



A2

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการ การติดเชื้อในกระแสเลือด รูปแบบ การกระจายตัวของเชื้อและการดำเนินโรคของเชื้อ
Human Bocavirus ในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

โดย

ผศ.ดร.ไมตรี ปะการะสังข์ และคณะ

ตุลาคม 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การติดเชื้อในกระแสเลือด รูปแบบ การกระจายตัวของเชื้อและการดำเนินโรคของเชื้อ Human Bocavirus ในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. ผศ.ดร.ไมตรี ปะการะสังข์ | สังกัดกลุ่มงานจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ |
| 2. รศ.ดร.จุฬารัตน์ ปรีชาติกุล | สังกัดกลุ่มงานจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ |
| 3. ผศ.ดร.พรทิพย์ ปิ่นละอ | สังกัดกลุ่มงานจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ |
| 4. ศ.ดร.จามรี อีรตกุลพิศาล | สังกัดภาควิชาภูมิคุ้มกันเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ |
| 5. รศ.ดร.จิราภรณ์ ศรีนัครินทร์ | สังกัดภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ |
| 6. น.ส.ชนากานต์ จันทวงษ์ | สังกัดสาขาชีวเวชศาสตร์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย |

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ: การติดเชื้อในกระแสเลือด รูปแบบ การกระจายตัวของเชื้อและการดำเนินโรคของเชื้อ

Human Bocavirus ในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.ไมตรี ปะการะสังข์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: maipak@kku.ac.th

เชื้อไวรัส human bocavirus 1 (HBoV1) มีความสำคัญในการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็ก แต่อย่างไรก็ตาม ความสำคัญทางคลินิกของการกระจายของเชื้อในผู้ป่วยเด็ก โรคระบบทางเดินหายใจยังไม่แน่ชัด การศึกษานี้เพื่อตรวจหา HBoV1DNA จากสิ่งส่งตรวจหลายชนิด ในผู้ป่วยเด็กโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ที่รักษาในโรงพยาบาล โดยเก็บสิ่งส่งตรวจ 4 ชนิดจากผู้ป่วยแต่ละคน คือ nasopharyngeal aspirate, nasopharyngeal swab เลือด และอุจจาระ ตรวจวิเคราะห์ HBoV1 DNA โดยใช้เทคนิค nested PCR ผลการทดลองพบว่า ตรวจพบ HBoV1 DNA จากสิ่งส่งตรวจทางเดินหายใจ 51 รายจากทั้งหมด 147 ราย คิดเป็น 34.69 % ในเลือดพบ 25 รายคิดเป็น 17.01% และผู้ป่วยทุกรายที่พบเชื้อ HBoV1 DNA ในเลือดจะให้ผลบวกต่อไวรัสจากสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจด้วยทั้งนี้ผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HBoV1 พบมากในเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปีซึ่งมักจะพบความชุกของเชื้อ HBoV1 ในฤดูร้อน และฤดูหนาว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเดือนมีนาคม และเดือนตุลาคม และ HBoV1DNA sequences จากสิ่งส่งตรวจต่างชนิดกัน ในผู้ป่วยรายเดียวกันมักจะมีความคล้ายคลึงกัน ชี้ให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสที่อาจจะเกิดขึ้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นความชุกที่สูงของเชื้อ HBoV1 จากผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่รักษาตัวในโรงพยาบาล และความคล้ายคลึงกันของ DNA sequences ในสิ่งส่งตรวจต่างชนิดกันจากผู้ป่วยรายเดียวกัน ซึ่งแสดงศักยภาพในการแพร่กระจายของเชื้อ

คำสำคัญ: เชื้อ Human bocavirus 1) HBoV1(การแพร่กระจายของเชื้อ HBoV1 โรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง โรคปอดบวมในเด็ก

Abstract

Project Title: Viremia, tissue distribution patterns and disease progression of

Human bocavirus 1 infection in pediatric patients with lower respiratory tract infection

Investigator: Asst.Prof. Dr. Maitree Pakarasang, Faculty of Associated Medical Science,
KhonKaen University

E-mail Address: maipak@kku.ac.th

Human bocavirus 1 infection is associated with lower respiratory tract diseases in children. However, the clinical significance of HBoV1 dissemination in pediatric patients with pneumonia is unclear. This study investigated the presence of HBoV1 DNA in various sample types in pediatric patients hospitalized with lower respiratory tract infections (LRTI). Four types of samples were collected from each patient; nasopharyngeal aspirate, nasopharyngeal swab, blood and feces. HBoV1 DNA was identified by nested PCR. In the result, HBoV1 DNA was detected in 34.69% (51/147 cases) of respiratory samples and 17.0% (25/147) of blood samples from pediatric patients with LRTI. All patients with HBoV1 DNA in the blood were also positive for viral DNA in respiratory sample. Most HBoV1 DNA-positive patients were less than 1 year of age. HBoV1 prevalence was mainly found in the summer and winter seasons, especially in March and October. HBoV1 DNA sequences from different samples taken from the same patient were usually identical, indicating that disseminated infection might occur.

In conclusions: this study reveals a high prevalence of HBoV1 infection in hospitalized pediatric pneumonia patients and a similarity of its DNA sequences in different sample types from the same patient indicates the potential for disseminated infection by this virus.

Keywords: Human bocavirus 1) HBoV1, disseminated HBoV1, lower respiratory tract disease, pediatric pneumonia

Executive Summary

เชื้อ human bocavirus 1 (HBoV1)มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กทารก และเด็กเล็ก ที่มีความชุกสูงขึ้นทั่วโลก การศึกษานี้ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ HBoV1 ในสิ่งส่งตรวจหลายๆ ชนิดจากผู้ป่วยเด็กโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่รักษาตัวในโรงพยาบาล โดยสิ่งส่งตรวจทั้ง 4 ชนิด คือ สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ (nasopharyngeal aspirate และ nasopharyngeal swab)ตัวอย่างเลือด และอุจจาระ ซึ่ง 4 ตัวอย่างนี้ เก็บจากผู้ป่วยรายเดียวกันจากโรงพยาบาลขอนแก่น และโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทยจากนั้นตรวจวิเคราะห์เชื้อ HBoV1 DNA โดยเทคนิค nested PCR และการศึกษารายงาน เชื้อ HBoV1 DNA พบ 34.69% (51/147 ราย) จากสิ่งส่งตรวจที่มาจากระบบทางเดินหายใจ และพบ 17.01% (25/147 ราย) จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเด็กโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่รักษาตัวในโรงพยาบาล ซึ่งผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสในเลือด มักจะตรวจพบผลบวกจากตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยเด็กที่พบให้ผลบวกต่อเชื้อมากคือ ช่วงอายุน้อยกว่า 1 ปี และเชื้อ HBoV1 พบความชุกในฤดูฝนมากกว่าฤดูร้อนและฤดูฝน และจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ HBoV1 DNA จากสิ่งส่งตรวจต่างชนิดกัน ที่มาจากผู้ป่วยรายเดียวกันนั้นมักจะมีลำดับเบสของเชื้อที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจแสดงถึงการแพร่กระจายของเชื้อที่เกิดขึ้นในร่างกาย ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า การศึกษานี้พบความชุกที่สูงของการติดเชื้อ HBoV1 ในผู้ป่วยเด็กโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่รักษาตัวในโรงพยาบาล และพบความคล้ายกันของ DNA sequences ของเชื้อไวรัสในสิ่งส่งตรวจต่างชนิดกัน แต่มาจากผู้ป่วยรายเดียวกันชี้ให้เห็นถึงศักยภาพการแพร่กระจายของเชื้อ HBoV1 ในร่างกาย ซึ่งจะเป็นพื้นฐานต่อการศึกษาอื่นๆ ในอนาคต

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ก่อนปี พ.ศ.2548 เป็นที่รู้จักกันว่าเชื้อไวรัสใน family *Parvoviridae* ซึ่งเป็น DNA virus ที่มีขนาดเล็กที่สุดนั้น มีเพียงเชื้อ Human parvovirus B19 ที่สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้ จนกระทั่งในเดือนกันยายน พ.ศ.2548 นักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ชื่อ Tobias Allander และคณะ ค้นพบเชื้อ parvovirus ตัวใหม่ ที่รู้จักกันในชื่อ “Human bocavirus (HBoV)” ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อ parvovirus ตัวที่สองของ family *Parvoviridae* ที่สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้ (1, 2) HBoV ตรวจพบครั้งแรกในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจในคนไข้เด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในประเทศสวีเดน แต่อย่างไรก็ตามสำหรับกลไกการก่อโรคของเชื้อ HBoV นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ประกอบกับความรู้เกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อก็ยังมีข้อจำกัดอยู่ ทั้งนี้เหตุผลใหญ่ๆ เพราะว่าการวิเคราะห์การติดเชื้อ HBoV โดยผ่านวิธีการเพาะเชื้อนั้นเป็นไปได้ยาก และยังไม่มียาหรือวัคซีนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนี้ (3) แต่อย่างไรก็ตาม หลายๆ การศึกษามีรายงานเกี่ยวกับเชื้อ HBoV ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยสามารถตรวจพบในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เช่น nasopharyngeal aspirate (NPA) , nasopharyngeal swab (NPS) (4) เชื้อนี้มักตรวจพบได้บ่อยในผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี ที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีอาการหายใจขัดมีเสียง (wheezing) ร่วมด้วย ในขณะที่การตรวจพบเชื้อในผู้ใหญ่พบน้อยมาก (1, 5-7) ในหลายๆ การศึกษาทั่วโลกแสดงความชุกของเชื้อ HBoV ในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจได้ประมาณ 1.5% - 33% (1, 5, 8) นอกจากนี้ HBoV ไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับโรค gastroenteritis และอาการท้องร่วงอีกด้วย แต่กลไกการก่อโรค gastroenteritis ของเชื้อ HBoV ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเช่นกัน (5, 9) โดยสามารถตรวจพบได้ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระมีความชุกของเชื้อประมาณ 0.9 - 17.2% (3, 10) ต่อมาการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่าเชื้อ HBoV เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อที่เป็น systemic infection ในช่วง active replication และมีรายงานว่าเชื้อ HBoV นั้นสามารถตรวจพบได้ในเลือด/พลาสมา/สเปิร์มได้ด้วย (11, 12)

หลายๆ การศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับเชื้อ HBoV ชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อ HBoV สามารถมีการกระจายของเชื้อเข้าไปได้ในหลายระบบในร่างกายมนุษย์ ซึ่งสิ่งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคของเชื้อ HBoV หรือเกี่ยวข้องกับอวัยวะเป้าหมายในการก่อโรคของเชื้อ HBoV ก็ได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยมีความ

สนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจพบเชื้อ HBoVในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เลือด และอุจจาระ
ในคนไข้เด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

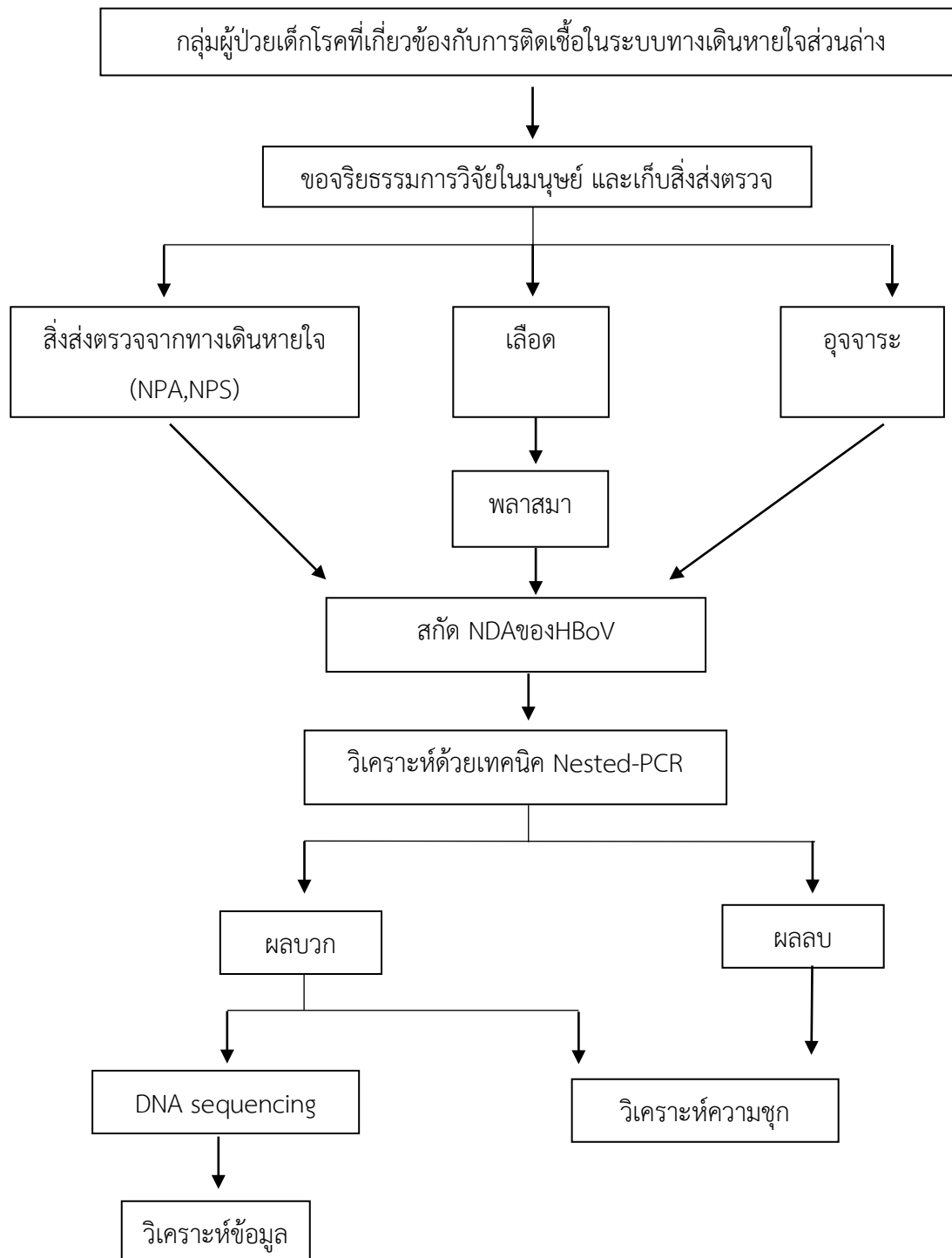
1. เพื่อศึกษาอัตราการตรวจพบเชื้อ HBoVในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เลือด และอุจจาระ ในคนไข้เด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ทั้งที่มีอาการ wheezing และ ไม่มีอาการ
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความเกี่ยวข้องของการติดเชื้อHBoVในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เลือด และอุจจาระ ในคนไข้เด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ทั้งที่มีอาการ wheezing และไม่มีอาการ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถบอกสถานการณ์การพบเชื้อ HBoVในเด็กที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ และโรงพยาบาลขอนแก่น
2. สามารถบอกความสัมพันธ์ของการตรวจพบเชื้อ HBoVในระบบทางเดินหายใจ เลือด และอุจจาระ ในเด็กที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การออกแบบการทดลอง



รูปที่ 1 แสดงการออกแบบการทดลอง

2.2 จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการวิจัยเลขที่ HE571131 และได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลขอนแก่นโครงการวิจัยเลขที่ KE57036 นอกจากนี้ผู้ปกครองและผู้ป่วยเด็ก ได้ลงนามในแบบยินยอมอาสาสมัครก่อนเริ่มเก็บสิ่งส่งตรวจทุกราย

2.3 ขนาดกลุ่มตัวอย่าง

$$\text{สูตรคำนวณ} \quad N = (z\alpha/2)^2 pq/d^2$$

$$\text{โดย } z\alpha/2 = 1.96, p(\text{average } 10\%) = 0.1, q = 1-p = 0.9, d = 0.05$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า} \quad N &= (1.96)^2 \times 0.1 \times 0.9 / (0.05)^2 \\ &= 138.3 = 139 \text{ คน} \end{aligned}$$

2.4 การเก็บสิ่งส่งตรวจ

เก็บสิ่งส่งตรวจ 4 ชนิดจากผู้ป่วยเด็กรายเดียวกัน คือสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ (nasopharyngeal aspirate (NPA) และ nasopharyngeal swab (NPS) เลือด และอุจจาระ จากคนไข้เด็กอายุแรกเกิดถึง 14 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์เจ้าของไข้ ว่ามีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (ซึ่งหมายถึง การติดเชื้อที่อยู่ต่ำกว่าระดับกล่องเสียง เช่น หลอดลมฝอยอักเสบ โรคหลอดลมอักเสบ ปอดบวม laryngotracheobronchitis; croup) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ หรือโรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น จำนวน 147 ราย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2557 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2558

2.5 การเตรียมตัวอย่าง

สิ่งส่งตรวจที่เป็น NPA เก็บโดยใช้ mucus extractor และสิ่งส่งตรวจที่เป็น NPS โดยใช้ flocculated nasal swab รักษาสภาพใน phosphate buffered saline , pH 7.2 ส่วนสิ่งส่งตรวจที่เป็น whole blood เก็บใน EDTA tube จากนั้นนำมาแยกพลาสมา โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm 10 นาที ส่วนสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระ เตรียมโดยนำอุจจาระมาละลายกับ 0.89% NaCl ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อเตรียมเป็น 10% suspensions ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm 20 นาที จากนั้นนำของเหลวข้างบน (supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด pore size 0.22 μm และเก็บ

ของเหลวที่ได้ (13, 14) สิ่งส่งตรวจทั้งหมดจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งจะมีขั้นตอนการสกัด DNA

2.6 การสกัด DNA ของเชื้อ HBoV

สิ่งส่งตรวจทั้งหมดจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนที่จะมีการสกัด DNA สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็น NPA, NPS และพลาสมา ทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAampMinElute Virus Spin Kit (QIAGEN®) (Falcone et al., 2011; Hao et al., 2013) ส่วนสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระ ทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAamp Viral DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN®) (13, 15)

2.7 การตรวจหาเชื้อ HBoV โดยเทคนิค Nested-PCR

ตรวจหาเชื้อ HBoV จาก DNA ที่สกัดแล้ว โดยใช้ยีนเป้าหมาย VP1 ของเชื้อ HBoV โดยเทคนิค nested PCR และใช้ primer ที่เฉพาะ ดังแสดงในตารางที่ 1 (13, 14)

ตารางที่ 1 Nested PCR primers สำหรับตรวจเชื้อ HBoV

	Primers	Sequences	Gene	Size
First	AK-VP-F1	5'-CGCCGTGGCTCCTGCTCT-3'	VP1/2	611 bp
round PCR	AK-VP-R1	5'-TGTTGCGCCATCACAAAAGATGTG-3'	VP1/2	
Second	AK-VP-F2	5'-GGCTCCTGCTCTAGGAAATAAAGAG-3'	VP1/2	576 bp
round PCR	AK-VP-R2	5'-CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTGTATGT-3'	VP1/2	
Internal	GAPDH.5F	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'	GAPDH	226 bp
control	GAPDH.230R	5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'	GAPDH	

2.8 PCR reaction ของ first round of nested PCR

PCR reaction

1. เตรียม master mix และเติมน้ำยาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2
2. เติม DNA 2.5 µl ในแต่ละหลอด
3. สำหรับ negative control จะเติม sterile distilled water 2.5 µl
4. Final volume คือ 50 µl.

ตารางที่ 2 PCR master mix สำหรับเชื้อ HBoV

	Components	Final concentration	Volume for 1 reaction (μl)
1	HBoVAK-VP-F1(20 pmol)	0.4 μM	0.2
2	HBoVAK-VP-F2 (20 pmol)	0.4 μM	0.2
3	Forward primer GAPDH (20 pmol)	0.4 μM	0.2
4	Reverse primer GAPDH (20 pmol)	0.4 μM	0.2
5	PCR buffer with MgCl ₂ 2 mM (10x)	1.1x	5.5
6	dNTP (2.5 mM)	0.2 mM	4
7	<i>Taq</i> polymerase (5 U/μl)	2.5 U	0.5
8	Sterile DW		36.7
	Total master mix volume		47.5
9	DNA		2.5
	Final total volume		50

ตารางที่ 3 Amplification Protocol สำหรับเชื้อHBoV

Step	Time	Temperature
Initial Denaturation	3 min	95 °C
Denaturation	30 sec	95 °C
Annealing	45 sec	54 °C
Extension	45 sec	72°C
Final extension	10 min	72 °C

} 35 cycles

2.9 PCR reaction ของ second round of nested PCR

ปฏิกิริยา PCR เหมือนกับ first round of nested PCR second round แต่ second round PCR จะใช้ PCR product จาก first round มาเป็น DNA จำนวน 1 μl และ primer จะเปลี่ยนมาใช้ AK-VP-F2 and AK-VP-R2 แทน AK-VP-F1 and AK-VP-R1 ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ในส่วนของการ PCR

amplification protocol เหมือนกับ first round เช่นกัน ยกเว้นในขั้นตอน annealing temperatures จะเปลี่ยนเป็น 58 °C เวลา 45 วินาทีใน second round PCR ดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้น PCR products ถูกทำให้มองเห็นโดยวิธี electrophoresis ที่ 1.5 % agarose gel

2.10 Internal control

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น housekeeping gene ใช้เป็น internal control สำหรับตรวจสอบ DNA โดยใช้เทคนิค Nested-PCR สำหรับ primer ของ internal control มีขนาด 226 bp (16) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

2.11 Positive control

สำหรับ Positive control ได้รับการสนับสนุนจาก ศ.ดร.นิวัฒน์ มณีกาญจน์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย (14) ซึ่งเป็น first round PCR product และ second round PCR product มีขนาด 611 bp และ 576 bp ตามลำดับ

2.12 Extraction of purified PCR product

PCR product ของเชื้อ HBoV ในรายที่ให้ผลบวกถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GenepHlow™ Gel/PCR Kit) Geneaid เพื่อเตรียมเป็น purified PCR product ก่อนที่จะส่งวิเคราะห์ DNA sequencing

2.13 DNA sequencing

Purified PCR product ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HBoV โดยเทคนิค nested-PCR จะนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (MacroGen, Korea) จากนั้นลำดับเบสที่ได้จากผลการวิเคราะห์ DNA sequencing นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงอื่นๆ จาก Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST และ Clustal Omega สำหรับ Phylogenetic tree สร้างโดยใช้วิธี maximum likelihood method (17) โปรแกรม MEGA 7

2.14 ข้อมูลทางคลินิก

ข้อมูลทางคลินิก ประกอบด้วยประวัติการรักษาผู้ป่วย ได้รับความร่วมมือจากงานเวชระเบียนและสถิติ ทั้งโรงพยาบาลศรีนครินทร์ และโรงพยาบาลขอนแก่น สำหรับข้อมูลภาพถ่ายรังสีทรวงอกได้รับความร่วมมือจากงานรังสีเทคนิค และภาควิชารังสีวิทยา ของทั้งสองโรงพยาบาล และในส่วนข้อมูลประวัติการติดเชื้อ ทั้ง

เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัสนั้น ได้รับความร่วมมือจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกของทั้งสองโรงพยาบาล

2.14การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ โดยข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โปรแกรม IBM SPSS Statistics 19 (IBM, Armonk, NY) สถิติ Chi-square test ที่ค่า p -value < 0.05 จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

3. ผลการทดลอง

3.1 โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กที่อยู่ในโรงพยาบาล

จากข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อทางคลินิกของผู้ป่วยเด็ก จำนวน 147 ราย พบผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรียอย่างเดียวน้อยที่สุด จำนวน 44/147, 29.93% และเป็นสาเหตุหลักของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ตามด้วยการติดเชื้อไวรัส พบ 41/147, 27.89% และเชื้อราพบ 7/147, 4.76% นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกันของทั้งเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อรา พบจำนวน 17.01% ของผู้ป่วยทั้งหมด ขณะที่การติดเชื้อร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียกับไวรัส และเชื้อรากับไวรัส พบจำนวน 4.08% และ 0.68% ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วย 2.04% พบร่วมกันทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส และไม่พบสาเหตุการเกิดโรค 17.01% ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ทั้งหมด 147 ราย

ลักษณะทางคลินิก	LRTI cases (n = 147)		P value
	HBoV1 DNA-positive, n (%)	HBoV1 DNA-negative, n (%)	
รวมทั้งหมด	51 (34.69 ^a)	96 (65.31 ^a)	
เพศ			
เพศหญิง	20 (39.22 ^b)	35 (36.46 ^c)	NS
เพศชาย	31 (60.78 ^b)	61 (63.54 ^c)	NS
อายุ			
แรกเกิด -1 ปี	42 (82.35 ^b)	75 (78.13 ^c)	NS
>1 – 3 ปี	4 (7.84 ^b)	9 (9.38 ^c)	NS
>3 –5 ปี	2 (3.92 ^b)	2 (2.08 ^c)	NS
≤5 ปี	3 (5.88 ^b)	10 (10.42 ^c)	NS
ค่าเฉลี่ยของอายุ(เดือน)	15.59	18.42	NS
อาการแสดง			
หายใจมีเสียงwheezing	45 (88.24 ^b)	70 (72.92 ^c)	0.032
ท้องเสีย	15 (29.41 ^b)	28 (29.17 ^c)	NS
ภาวะระบบทางเดินหายใจล้มเหลว	23 (45.01 ^b)	40 (41.67 ^c)	NS
การรักษาในโรงพยาบาล			
การเข้ารักษาที่ ICU	13 (25.49 ^b)	37 (38.54 ^c)	NS

ระยะเวลาที่พักในโรงพยาบาล (วัน, ค่าเฉลี่ย)	25.96	31.57	NS
ระยะเวลาที่พักในห้อง ICU (วัน, ค่าเฉลี่ย)	36.9	44.7	NS
ใส่เครื่องช่วยหายใจ	24 (47.06 ^b)	50 (52.03 ^c)	NS
ระยะเวลาที่ได้รับก๊าซ ออกซิเจน (วัน, ค่าเฉลี่ย)	22.22	26.58	NS
เสียชีวิต	5 (9.8 ^b)	5 (5.21 ^c)	NS
ลักษณะภาพถ่ายรังสี			
มีลักษณะ alveolar และ/หรือ interstitial infiltration	17 (33.33 ^b)	25 (26.04 ^c)	NS
การติดเชื้ออื่นๆ			
Single infection			
แบคทีเรีย	12 (23.53 ^b)	32 (33.33 ^c)	NS
ไวรัส	21 (41.18 ^b)	20 (20.83 ^c)	0.012
รา	1 (1.96 ^b)	6 (6.25 ^c)	NS
Co-infection			
แบคทีเรีย + รา	7 (13.73 ^b)	18 (18.75 ^c)	NS
แบคทีเรีย + ไวรัส	2 (3.92 ^b)	4 (4.17 ^c)	NS
รา + ไวรัส	1 (1.96 ^b)	0	NS
Mixed infection	2 (3.92 ^b)	1 (1.01 ^c)	NS
ไม่มีข้อมูล	5 (9.8 ^b)	20 (20.83 ^c)	NS

หมายเหตุ NS= not significant; HBoV1 = human bocavirus1

^a ค่าร้อยละของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างทั้ง 147 ราย

^b ค่าร้อยละของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HBoV1 ทั้ง 51 ราย

^c ค่าร้อยละของผู้ป่วยที่ให้ผลลบต่อเชื้อ HBoV1 ทั้ง 96 ราย

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของเชื้อ HBoV1 ที่ให้ผลบวก ทั้ง 51 ราย

Pattern no.	Sample ID	Gender	Age	Length of stay in hospital (day)	Types of sample			Bacterial and Fungal infections			Diagnosis
					NPA	NPS	Blood	Feces	Respiratory sample	Blood sample	
1	060*	Male	7 months	3	Positive	Positive	Positive	Positive	no specimen	Blood = NG	Viral pneumonia
	061*	Male	8 months	3	Positive	Positive	Positive	Positive	no specimen	no specimen	Viral pneumonia
	125*	Male	8 months	3	Positive	Positive	Positive	Positive	no specimen	no specimen	Bacterial pneumonia, Iron deficiency
	138	Female	10 months	3	Positive	Positive	Positive	Positive	TS = NG	Blood = NG	Viral pneumonia, Acute respiratory failure, Sepsis with septic shock
2	147*	Female	6 months	11	Positive	Positive	Positive	Negative	no specimen	no specimen	Pneumonia, Bronchopulmonarydysplasia, Respiratory failure
	026*	Male	3 months	7	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	Blood = NG	Bacterial pneumonia
	062*	Male	11 months	8	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	no specimen	Bacterial pneumonia, Asthma
	063	Male	6 months	4	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	no specimen	Viral pneumonia
	064	Female	1 month	2	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	no specimen	Pneumonia
	066*	Male	8 months	25	Positive	Positive	Positive	NA	TS = (F) <i>C. albicans</i>	Blood = NG	Candida albican pneumonia, Bacterial meningitis, Severe hydrocephalus
	073*	Male	11 months	2	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	no specimen	Bacterial pneumonia
	137	Male	1 month	40	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	Blood = NG	Complete atrioventricularseptal defect, Progress pneumonia, Acute respiratory failure
	145*	Male	8 months	14	Positive	Positive	Positive	NA	TS = NG	Blood = NG	Pneumonia, Respiratory failure with hypoxia, Upper gastrointestinal hemorrhage
	146*	Male	9 months	1	Positive	Positive	Positive	NA	no specimen	no specimen	Viral pneumonia
3	128	Male	8 years	78	Positive	Positive	Negative	Positive	TS = (F) <i>K. pneumoniae</i> , (F) <i>A. baumannii</i>	Blood = <i>C.albican</i>	Pneumonia, Viral encephalitis, Acute respiratory failure, Meningoencephalitis, Sepsis
4	111*	Female	10 months	5	NA	Positive	Positive	Positive	no specimen	no specimen	Bronchitis, Viral pneumonia, Acute bronchiolitis
5	027	Male	4 years	45	Positive	Positive	Negative	Negative	TS = (F) <i>S. maltophilia</i>	Blood = NG	Pneumonia, Gastrointestinal bleeding, Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome (MELAS syndrome)
	055*	Male	4 months	5	Positive	Positive	Negative	NA	no specimen	no specimen	Bacterial pneumonia
	056	Male	4 months	5	Positive	Positive	Negative	NA	no specimen	no specimen	Bacterial pneumonia, Persistent pneumonia twin preterm 36 weeks
	065*	Female	14 years	10	Positive	Positive	Negative	NA	TS = (F) <i>A. baumanii</i>	Blood = NG	Respiratory failure, Hospital acquired pneumonia, Pulmonary edema, Hypokalemia, Acute respiratory distress syndrome
	129*	Male	2 years	101					TS = (F) <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumanii</i> , <i>C. albicans</i>	Blood = NG	Pneumonia, Acute respiratory failure
	131*	Female	1 month	3	Positive	Positive	Negative	NA	no specimen	Blood = NG	Viral pneumonia
	139	Male	7 months	2	Positive	Positive	Negative	NA	no specimen	no specimen	Viral pneumonia
	135*	Female	3 months	13	Positive	Positive	NA	Negative	no specimen	no specimen	Viral pneumonia
	140*	Female	1 month	8	Positive	Positive	NA	NA	no specimen	no specimen	Viral pneumonia, Heart failure with ventricle septum with defect patent ductus arteriosus, Hyperkalemia
6	047	Male	6 months	5	Negative	Positive	Positive	Negative	no specimen	Blood = NG	Viral pneumonia
	059*	Male	9 months	3	Negative	Positive	Positive	Negative	no specimen	no specimen	Viral pneumonia, Acute bronchiolitis, Acute respiratory failure
	123*	Female	1 year	40	Negative	Positive	Positive	Negative	TS = (F) Normal flora, (R) <i>C. albicans</i>	Blood = NG	Pneumonia with viral croup U/D, Hydrocephalus S/P VP shunt, Acute bronchiolitis
	001	Female	4 months	2	ND	Positive	Positive	Negative	no specimen	Blood = NG	Acute bronchiolitis, Viral croup, Mild dehydration
	141	Male	7 months	7	Negative	Positive	Positive	ND	no specimen	Blood = NG	Viral pneumonia, Acute viral gastroenteritis
7	005*	Female	1 year	21	Positive	Negative	Positive	Negative	TS = (N) <i>Enterobacter</i> spp, (N) <i>X. maltophilia</i> (MDR)	Blood = NG	LGS (Lennox-Gastaut Syndrome) with delayed development, Aspiration pneumonia, Global delayed development, Communicating hydration
	006*	Female	4 years	85	Positive	Negative	Positive	Negative	TS = (N) <i>P. aeruginosa</i> , (N) <i>X. maltophilia</i> (MDR), (N) <i>A. lwoffii</i>	Blood = NG	Respiratory syncytial virus pneumonia, Aspirated pneumonia, Sepsis, Epilepsy

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของเชื้อ HBoV1 ที่ให้ผลบวก ทั้ง 51 ราย (ต่อ)

Pattern no.	Sample ID	Gender	Age	Length of stay in hospital (day)	Types of sample			Bacterial and Fungal infections			Diagnosis
					NPA	NPS	Blood	Feces	Respiratory sample	Blood sample	
7	015	Female	5 months	277	Positive	Negative	Positive	Negative	no specimen	Blood = NG	Preterm with respiratory failure, Hospital acquired pneumonia Pneumonia Bacterial pneumonia, Hospital acquired pneumonia
	050	Male	2 months	3	Positive	Negative	Positive	Negative	no specimen	Blood = NG	
	144	Male	3 months	11	Positive	Negative	Positive	Negative	no specimen	Blood = NG	
8	002	Female	5 months	7	Positive	NA	Negative	Positive	TS = (F) <i>X. maltophilia</i> , (F) <i>A. baumannii</i> (MDR), (F) <i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	no specimen	Pneumonia
	033	Female	6 months	155	Positive	Negative	Negative	Positive	TS = (N) <i>P. aeruginosa</i> (MDR), (M) <i>A. baumannii</i>	Blood = NG	Nosocomial pneumonia, Acute respiratory failure, Slow fetal growth
9	008	Female	10 months	10	Positive	Negative	Negative	Negative	Sputum = NG	Blood = NG	Pneumonia with respiratory failure, Down syndrome, Atrial septal defect, Patent ductus arteriosus
	109	Male	9 months	3	Positive	Negative	Negative	Negative	no specimen	Blood = NG	Viral pneumonia, Community acquired pneumonia
	117	Female	7 years	19	Positive	Negative	Negative	Negative	TS = (N) <i>P. aeruginosa</i> , (F) <i>Moraxella</i> spp	Blood = NG	Aspirated pneumonia with respiratory failure, Upper airway obstruction
	076	Male	2 months	1	Positive	Negative	Negative	NA	no specimen	Blood = NG	Viral pneumonia
	090	Female	6 months	177	Positive	Negative	Negative	NA	no specimen	Blood = NG	Nosocomial pneumonia, Acute respiratory failure, Cardiac catheterization
	127	Male	1 year	32	Positive	Negative	NA	Negative	TS = (M) <i>A. baumannii</i>	Blood= Coagulase Negative staphylococci	Viral pneumonia, Community acquired pneumonia, Respiratory failure
10	072	Male	7 months	5	Negative	Positive	Negative	Negative	no specimen	no specimen	Viral pneumonia, Acute diarrhea, Febrile convulsion
	085	Male	9 months	9	Negative	Positive	Negative	Negative	no specimen	Blood = NG	Bacterial pneumonia, Respiratory failure, Bronchopulmonary dysplasia, Cholestatic jaundice
	136	Male	3 months	19	Negative	Positive	Negative	Negative	TS = NG	Blood = NG	Bacterial pneumonia, Acute respiratory failure, Upper airway obstruction
	067	Male	1 year	7	Negative	Positive	Negative	NA	TS= (F) <i>P. aeruginosa</i>	Blood = NG	Bacterial pneumonia, Acute gastroenteritis, Respiratory failure
	071	Female	3 months	11	Negative	Positive	NA	Negative	TS = NG	Blood = NG	Atypical pneumonia, Atrial septal defect, VACTERL syndrome
	110	Male	2 years	4	NA	Positive	Negative	Negative	no specimen	Blood = NG	Respiratory syncytial virus pneumonia
	126	Male	2 years	7	NA	Positive	Negative	Negative	no specimen	Blood = NG	Respiratory syncytial virus pneumonia, Epilepsy
	048	Female	1 month	3	Negative	Positive	NA	NA	no specimen	no specimen	Viral pneumonia

Abbreviations;NA = No data available, NG = No growth, TS = Tracheal suction, NPA = Nasopharyngeal aspirate, NPS = Nasopharyngeal swab, *Cases yielding good quality DNA and for which sequences were included in the phylogenetic tree.

3.2 ตรวจวินิจฉัย DNA ของเชื้อ HBoV ในสิ่งส่งตรวจทั้ง 4 ชนิด

ในจำนวนผู้ป่วยเด็กทั้งหมด 147 ราย พบผู้ป่วย จำนวน 51 ราย (34.69%) ที่ตรวจพบ DNA ของเชื้อ HBoV1 และมีเพียง 1 รายที่ พบเชื้อ HBoV2 โดยใช้เทคนิค nested-PCR จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นถึงรูปแบบการกระจายตัวของ HBoV1 DNA ในสิ่งส่งตรวจทางคลินิก 4 ชนิด ที่ได้รับจากผู้ป่วยรายเดียวกัน ทั้งหมดจำนวน 51 ราย โดยสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดมีอัตราการตรวจพบเชื้อ HBoV1 ที่แตกต่างกันคือ NPA พบ 37/119 ราย (31.09%) ขณะที่ NPS พบ 38/136 ราย (27.94%) ในเลือดพบ 30/134 ราย (22.39%) และในอุจจาระตรวจพบจำนวน 14.1% ราย (11/78) ทั้งนี้ผู้ป่วย 51 รายที่ให้ผลบวกต่อ HBoV DNA จะมีสิ่งส่งตรวจอย่างน้อย 1 ชนิดจากระบบทางเดินหายใจ คือ NPA และ/หรือ NPS แต่น่าสนใจว่า HBoV1 DNA ตรวจพบในผู้ป่วย 4 รายที่ให้ผลบวกทุกชนิดของสิ่งส่งตรวจ

ผู้ป่วยจำนวน 25 ราย ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ และในตัวอย่างเลือด ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการกระจายตัวของ HBoV1 ที่เกิดขึ้น และ DNA ของ HBoV1 ตรวจพบได้น้อยมากจากอุจจาระ (8/51 ราย) ดังแสดงในตารางที่ 5

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบเชื้อ HBoV1 DNA และข้อมูลลักษณะทางคลินิก

ความสัมพันธ์ระหว่างการพบ HBoV1 DNA จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ และลักษณะอาการที่แสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง แสดงไว้ในตารางที่ 4 ความชุกของเชื้อ HBoV1 พบสูงที่สุดในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปี โดยพบ 42 รายใน 51 ราย อายุเฉลี่ย 15.59 เดือน ทั้งนี้พบว่าอาการแสดง wheezing เป็นอาการที่พบมากที่สุดในการตรวจพบเชื้อ HBoV1 โดยพบ 41 รายใน 52 ราย ราย (88.24%)

นอกจากนี้จากวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องระหว่างการพบเชื้อไวรัส HBoV1 ในเลือดและลักษณะที่แสดงออกทางคลินิกของผู้ป่วย พบว่าอาการ wheezing เป็นอาการที่มีความเกี่ยวข้องต่อการพบเชื้อ HBoV1 ในเลือดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5 แต่ไม่พบความเกี่ยวข้องของเชื้อไวรัสกับอาการที่พบทางการแพทย์หรือลักษณะที่พบอื่นๆ เช่น ลักษณะของภาพถ่ายรังสี อาการท้องเสีย เป็นต้น

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยจำนวน 46 ราย ทั้งที่พบและไม่พบผลบวกของเชื้อ HBoV 1 ในตัวอย่างเลือด

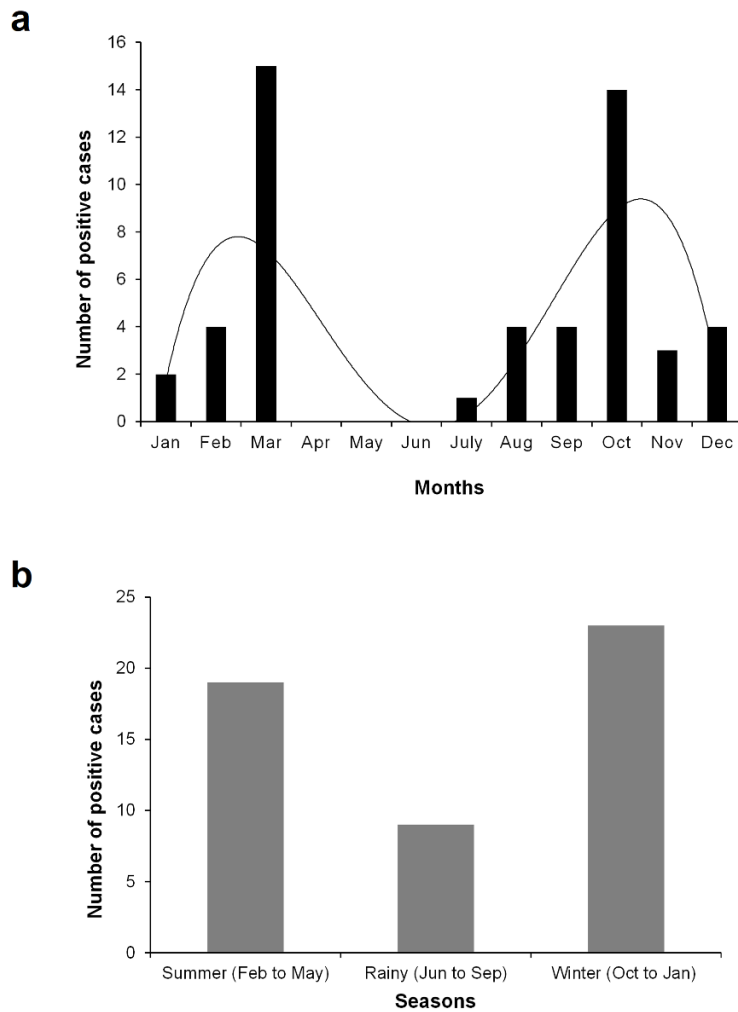
ลักษณะทางคลินิก	HBoV1 DNA-positive cases (n =46)*		
	Positive in blood, n (%)	Negative in blood, n (%)	P value
รวมทั้งหมด	25) 54.35(	21) 45.65(	
อาการแสดงที่พบ			
อาการ wheezing	25) 100(	15) 32.61(	0.004
ท้องเสีย	9) 36(	4) 19.05(	NS
ภาวะระบบทางเดินหายใจล้มเหลว	10) 40(	12) 57.14(	NS
โรคที่พบทางการแพทย์			
Asthma/reactive airwaydisease	16 (64)	12 (57.14)	NS
โรคอื่นๆ	9 (36)	9 (42.86)	NS
ลักษณะภาพถ่ายรังสี			
Alveolarand/or interstitial infiltration	10) 40(	6) 28.57(	NS

หมายเหตุ NS= not significant; HBoV1 = human bocavirus 1

* ไม่มีข้อมูล 5 ราย จาก 51 ราย ดังนั้น ข้อมูลทั้งหมดเพียง 46 รายที่ถูกนำมาวิเคราะห์

3.4 รูปแบบการกระจายตามฤดูของการติดเชื้อ HBoV1

รูปแบบการกระจายตามฤดูกาลของการติดเชื้อไวรัส HBoV1 ในช่วงปี พ.ศ.2557-2558 แสดงไว้ในรูปที่ 2 ซึ่งพบว่าผู้ติดเชื้อเชื้อ HBoV1 พบได้ตลอดทั้งปี แต่มีอัตราติดเชื้อมากที่สุดในเดือนมีนาคม (15/51 ราย) และเดือนตุลาคม (14/51 ราย) นอกจากนี้ฤดูที่มักพบเชื้อมากที่สุดคือ ฤดูหนาว 45.1% เดือนตุลาคม ถึง มกราคม ตามด้วยฤดูร้อน 37.25 % เดือนกุมภาพันธ์ ถึง พฤษภาคม และฤดูฝน 17.65 % เดือนมิถุนายน ถึง กันยายน แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 2 แสดงการกระจายตามฤดูของการติดเชื้อ HBov1 ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2557 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2558 (ภาพ a) แสดงการกระจายตลอดทั้งปีในผู้ป่วยเด็กที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ HBov1 ซึ่งพบสูงที่สุดในเดือนมีนาคม และเดือนตุลาคม ตามลำดับ (ภาพ b) แสดงการกระจายของเชื้อ HBov1 ที่แสดงออกตามฤดู พบว่า ฤดูหนาวพบสูงที่สุด (เดือนตุลาคม ถึงมกราคม) ตามด้วยฤดูร้อน (กุมภาพันธ์ ถึง พฤษภาคม) และฤดูฝน (มิถุนายน ถึง กันยายน) และเส้นทึบที่แสดงหมายถึงแนวโน้ม

3.5 การวิเคราะห์วิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) ในลำดับเบสของเชื้อ HBov1

เพื่อตรวจ genotypes ของยีน VP1 ของเชื้อ HBov1 ในสิ่งส่งตรวจต่างชนิดกันที่ได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน แล้วสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่ได้รับจากสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกของเชื้อ HBov1 (ดังแสดงในรูปที่ 3) พบว่า สิ่งส่งตรวจต่างชนิดกันที่ได้จากผู้ป่วยรายเดียวกัน มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าผู้ป่วยรายอื่น ตัวอย่างผู้ป่วยรายที่ 60 ที่แสดงในภาพ

3 อภิปรายผลการทดลอง

เนื่องการตรวจพบเชื้อ human bocavirus1 (HBoV1) ในสิ่งส่งตรวจต่างๆ ที่แตกต่างกันจากผู้ป่วยรายเดียวกันยังมีข้อมูลจำกัด การศึกษานี้จึงสนใจวิเคราะห์การตรวจพบเชื้อ HBoV1 DNA จากสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกันในผู้ป่วยเด็กรายเดียวกันที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลขอนแก่นและโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ของประเทศไทย พบผู้ป่วยเด็กที่มีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และติดเชื้อ HBoV1 ด้วย มีจำนวน 51 จากผู้ป่วยทั้งหมด 147 รายคิดเป็น 34.69% (ผู้ป่วย 51 รายให้ผลบวกในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ, NPA และ/หรือ NPS) และพบผู้ป่วยจำนวน 25 รายจาก 147 รายคิดเป็น 17.01% ตรวจพบเชื้อ HBoV1 DNA ทั้งในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ และเลือดร่วมกันซึ่งชี้ให้เห็นถึงการกระจายตัวของเชื้อ HBoV1 จากระบบทางเดินหายใจ เข้าสู่เลือด และอาจหมายถึงการติดเชื้อในกระแสเลือดด้วย นอกจากนี้การกระจายของ HBoV1 เกี่ยวข้องกับอาการ wheezing ซึ่งมีแนวโน้มติดเชื้อมากที่สุดในเพศชาย และเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี เชื้อไวรัสสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี แต่มีแนวโน้มสูงที่สุดในฤดูหนาว และฤดูร้อน คิดเป็น 45.1 % และ 37.25% ตามลำดับ

ความชุกของ HBoV1 ในผู้ป่วยเด็กโรคทางเดินหายใจ อยู่ในช่วง 1.5 % ถึง 33 % (1, 5, 18) การศึกษานี้พบอัตราการติดเชื้อ HBoV1 สูงในสิ่งส่งตรวจหลายชนิด ในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างพบ 34.69% ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในประเทศสวีเดน ที่พบ 59% ของผู้ป่วยเด็กโรคทางเดินหายใจ (18) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาอื่นๆ ที่รายงานในอัตราต่ำในช่วง 1.5 ถึง 19 (1, 6) เป็นไปได้ว่าความชุกที่พบแตกต่างกันของการติดเชื้อ HBoV1 อาจจะขึ้นกับลักษณะทางภูมิประเทศที่ต่างกัน ความไวของแต่ละวิธีการทดสอบ หรือจำนวนประชากรที่ศึกษา

การติดเชื้อ HBoV1 มีความชุกสูงในฤดูหนาว และฤดูร้อน แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งความชุกของเชื้อ human bocavirus 1 อาจจะได้รับผลกระทบเล็กน้อยตามฤดูระดับของผลกระทบตามฤดูต่อความชุกของเชื้อไวรัสนี้แตกต่างกันไปตามภูมิศาสตร์ สำหรับการศึกษา Fry et al. ในประเทศไทย รายงานการกระจายของการติดเชื้อ HBoV1 ในเด็กจากปี พ.ศ. 2547 ถึง 2548 พบตลอดทั้งปี แต่การศึกษาไม่ได้แยก genotype ของเชื้อ HBoV1 ที่เกิดขึ้น (19) และการติดเชื้อ HBoV1 ยังมีรายงานอีกในหลายๆ ตัวอย่างตรวจ เช่น สารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ (20) อุจจาระ (21) และตัวอย่างเลือดด้วย (22) แต่ไม่มีศึกษาสิ่งส่งตรวจหลายชนิดจากผู้ป่วยรายเดียวกัน ดังนั้นการศึกษาก่อนหน้านี้ไม่สามารถแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ของการติดเชื้อ HBoV1 ต่อการแพร่กระจายไปทั่วร่างกายมนุษย์ การศึกษานี้เก็บตัวอย่างหลายประเภทจากผู้ป่วยรายเดียวกันเท่าที่จะเป็นไปได้ และตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจพบให้ผลบวกมากที่สุด ตามด้วยเลือด และอุจจาระ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 สำหรับผู้ป่วย 4 ราย ที่พบให้ผลบวกในสิ่งส่งตรวจทุกชนิด นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพียง

3 ราย เนื่องจาก 1 ในจำนวนนี้มีคุณภาพของตัวอย่างไม่ดีพอการตรวจหา viral DNA ในตัวอย่างหลายชนิดจากบุคคลคนเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อ HBoV1 อาจกลายเป็นการติดเชื้อทั้งระบบเช่นเดียวกับเชื้อ bocaviruses ในสัตว์ เช่น เชื้อ bovine parvovirus และ canine minute virus(23)ลำดับเบสเหมือนกันหรือใกล้เคียงกันของ DNA sequences ในหลายตัวอย่างจากผู้ป่วยรายเดียวกัน (ตารางที่ 5 และรูปที่ 3)แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย ดังนั้นลำดับเบสที่เหมือนกันจากตัวอย่างต่างชนิดกันในผู้ป่วยรายเดียวกันมีโอกาส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การศึกษาพบ HBoV1 DNA ในเลือด และอุจจาระ จากผู้ป่วย 5 ราย และ 3 ราย ตามลำดับ ซึ่งให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ อาจเป็นไปได้ว่า HBoV1 อาจจะเริ่มในกระแสเลือดหรือทางเดินอาหาร โดยไม่จำเป็นต้องแพร่กระจายมาจากระบบทางเดินหายใจ

สำหรับอาการทางคลินิกหลักที่พบในการติดเชื้อ HBoV1 คือ อาการwheezing ซึ่งเป็นอาการแสดงที่พบบ่อยในโรคปอด และการศึกษานี้พบว่าการตรวจพบเชื้อ HBoV1 ร่วมกับพบอาการ wheezing ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง จำนวน 88.24 %ซึ่งพบได้เช่นกันจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง(6, 20)และการศึกษานี้พบว่าการ wheezingเกิดในผู้ป่วยทุกราย ที่ตรวจพบเชื้อไวรัสในเลือดด้วย ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งสามารถยืนยันความสำคัญระหว่างการแพร่กระจายของเชื้อและอาการ wheezing symptom ได้อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการติดเชื้อแบบ co-infection HBoV1 ร่วมกับเชื้อโรคอื่นๆ มี 23.53 %ทั้งการศึกษาประเด็นนี้จะเป็พื้นฐานต่อการศึกษาอื่นๆ ในระยะยาว

4 สรุปผลการทดลอง

ศึกษาการกระจายของเชื้อ HBoV1 DNA ในร่างกายโดยทดสอบจากสิ่งส่งตรวจ NPA NPS เลือด และอุจจาระ จากผู้ป่วยเด็กรายเดียวกันที่เข้ารับรักษาตัวในโรงพยาบาล จากการศึกษาพบความชุกของเชื้อสูงในตัวอย่างเลือดและผู้ป่วยทั้งหมดมีอาการ wheezing นอกจากนี้พบ HBoV1 sequences จากสิ่งส่งตรวจต่างชนิดกันที่เก็บจากผู้ป่วยรายเดียวกันมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจแสดงถึงการติดเชื้อHBoV1 สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งระบบ ซึ่งอาจจะแพร่กระจายจากระบบทางเดินหายใจไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย

5 เอกสารอ้างอิง

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(36):12891-6.

2. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *The New England journal of medicine*. 2004;350(6):586-97.
3. Malecki M, Schildgen V, Schildgen O. Human bocavirus: still more questions than answers. *Future virology*. 2011;6(9):1107-14.
4. Schildgen O. Human bocavirus: lessons learned to date. *Pathogens*. 2013;2(1):1-12.
5. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol*. 2008;41(1):29-33.
6. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*. 2007;44(7):904-10.
7. Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(2):217-21.
8. Tabasi M, Mokhtari-Azad T, Eshraghian MR, Shadab A, Shatizadeh S, Shafiei-Jandaghi NZ, et al. Human bocavirus infections among children less than two years old in Iran during fall and winter 2012-2013. *Iran J Microbiol*. 2016;8(1):80-4.
9. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(4):636-7.
10. Peltola V, Soderlund-Venermo M, Jartti T. Human bocavirus infections. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(2):178-9.
11. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, et al. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(9):1403-12.
12. Don M, Soderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Allander T, Korppi M. Don't forget serum in the diagnosis of human bocavirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(7):1031-2; author reply 2-3.
13. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1633-43.
14. Khamrin P, Malasao R, Chaimongkol N, Ukarapol N, Kongsricharoern T, Okitsu S, et al. Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*. 2012;12(3):565-9.
15. Paloniemi M, Lappalainen S, Salminen M, Katka M, Kantola K, Hedman L, et al. Human bocaviruses are commonly found in stools of hospitalized children without causal association to acute gastroenteritis. *Eur J Pediatr*. 2014;173(8):1051-7.

16. Leutenegger CM, Mislin CN, Sigrist B, Ehrenguber MU, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1999;71(3-4):291-305.
17. Abdel-Moneim AS, Kamel MM, Hassan NM. Evolutionary and genetic analysis of human bocavirus genotype-1 strains reveals an evidence of intragenomic recombination. *J Med Microbiol*. 2017;66(2):245-54.
18. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1625-32.
19. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*. 2007;195(7):1038-45.
20. Zhou L, Zheng S, Xiao Q, Ren L, Xie X, Luo J, et al. Single detection of human bocavirus 1 with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children. *BMC Infect Dis*. 2014;14:424.
21. Lasure N, Gopalkrishna V. Molecular epidemiology and clinical severity of Human Bocavirus (HBoV) 1-4 in children with acute gastroenteritis from Pune, Western India. *J Med Virol*. 2017;89(1):17-23.
22. Christensen A, Nordbo SA, Krokstad S, Rognlien AG, Dollner H. Human bocavirus in children: mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol*. 2010;49(3):158-62.
23. Tijssen P. Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta Vet Hung*. 1999;47(3):379-94.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Jantawong C, PrariyachatigulC, Pinlaor P, Teeratakulpisarn J, Srinakarin J, Pakarasang M. Molecular identification reveals a high prevalence of human bocavirus 1 infection in hospitalized pediatric pneumonia patients, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2018; 49:805-819.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการ

- ผลงานนี้ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่และความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อ Human bocavirus ในเด็กได้มากขึ้น
- ผลงานวิจัยนี้ทำให้มีการผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ คือ นางสาวชนากานต์ จันทวงษ์ นักศึกษาระดับปริญญาโท ที่จะสามารถนำองค์ความรู้มาประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในอนาคต
- ผลการศึกษาที่ได้นำมาใช้พัฒนาการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ รูปแบบโปสเตอร์

Jantawong C, Piree K, Jompet P, PrariyachatigulC, Pakarasang M. Reliability of Human bocavirus detection in nasopharyngeal swab specimen from pediatric patients with lower respiratory tract infection. 15th ASEAN Conference of Clinical Laboratory Sciences (ACCLS), Singapore General Hospital, Singapore. June, 21-23, 2015.)Poster presentation(

Appendix

การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

MOLECULAR IDENTIFICATION REVEALS A HIGH PREVALENCE OF HUMAN BOCAVIRUS 1 INFECTION IN HOSPITALIZED PEDIATRIC PNEUMONIA PATIENTS, THAILAND

Chanakan Jantawong¹, Chularut Prariyachatigul², Pornpip Pinlaor²,
Jamaree Teeratakulpisarn³, Jiraporn Srinakarin⁴ and Maitree Pakarasang²

¹Graduate School, Khon Kaen University; ²Center for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences; ³Department of Pediatrics, ⁴Department of Radiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract. Human bocavirus 1 (HBoV1) infection is associated with lower respiratory tract diseases in children. However, clinical significance of HBoV1 dissemination in pediatric patients with pneumonia is unclear. This study investigated the presence of HBoV1 DNA in various sample types in pediatric patients hospitalized with lower respiratory tract infections (LRTI). Nasopharyngeal aspirate, nasopharyngeal swab, blood and feces were collected from 147 pediatric patients with LRTI. HBoV1 DNA, identified by a nested-PCR assay was detected in 35% of respiratory samples and in 17% of both respiratory and blood samples. Eighty-two percent of HBoV1 DNA-positive patients were less than one year of age. HBoV1 prevalence was 37% and 45% in the summer and winter season, especially in March and October, respectively. HBoV1 DNA sequences from different samples taken from the same patient were usually identical, indicating that disseminated infection might have occurred. In conclusion, HBoV1 is able to cause systemic infection that may have disseminated from a respiratory site to the rest of the body.

Keywords: disseminated HBoV1, human bocavirus 1, lower respiratory tract disease, pediatric pneumonia

INTRODUCTION

Lower respiratory tract infections (LRTI), including pneumonia, are the major causes of morbidity and mortality in children below the age of 5 years worldwide (Rudan *et al*, 2008; Benet *et al*,

2017; Wong-Chew *et al*, 2017). Viral infections are the most common cause of LRTI, in particular human bocavirus (HBoV) infection in infants and younger children (Hasan *et al*, 2014).

HBoV was first discovered in 2005 to be a cause of LRTI and is also associated with gastrointestinal disease (Allander *et al*, 2005; Allander, 2008). Furthermore, HBoV has also been reported as a causative agent of pneumonia in infants and young pediatric patients (Longtin *et al*, 2008; Korner *et al*, 2011; Eskola *et al*, 2017). HBoV is a member of family Parvoviridae,

Correspondence: Maitree Pakarasang, Center for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.
Tel/Fax: +66 (0) 43 202086
E-mail: maipak@kku.ac.th

1. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ รูปแบบโปสเตอร์

Jantawong C, Piree K, Jompet P, Prariyachatigul C, Pakarasang M. Reliability of Human bocavirus detection in nasopharyngeal swab specimen from pediatric patients with lower respiratory tract infection. 15th ASEAN Conference of Clinical Laboratory Sciences (ACCLS), Singapore General Hospital, Singapore. June, 21-23, 2015.)Poster presentation(

POSTER

ABSTRACT PP-804

**RELIABILITY OF HUMAN BOCAVIRUS DETECTION
IN NASOPHARYNGEAL SWAB SPECIMEN FROM PEDIATRIC
PATIENTS WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION**

*Chanakan Jantawong¹, Khumyard Piree², Pinrut Jompet³,
Chularut Prariyachatigul⁴, Maitree Pakarasang⁴,*

*¹Department of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Khon Kaen
University,
Thailand*

²Department of Pediatric, Srinagarind Hospital, Thailand

³Department of Pediatric, Khon Kaen Hospital, Thailand

*⁴Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty
of
Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand*

Background:

Human bocavirus (HBoV), a novel identified human parvovirus that associated with respiratory tract disease in pediatric patients. Common specimen used to detect HBoV infection is nasopharyngeal aspirate (NPA) but it was very difficult to collect and high likely to cause inflammation in nasal of patients. Therefore, the other specimen type that reliable and safety to patients is important. Nasopharyngeal swab (NPS) is one of interesting specimen.

Objective:

To study reliability of NPS specimen for HBoV detection.

Methods:

Total of 31 pediatric patients with lower respiratory tract infection were collected both NPA and NPS for detection of HBoV infection by Nested-PCR.

Results:

HBoV-DNA was detected in 4)12.9%(of 31 cases. And all of these were continued to DNA detection in blood samples. All 4 cases were positive by using NPS sample. 2 cases were positive in both NPA and NPS which one case showed HBoV-DNA in blood.

Conclusion:

The result indicates that HBoV can be detected in NPS specimen both viremia and non-viremia cases. The NPS is more safety and easy for pediatric patients.

Keywords: Human bocavirus; Nasopharyngeal swab

Conference Programme



ACCLS 2015



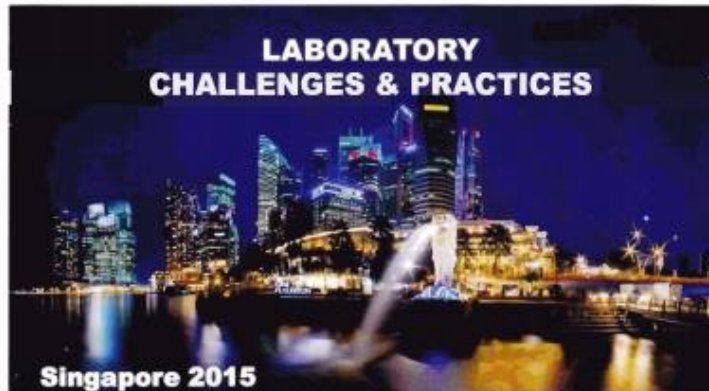
The 15th ASEAN Conference of Clinical Laboratory Sciences

26th Annual Scientific Meeting of SAMLS

21 - 23 June 2015

Auditorium (Level 1), The Academia

College Road, Singapore General Hospital Campus



Singapore 2015

Organised by



Supported by



Sponsors



Under the auspices of



Unicon Collaborative Pte Ltd

RADIOMETER



Reliability of Human bocavirus detection in nasopharyngeal swab specimen from pediatric patients with lower respiratory tract infection



Chanakan Jantawong^{1,4}, Khumyard Piree², Walipan Thitimatepong², Pinrut Jompet³, Nisanat Therapan³, Panuekkaew Kangka³, Wiliwan Vijitpan³, Chularut Prariyachaitigul⁴, Maitree Pakarasang^{4*}

¹Department of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Khon Kaen University, Thailand

²Department of Pediatric, Srinagarind Hospital, Khon Kaen University, Thailand

³Department of Pediatric, Khon Kaen Hospital, Thailand

⁴Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

INTRODUCTION

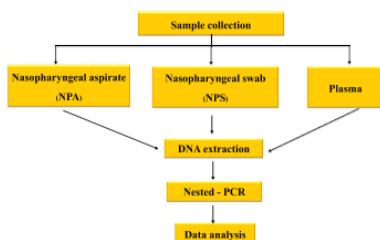
Human bocavirus (HBoV), a novel identified human parvovirus that associated with respiratory tract disease in pediatric patients. Common specimen used to detect HBoV infection is nasopharyngeal aspirate (NPA) but it was very difficult to collect and high likely to cause inflammation in nasal of patients. Therefore, the other specimen type that reliable and safety to patients is important. Nasopharyngeal swab (NPS) is one of interesting specimen.

OBJECTIVE

To study reliability of NPS specimen for HBoV detection.

MATERIALS AND METHODS

Total of 31 pediatric patients with lower respiratory tract infection were collected both NPA, NPS and blood for detection of HBoV infection by Nested-PCR.



RESULTS

HBoV-DNA was detected in 4(12.9%) of 31 cases. And all of these were continued to DNA detection in blood samples. All 4 cases were positive by using NPS sample. 2 cases were positive in both NPA and NPS which one case showed HBoV-DNA in blood.

Table 1: HBoV positive samples by Nested-PCR

Case number	NPA	NPS	Plasma
Case 26	Positive	Positive	Positive
Case 27	Positive	Positive	Negative
Case 47	Negative	Positive	-
Case 48	Negative	Positive	-
Case 50	Positive	Negative	Positive

* Notation: (-) is no sample because pediatric patient came back home.

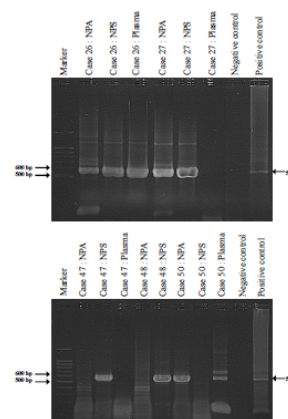


Figure 1: HBoV positive samples by Nested-PCR from pediatric patients with lower respiratory tract infection in Department of Pediatric, Srinagarind Hospital and Khon Kaen Hospital

CONCLUSION

The result indicates that HBoV can be detected in NPS specimen both viremia and non-viremia cases. The NPS is more safety and easy for pediatric patients.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Graduate student grants from Faculty of Graduate School, Khon Kaen University and Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University. We are grateful to staff of Department of Pediatric, Srinagarind Hospital and Khon Kaen Hospital for collect sample.

REFERENCES

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12891-6.
2. Khamrin P, Malasao R, Chaimongkol N, Ukarapol N, Kongsricharoen T, Okitsu S, et al. Circulating of human bocavirus: 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 565-9.
3. Kapoor A, Simmonds P, Sikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis* 2010; 201: 1633-43.