc
 181 tcatcctcta caggcagcaa agcagaaagt ttattcgta atatattcat gcaagcttat
 241 ggggccggtc aaacaatgc
 //

LOCUS AY550152 247 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 91N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550152
 VERSION AY550152.1 GI:45385897
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 247)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..247
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="91N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>247
 /gene="N"
CDS <1..>247
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59794.1"
 /db_xref="GI:45385898"
 /translation="EVGLETTVRRANRVLSDALKRYPRVDIPKIARSFYELFEQKVYY
 RSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFDVNIIFMQAYGAGQTM"
 ORIGIN
 1 gaagtgggac tagagactac agttagaaga gctaatagag tgctaagtga tgcactcaaa
 61 agatacccta gggtagatat accaaagatt gctagatcct tttatgaact atttgaacaa
 121 aaagtgtact acagaagttt attcattgag tacggaaaag ctttaggctc atcttcaaca
 181 ggaagcaaag cagaagttt gtttgtaaat atatttatgc aagcttatgg ggccgggtaa
 241 acaatgc
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550153 247 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 92N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550153
 VERSION AY550153.1 GI:45385899
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 247)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..247
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="92N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>247
 /gene="N"
CDS <1..>247
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59795.1"
 /db_xref="GI:45385900"
 /translation="ASTIEVGLETTVRRANRVLSALKRYPRVDIPKIARSFYELFEQ
 KVVYRSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGA"
 ORIGIN
 1 gcatcaacca tagaagtggg actagagact acagtagaa gagctaata agtgctaagt
 61 gatgcactca aaagataccc taggtagat ataccaaaga ttgctagatc tttttatgaa
 121 ctatttgaac aaaaagtgta ctacagaagc ttattcattg agtacggaaa agctttaggc
 181 tcatcttcaa caggaagcaa agcagaaagt ttgtttgtaa atatatttat gcaagcttat
 241 ggggccg
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550154 248 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 135N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550154
 VERSION AY550154.1 GI:45385901
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 248)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..248
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="135N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>248
 /gene="N"
CDS <1..>248
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59796.1"
 /db_xref="GI:45385902"
 /translation="ASTIEVGLETTIRRANRVLS DALKRYPRVDIPKIAR SFYELFEQ
 KVVYRSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGAG"
 ORIGIN
 1 gcatcaacca tagaagtggg actagagact acaattagaa gagctaata ggtgctaagt
 61 gatgcactca aaagataccc taggtagat ataccaaaga ttgctagatc tttttatgaa
 121 ctatttgaac aaaaagtgta ctacagaagt ttattcattg agtacggaaa agctttaggc
 181 tcatctcaa caggaagcaa agcagaaagt ttgtttgtaa atatatttat gcaagcttat
 241 ggggccgg
 //

LOCUS AY550155 247 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 155N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550155
 VERSION AY550155.1 GI:45385903
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 247)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..247
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="155N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>247
 /gene="N"
CDS <1..>247
 /gene="N"
 /codon_start=1
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59797.1"
 /db_xref="GI:45385904"
 /translation="EVGLETTVRRANRVLSDALKRYPRVDIPKIARSFYELFEQKVYY
 RSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGAGQTM"
 ORIGIN
 1 gaagtgggac tagagactac agttagaaga gctaatagag tgctaagtga tgcactcaaa
 61 agatacccta gggtagatat accaaagatt gctagatcct tttatgaact atttgaacaa
 121 aaagtgtact acagaagttt attcattgag tacggaaaag ctttaggctc atcttcaaca
 181 ggaagcaaag cagaagttt gtttgtaaat atatttatgc aagcttatgg ggccgggtaa
 241 acaatgc
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550156 249 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 176N nucleocapsid protein (N) gene,
 partial cds.
 ACCESSION AY550156
 VERSION AY550156.1 GI:45385905
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 249)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Bedi,K.,
 Thawornsuk,N. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..249
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="176N"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>249
 /gene="N"
CDS <1..>249
 /gene="N"
 /codon_start=3
 /product="nucleocapsid protein"
 /protein_id="AAS59798.1"
 /db_xref="GI:45385906"
 /translation="EVGLETTVRRANRVLSDALKRYPRMDIPKIARSFYDLFEQKVYY
 RSLFIEYGKALGSSSTGSKAESLFVNIFMQAYGAGQTM"
 ORIGIN
 1 tagaagtggg actagagacc acagtcagaa gagctaaccg tgtactaagt gatgcactca
 61 aaagatacc tagaatggac ataccaaaaa ttgctagatc ctctatgac ttattgaac
 121 aaaaagtgta ttacagaagt ttgtcattg agtatggcaa agcattagc tcctcctcta
 181 caggcagcaa agcagaaagt ttattcgta atatattcat gcaagcttat ggggccggtc
 241 aaacaatgc
 //

LOCUS AY550157 425 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 34F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550157
 VERSION AY550157.1 GI:45385907
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 425)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..425
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="34F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>425
 /gene="F"
CDS <1..>425
 /gene="F"
 /codon_start=2
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59799.1"
 /db_xref="GI:45385908"
 /translation="TDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSS
 VIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYQONAGSTVYYPNEK
 DCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKV"
 ORIGIN
 1 gacagatgct gaactagcca gggccgttc caacatgccg acatctgcag gacaaataaa
 61 attgatgttg gaaaaccgtg caatggtgcg aaggaagggg ttcggaatcc tgataggggt
 121 ctacgggagc tccgtaattt acatggtgca gctgccaatc tttggcgta tagacacgcc
 181 ttgctggata gtaaaagcag ccccttcttg ttccgaaaaa aagggaaact atgcttgct
 241 ctaagagaa gaccaaggat ggtattgtca aaatgcaggg tcaactgttt actaccctaa
 301 tgagaaagac tgtgaaacaa gaggagacca tgtctttgc gacacagcag caggaattaa
 361 tgttgctgag caatcaaagg agtgcaacat caacatatcc accacaaatt acccatgcaa
 421 agtta

LOCUS AY550158 325 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 40F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550158
 VERSION AY550158.1 GI:45385909
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 325)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..325
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="40F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>325
 /gene="F"
CDS <1..>325
 /gene="F"
 /codon_start=2
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59800.1"
 /db_xref="GI:45385910"
 /translation="SAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVID
 TPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDOGWYQONAGSTVYYPNEKDCETRGDHFCDTA
 AGINVA"
 ORIGIN
 1 atctgcagga caaataaaat tgatgttggg aaaccgtgca atggtgcgaa ggaaggggtt
 61 cggaatcctg ataggggtct acgggagctc cgtaatttac atggtgcagc tgccaatctt
 121 tggcggtata gacagcctt gctggatagt aaaagcagcc ccttctgtt ccgaaaaaaa
 181 gggaaactat gcttgctct taagagaaga ccaaggatgg tattgtcaaa atgcagggtc
 241 aactgtttac tacccaatg agaaagactg tgaacaaga ggagaccatg tctttgcga
 301 cacagcagca ggaattaatg ttgct
 //

LOCUS AY550159 305 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 54F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550159
 VERSION AY550159.1 GI:45385911
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 305)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..305
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="54F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>305
 /gene="F"
CDS <1..>305
 /gene="F"
 /codon_start=1
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59801.1"
 /db_xref="GI:45385912"
 /translation="QIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPC
 WIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYQONAGSTVYYPNEKDCETRGDHFCDTAAG"
 ORIGIN
 1 caataaaat tgatgttga aaaccgtgca atggtgcaa ggaaggggtt cggaatcctg
 61 ataggggtct acgggagctc cgtaatttac atggtgcagc tgccaatctt tggcggtata
 121 gacacgcctt gctggatagt aaaagcagcc ccttctgtt ccgaaaaaaa gggaaactat
 181 gcttgctct taagagaaga ccaaggatgg tattgtcaaa atgcagggtc aactgtttac
 241 tacccaatg agaaagactg tgaacaaga ggagaccatg tctttgcca cacagcagca
 301 ggaat
 //

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550160 339 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 88F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550160
 VERSION AY550160.1 GI:45385913
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 339)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..339
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="88F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>339
 /gene="F"
CDS <1..>339
 /gene="F"
 /codon_start=3
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59802.1"
 /db_xref="GI:45385914"
 /translation="GQLKLMLNRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTP
 CWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYQONAGSTVYYPNEKDCETRGDHFCDTAAG
 INVAEQSKEC"
 ORIGIN
 1 caggacaatt aaaattgatg ttgaaaacc gtgcaatggt gcgaaggaag gggttcggaa
 61 tcctgatagg ggtctacggg agctccgtaa tttacatggt gcagctgcca atctttggcg
 121 ttatagacac gccttgctgg atagtaaaag cagccccttc ttgttccgaa aaaaagggaa
 181 actatgcttg cctctaaga gaagaccaag gatggtattg tcaaatgca gggtaactg
 241 ttactacc aatgagaaa gactgtgaaa caagaggaga ccatgtcttt tgcgacacag
 301 cagcaggaat taatgtagct gagcaatcaa aggagtgca
 //

LOCUS AY550161 365 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 89F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550161
 VERSION AY550161.1 GI:45385915
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 365)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..365
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="89F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>365
 /gene="F"
CDS <1..>365
 /gene="F"
 /codon_start=2
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59803.1"
 /db_xref="GI:45385916"
 /translation="DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVY
 GSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYA CLLREDQGWYCONAGSTVYYP
 NEKDCETRGDHVFCDTAAG"
 ORIGIN
 1 ggacttaatg acagatgctg aactagccag ggccgtttcc aacatgccga catctgcagg
 61 acaaataaaa ttgatgttg aaaaccgtgc aatggtgcga aggaaggggt tcggaatcct
 121 gataggggtc tacgggagct ccgtaattta catggtgcag ctgccaatct ttggcgttat
 181 agacacgctc tgctggatag taaaagcagc ccttcttgt tccgaaaaaa agggaaacta
 241 tgctgcctc ttaagagaag accaaggatg gtattgtcaa aatgcagggt caactgttta
 301 ctacccaaat gagaagact gtgaaacaag aggagacat gtctttgcg acacagcagc
 361 aggaa
 //

LOCUS AY550162 397 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 91F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550162
 VERSION AY550162.1 GI:45385917
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 397)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..397
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="91F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>397
 /gene="F"
CDS <1..>397
 /gene="F"
 /codon_start=3
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59804.1"
 /db_xref="GI:45385918"
 /translation="SAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVID
 TPCWIIKAAPSCSEKNGNYACLLREDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFVCDTA
 AGINVAEQSRECNINISTTNYPCKVSTGR"
 ORIGIN
 1 catctgcagg acagataaaa ctgatgttgg agaaccgcg aatggtaagg agaaaaggat
 61 ttggaatcct aataggggtc tacggaagct ctgtgattta catggttcaa ttgccgatct
 121 ttggtgtcat agatacacct tgttgataa tcaaggcagc tcctcttgc tcagaaaaaa
 181 acgggaatta tgctgcctc ctaagagagg atcaagggtg gtattgtaa aatgcaggat
 241 ccactgttta ctaccaa at gaaaagact gtgaaacaag aggtgatcat gtttttgg
 301 acacagcagc agggatcaat gttgctgagc aatcaagaga atgcaacatc aacatatcta
 361 ctaccaacta cccatgcaaa gttagcacag gaagaca
 //

LOCUS AY550163 425 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 92F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550163
 VERSION AY550163.1 GI:45385919
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 425)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..425
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="92F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>425
 /gene="F"
CDS <1..>425
 /gene="F"
 /codon_start=1
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59805.1"
 /db_xref="GI:45385920"
 /translation="SLDLMTDAELARAVSYMPTSAGQIKMLENRAMVRRKGFILIG
 VYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIIKAAPSCSEKNGNYACLLREDOGWYCKNAGSTVY
 YPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSRECNINISTTN"
 ORIGIN
 1 tctttggact taatgacaga tgctgaattg gccagagctg tatcatacat gccaacatct
 61 gcagggcaga taaaactgat gttggagaac cgcgcaatgg taaggagaaa aggatttggg
 121 atcctaata gggctacgg aagctctgtg atttaccatg ttcaattgcc gatctttggt
 181 gtcatagata cacctgttg gataatcaag gcagtcctt ctgctcaga aaaaaacggg
 241 aattatgctt gcctcctaag agaggatcaa ggggtgtatt gtaaaaatgc aggatccact
 301 gtttactacc caaatgaaaa agactgtgaa acaagagggtg atcatgtttt ttgtgacaca
 361 gcagcagga tcaatgttgc tgagcaatca agagaatgca acatcaacat atctactacc
 421 aacta
 //

LOCUS AY550164 294 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 135F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550164
 VERSION AY550164.1 GI:45385921
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 294)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..294
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="135F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>294
 /gene="F"
CDS <1..>294
 /gene="F"
 /codon_start=1
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59806.1"
 /db_xref="GI:45385922"
 /translation="RAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIIKAAPS
 CSEKNGNYACLLREDOGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAE"
 ORIGIN
 1 cgcgcaatgg taaggagaaa aggatttggg atcctaatag gggctctacgg aagctctgtg
 61 atttaccatgg ttcaattgcc gatctttggg gtcatagata caccttggtg gataatcaag
 121 gcagctccct ctgtctcaga aaaaaacggg aattatgctt gcctcctaag agaggatcaa
 181 ggggtgtatt gtaaaaatgc aggatccact gtttactacc caaatgaaaa agactgtgaa
 241 acaagaggtg atcatgtttt ttgtgacaca gcagcagga tcaatgttgc cgag
 //

LOCUS AY550165 317 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 155F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550165
 VERSION AY550165.1 GI:45385923
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 317)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..317
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="155F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>317
 /gene="F"
CDS <1..>317
 /gene="F"
 /codon_start=1
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59807.1"
 /db_xref="GI:45385924"
 /translation="TSAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVI
 DTPCWIIKAAPSCSEKNGNYACLLREDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFVCDT
 AAG"
 ORIGIN
 1 acatctgcag gacagataaa actgatgttg gagaaccgcg caatggtaag gagaaaagga
 61 tttggaatcc taataggggt ctacggaagc tctgtgatt acatggttca attgccgatc
 121 tttggtgtca tagatacacc ttgttgata atcaaggcag ctcctcttg ctcagaaaaa
 181 aacgggaatt atgcttgct cctaagagag gatcaagggt ggtattgtaa aaatgcagga
 241 tccactgtt actaccaaa tgaaaaagac tgtgaaaca gaggtgatca tgtttttgt
 301 gacacagcag caggat
 //

LOCUS AY550166 330 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 176F fusion protein (F) gene, partial
 cds.
 ACCESSION AY550166
 VERSION AY550166.1 GI:45385925
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 330)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R., Thongmee,C.,
 Yambangyang,A. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..330
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="176F"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>330
 /gene="F"
CDS <1..>330
 /gene="F"
 /codon_start=3
 /product="fusion protein"
 /protein_id="AAS59808.1"
 /db_xref="GI:45385926"
 /translation="ENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAA
 PSCSEKKGNYACLLREDQGWYCONAGSTVYYPNKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQS
 KECNINI"
 ORIGIN
 1 tggaaaaccg tgcaatggtg cgaaggaagg ggttcggaat cctgataggg gtctacggga
 61 gctccgtaat ttacatggtg cagctgcaa tctttggcgt tatagacacg ccttgctgga
 121 tagtaaaagc agccccttct tgtccgaaa aaaagggaaa ctatgcttgc ctcttaagag
 181 aagaccaagg atggtattgt caaatgcag gtcaactgt ttactacca aatgagaaaag
 241 actgtgaaac aagaggagac catgtctttt gcgacacagc agcaggaatt aatgttgctg
 301 agcaatcaaa ggagtgaac atcaacatat
 //

LOCUS AY550167 172 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 34L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550167
 VERSION AY550167.1 GI:45385927
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..172
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="34L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>172
 /gene="L"
CDS <1..>172
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59809.1"
 /db_xref="GI:45385928"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt aaataagaga gagaattatt
 61 tccatggaaa caatcttatt gagtctttat cagcagcatt agcatgtcat tgggtgggga
 121 tattaacaga acaatgcata gaaaataata ttttcaagaa agactggggg ga
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550168 172 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 40L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550168
 VERSION AY550168.1 GI:45385929
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..172
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="40L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>172
 /gene="L"
CDS <1..>172
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59810.1"
 /db_xref="GI:45385930"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt aaataagaga gagaattatt
 61 tccatggaac caatcttatt gagtctttat cagcagcatt agcatgtcat tgggtggga
 121 tattaacaga acaatgcata gaaaataata tttcaagaa agactggggt ga
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550169 172 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 54L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550169
 VERSION AY550169.1 GI:45385931
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..172
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="54L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>172
 /gene="L"
CDS <1..>172
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59811.1"
 /db_xref="GI:45385932"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt gaataagaga gagaattatt
 61 tccatggaaa caatcttatt gagtctttat cagcagcatt agcatgtcat tgggtgggga
 121 tattaacaga acaatgcata gaaaataata ttttcaagaa agactggggg ga
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550170 173 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 88L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550170
 VERSION AY550170.1 GI:45385933
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 173)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..173
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="88L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>173
 /gene="L"
CDS <1..>173
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59812.1"
 /db_xref="GI:45385934"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWGD"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt aaataagaga gagaattatt
 61 tccatggaaa caatcttatt gagtctttat cagcagcatt agcatgtcat tgggtgggga
 121 tattaacaga acaatgcata gaaaataata ttttcaagaa agactggggg gac
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550171 171 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 89L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550171
 VERSION AY550171.1 GI:45385935
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 171)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..171
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="89L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>171
 /gene="L"
CDS <1..>171
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59813.1"
 /db_xref="GI:45385936"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tattaagggt cagaaaacag atcagttctt aaataagaga gagaattatt
 61 tccatggaaa caatcttatt gagtctttat cagcagcatt agcatgtcat tgggtgggga
 121 tattaacaga acaatgcata gaaaataata ttttcaagaa agactgggggt g
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550172 172 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 91L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550172
 VERSION AY550172.1 GI:45385937
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..172
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="91L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>172
 /gene="L"
CDS <1..>172
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59814.1"
 /db_xref="GI:45385938"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt gaacaagaga gagaattatt
 61 tccatgggaa taatcttatt gagtctttgt cagcagcgtt agcatgtcat tgggtgggga
 121 tattaacaga acaatgtata gaaaataata ttttcaagaa agactgggggt ga
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550173 172 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 135L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550173
 VERSION AY550173.1 GI:45385939
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..172
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="135L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>172
 /gene="L"
CDS <1..>172
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59815.1"
 /db_xref="GI:45385940"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt gaacaagaga gagaattatt
 61 tccatgggaa taatcttatt gagtcttgt cagcagcgtt agcatgtcat tgggtggga
 121 tattaacaga acaatgtata gaaaataata tttcaagaa agactggggg ga
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550174 171 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 155L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550174
 VERSION AY550174.1 GI:45385941
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 171)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..171
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="155L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
gene <1..>171
 /gene="L"
CDS <1..>171
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59816.1"
 /db_xref="GI:45385942"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt gaacaagaga gagaattatt
 61 tccatgggaa taatcttatt gagtcttgt cagcagcgtt agcatgtcat tgggtggga
 121 tattaacaga acaatgtata gaaaataata tttcaagaa agactggggg g
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOCUS AY550175 172 bp RNA linear VRL 17-MAR-2004
 DEFINITION Human metapneumovirus isolate 176L RNA-dependent RNA polymerase (L)
 gene, partial cds.
 ACCESSION AY550175
 VERSION AY550175.1 GI:45385943
 KEYWORDS .
 SOURCE Human metapneumovirus
 ORGANISM Human metapneumovirus
 Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales;
 Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)
 AUTHORS Thanasugarn,W., Theamboonlers,A., Samransamruajkit,R.,
 Jantaradsamee,P. and Poovorawan,Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-FEB-2004) Pediatrics, Chulalongkorn University,
 Rama4, Bangkok 10330, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..172
 /organism="Human metapneumovirus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /isolate="176L"
 /db_xref="taxon:162145"
 /country="Thailand"
 gene <1..>172
 /gene="L"
 CDS <1..>172
 /gene="L"
 /codon_start=3
 /product="RNA-dependent RNA polymerase"
 /protein_id="AAS59817.1"
 /db_xref="GI:45385944"
 /translation="MPTIKGQKTDQFLNKRENYFHGNNLIESLSAALACHWCGILTEQ
 CIENNIFKKDWG"
 ORIGIN
 1 tcatgcccac tataaaaggc cagaaaacag atcagttctt aaataagaga gagaattatt
 61 tccatggaaa caatcttatt gagtctttat cagcagcatt agcatgtcat tgggtggsa
 121 tattaacaga acaatgcata gaaaataata tttcaagaa agactggggg ga
 //

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

