



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ระบาศึกษาและการจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อพาริโซไวรัสในประเทศไทย

โดย

ดร.ทวีศักดิ์ เขียวชาญศิลป์ และคณะ

โครงการสิ้นสุด เดือนพฤษภาคม พ.ศ.2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ระบาดวิทยาและการจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อพาร์โซไวรัสในประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

1. ดร.ทวีศักดิ์ เชื้อชาญศิลป์ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. น.ส.อภิรดี เทียมบุญเลิศ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
4. น.ส.ปรียาพร ชัยวัฒนา ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยา คลินิก
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. นายสุเมธ ก่อทอง ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

เชื้อฮิวแมนพาริโซไวรัส (HPeV) เป็นสมาชิกในวงศ์ *Picornaviridae* ซึ่งเป็นวงศ์ที่มีสมาชิกที่ก่อให้เกิดโรคมากที่สุดในเด็ก ในปัจจุบันมีการจำแนก HPeV ออกเป็นทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วโลก การศึกษานี้เป็นการศึกษาระบาดวิทยา และการจำแนกเชิงโมเลกุล รวมไปถึงการการเกิด recombination ในระดับของสารพันธุกรรมของไวรัส โดยตัวอย่างที่ใช้ศึกษานี้ถูกเก็บจากส่วนต่าง ๆ ของประเทศไทย แบ่งเป็นตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจจำนวน 2,957 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารจำนวน 759 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบ HPeV ในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจเท่ากับ 0.4% และจากตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารเท่ากับ 6.1% ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPeV นั้นส่วนใหญ่มีอายุน้อยกว่า 2 ปี จากการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสพบ HPeV1A, HPeV1B, HPeV2, HPeV3, HPeV4, HPeV5, HPeV6, HPeV10, และ HPeV14 และเมื่อวิเคราะห์การเกิด recombination พบว่าสามารถพบได้ใน 16 ตัวอย่าง จากการศึกษาสรุปได้ว่าสามารถตรวจพบ HPeV ได้ในทั้งตัวอย่างที่ได้จากระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร และจากการศึกษาไวรัสในเชิงโมเลกุลแล้วพบว่า HPeV มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงและมีการเกิด recombination ในระดับของสารพันธุกรรมของไวรัส

Abstract

Human Parechovirus (HPeV), a member of the *Picornaviridae* family, is an infectious agent mostly affecting children. There are 16 recognized genotypes which have globally spread. This study incorporated a total of 2,957 nasopharyngeal (NP) swab and 759 fecal samples that were collected from different parts of Thailand. The NP of HPeV was detected in 0.4% of NP swab and 6.1% of fecal samples. The majority of HPeV infections occur in infants below the age of 2 years, however, an infection was diagnosed in children above the age of 10 years in this study. Various genotypes comprising 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6, 10 and 14 have been characterized. From this study, the recombination event was detected in 16 samples. In conclusion, HPeV can be detected in both the respiratory and GI tract. Moreover, HPeV which circulates in Thailand is highly diverse and subject to recombination.

คำสำคัญ (Keyword)

เชื้อพาริโซไวรัส, ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล, การจำแนกเชิงโมเลกุล, Human Parechovirus, HPeV, molecular epidemiology, molecular characterization, recombination

Executive summary

เชื้ออิวเมนพารีโซไวรัส (Human parechovirus: HPeV) ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* จินัส *Picornavirus* ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่มี envelope ห่อหุ้ม มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายบวก ขนาดประมาณ 7,300 base pairs (bp) มีส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนบริเวณปลายด้าน 5' (5' Un-translated region; 5'UTR) และบริเวณทางด้าน 3' (3'UTR) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการรักษาความคงทนของสายพันธุกรรมของไวรัส และยังเป็นบริเวณที่ ribosome ของเซลล์เจ้าบ้านเข้าเกาะเพื่อเริ่มการถอดรหัสสารพันธุกรรมของไวรัส โดยในการสร้างโปรตีนของไวรัสนั้นจะสร้างจาก Open reading frame (ORF) เพียงหนึ่งเดียว เรียกโปรตีนที่สร้างขึ้นในขั้นต้นว่า Polyprotein จากนั้นจะถูกย่อยด้วยโปรตีนของไวรัสได้เป็นโปรตีนสายสั้น ๆ ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถแบ่งโปรตีนของไวรัสออกได้เป็นสองกลุ่มคือ โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัส (structural protein: VP0, VP3, และ VP1) และ โปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้างของไวรัส (non-structural protein: 2A – 2C, และ 3A-3D) เนื่องจากความรู้และความก้าวหน้าทางชีวโมเลกุล (Molecular Biology) ทำให้ในปัจจุบันสามารถแยกไวรัสออกได้เป็น genotype ต่าง ๆ กันตามความแตกต่างในระดับสารพันธุกรรมของไวรัสได้เป็น 16 genotype และเนื่องจาก HPeV ยังเป็นไวรัสที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบ cell culture หรือในสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงยังไม่หลักฐานที่แน่ชัดว่าไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ แต่จากการศึกษาทางระบาดวิทยาชี้ให้เห็นว่า HPeV มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคทั้งในทางเดินหายใจ (respiratory tract) ทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) หรือแม้แต่ในระบบประสาทส่วนกลาง (central nerve system) ทั้งนี้จากรายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าไวรัสในแต่ละ genotype นั้นดูเหมือนจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่แตกต่างกันอีกด้วย

เนื่องจาก HPeV เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ดังนั้นในขั้นตอนของการจำลองตัวเองของไวรัสจึงทำให้ไวรัสมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมาก (2.2×10^{-3} ถึง 2.8×10^{-3} substitution/site/year) นอกจากนี้ กระบวนการเกิด recombination ซึ่งก็คือการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมของไวรัสยังส่งผลให้ไวรัสยังมีความหลากหลายพันธุกรรมที่มากยิ่งขึ้น ด้วยความรู้ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าความหลากหลายที่เกิดขึ้นนี้มีผลต่อพยาธิสภาพและการก่อโรคของไวรัสอย่างไร จึงจำเป็นต้องศึกษาทั้งทางระบาดวิทยา และการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลของไวรัส เพื่อเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญเพื่อใช้ในการหาทางป้องกันและรักษาโรคที่เกิดไวรัสชนิดนี้ต่อไป ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของ HPeV รวมไปถึงการศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลและการเกิด recombination ใน HPeV

ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างที่เก็บจากระบบทางเดินอาหาร และจากระบบทางเดินหายใจ จำนวน 759 และ 2,957 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจนั้นเก็บมาจากผู้ป่วยที่มีอาการ influenza-like illness ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเมืองชุมแพ อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลทุ่งสง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ วันที่ 14 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552 ถึงวันที่ 9 มีนาคม พ.ศ.2554 ส่วนตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารนั้นเก็บมาจากผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลันซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลอุ้มผาง อ.อุ้มผาง จ.ตาก, โรงพยาบาลเมืองชุมแพ อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จ.กรุงเทพฯ โดยที่เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ วันที่ 7 เดือนมกราคม พ.ศ.2552 ถึงวันที่ 18 เมษายน พ.ศ.2554

หลังจากสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสแล้ว สารพันธุกรรมในส่วน 5'UTR จะถูกเพิ่มจำนวนเพื่อตรวจหาว่าตัวอย่างใดมีเชื้อ HPeV อยู่ เมื่อไวรัสแสดงผลบวกแล้วจะถูกนำไปเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและหาลำดับสารพันธุกรรมในส่วนที่เป็นรอยต่อระหว่าง VP3 และ VP1 (VP3/VP1) เพื่อใช้ในการจำแนก genotype ของไวรัส และเพิ่มจำนวนและหาลำดับสารพันธุกรรมในส่วน 3D เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาการเกิด recombination ของไวรัสต่อไป

ผลการตรวจหาเชื้อ HPeV พบว่าสามารถพบไวรัสได้ทั้งหมด 58 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 1.6 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.4 ในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ และ เป็นตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารจำนวน 46 ตัวอย่างคิดเป็น ร้อยละ 6.1 ของตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารทั้งหมด โดยช่วงอายุที่มีการพบ HPeV คือ 3-6 เดือน และไม่มี ความแตกต่างในการพบในเพศชายและเพศหญิง ซึ่งค่าทางระบาดวิทยานี้มีความใกล้เคียงกับที่มีการ รายงานไว้ทั่วโลก

ในการจำแนก genotype ของไวรัสนั้นพบว่าสามารถแยก genotype ในตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารได้ 8 genotype คือ HPeV1A, HPeV1B, HPeV2, HPeV3, HPeV4, HPeV5, HPeV6, และ HPeV14 ในขณะที่ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจพบเพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ HPeV1A, HPeV1B, HPeV4, HPeV6, และ HPeV10 และประกอบกับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วน 3D พบว่า HPeV ที่แยกจากการศึกษานี้มีการเกิด recombination ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.5 ของตัวอย่างที่แสดงผลบวก HPeV จากข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมทั้งในฐานข้อมูลและจากการศึกษานี้มีอยู่อย่างจำกัด ในส่วนของการศึกษาวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลพบว่า มีเพียง HPeV1B, HPeV3, และ HPeV6 มีข้อมูลเพียงพอสำหรับวิเคราะห์ได้ จากการศึกษาพบว่า HPeV1B นั้นมีค่าอัตราการกลายพันธุ์ เท่ากับ 9.11×10^{-3}

nucleotides/site/year ซึ่งมีค่ามากกว่า HPeV3 ประมาณ 3 เท่า และมากกว่า HPeV6 ประมาณ 2 เท่า ซึ่งค่าที่ได้นี้มีค่าที่มากกว่าที่มีการรายงานไว้ สาเหตุที่มีค่ามากกว่านี้อาจเป็นเพราะเหตุว่า จำนวนสารพันธุกรรมที่มีมากขึ้นจากการศึกษา

แม้ว่า HPeV จะมีการค้นพบมามากกว่า 50 ปี แต่ความรู้เกี่ยวกับไวรัสนี้ยังมีน้อยมาก ไม่ว่าจะเป็นชีววิทยา ระบาดวิทยา วิวัฒนาการ หรือแม้แต่การก่อให้เกิดโรคลังไม่เป็นที่เข้าใจ ดังนั้นการศึกษาทั้งในเชิงกว้าง และเชิงลึกของไวรัสนี้ยังจำเป็นต้องให้ความสำคัญต่อไป และความรู้ที่ได้นี้ยังสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับไวรัสที่อยู่ในกลุ่ม Picornavirus ตัวอื่น ๆ ที่ยังไม่เป็นที่เข้าใจดังเช่น HPeV นี้ได้เช่นเดียวกัน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาระบาดของไวรัสเชิงโมเลกุลของเชื้อพาร์โซไวรัสในประชากรคนไทย
2. ศึกษาการจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อพาร์โซไวรัสที่แยกได้จากประชากรคนไทย
3. ศึกษาการเกิด recombination ของเชื้อพาร์โซไวรัสที่แยกได้จากประชากรคนไทย

สารบัญ

หน้า

บทนำ.....	1
ระเบียบวิธีการวิจัย.....	5
ผลการวิจัย.....	13
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	23
กิตติกรรมประกาศ.....	28
เอกสารอ้างอิง.....	29
ภาคผนวก.....	35

บทนำ

ฮิวแมนพารีโซไวรัส (Human Parechovirus; HPeV) เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* HPeV ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1961 ในการระบาดของอาการท้องเสียเฉียบพลันในเด็กในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งจากลักษณะทางไวรัสวิทยา (virology) การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (serology) และลักษณะอาการทางคลินิก (clinical presentation) ทำให้ในครั้งนั้นไวรัสนี้ถูกตั้งชื่อว่า echovirus 22 และ 23 ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในจีนัส *Enterovirus* (Wigand and Sabin., 1961) แต่ด้วยความรู้และวิธีการทางชีวโมเลกุล (molecular biology) ที่ก้าวหน้าในปัจจุบัน เมื่อศึกษาและวิเคราะห์ลึกลงไปถึงในระดับสารพันธุกรรมของไวรัสแล้วพบว่าไวรัสชนิดนี้มีความแตกต่างทั้งในระดับโครงสร้าง การแบ่งตัว และความสัมพันธ์กับไวรัสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันในขณะนั้นเป็นอย่างมาก ดังนั้น echovirus 22 และ 23 จึงถูกตั้งชื่อใหม่ว่า Human parechovirus 1 และ 2 (HPeV1 และ HPeV2) ตามลำดับ และถูกแยกออกมาในจีนัสใหม่คือ *Parechovirus* (Stanway et al., 1994; Stanway and Hyypai., 1999) โดยมี Ljunganvirus เป็นสมาชิกที่อยู่ในจีนัสเดียวกันและมีความใกล้เคียงมากที่สุดของไวรัสที่อยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* ร่วมกัน

HPeV เป็นไวรัสที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-envelope) มี RNA สายเดี่ยว ที่ทิศทางเป็นสายบวก (positive sense single stranded RNA) เป็นสารพันธุกรรม สารพันธุกรรมของไวรัสนี้มีความยาวประมาณ 7,300 base pair (bp) ซึ่งจะมีส่วนที่ไม่ได้ถูกถอดรหัสไปเป็นโปรตีนอยู่ที่ปลายทั้งสองด้านของสารพันธุกรรมของไวรัส ได้แก่ 5' un-translated region (UTR) และ 3'UTR (Harvala and Simmonds, 2009; Havarla et al., 2010) สารพันธุกรรมทางด้าน 5'UTR นั้นมีความสำคัญต่อการจำลองตัวเองของไวรัสเพราะสามารถสร้างตัวเองเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) นอกจากนี้ยังมีบริเวณสำคัญที่เรียกว่า internal ribosomal entry site (IRES) ซึ่งเป็นบริเวณที่ไรโบโซมจดจำและทำการเกาะกับสารพันธุกรรมของไวรัสเพื่อเริ่มกระบวนการถอดรหัสสารพันธุกรรมให้ได้โปรตีนที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมต่าง ๆ ของไวรัส (Nateri et al., 2000; Nateri et al., 2002). ส่วน 3'UTR นั้นก็สามารถสร้างเป็นโครงสร้างทุติยภูมิที่มีความจำเป็นต่อการจำลองตัวเองของไวรัสเช่นกัน ซึ่งมี poly A ที่เหมือนกับปลายของ mRNA ในเซลล์ยูคาริโอตซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อให้สารพันธุกรรมของไวรัสมีความคงทนมากยิ่งขึ้น (Nateri et al., 2000; Nateri et al., 2002). ไวรัสนี้มี open reading frame (ORF) เพียงหนึ่ง ORF ดังนั้นไวรัสจึงมีการสร้างโปรตีนสายยาวเพียงสายเดียว เป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการจำลองตัวเองของไวรัส การยับยั้งการทำงานของเซลล์เจ้าบ้านไปจนถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ของตัวไวรัสเองเรียกโปรตีนของไวรัสที่สร้างขึ้นมานี้ว่า polyprotein และโปรตีนสายยาวนี้จะถูกตัดออกเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ กันโดยเอนไซม์ของตัวไวรัสเอง ได้เป็นโปรตีนที่มีความแตกต่างกัน 10 ชนิด แบ่งเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัส (Structural protein) 3 ชนิด ได้แก่ VP0, VP3, และ VP1 ซึ่งโปรตีนทั้งสามชนิดนี้จะประกอบเข้าด้วยกันจนกลายเป็นโครงสร้างของไวรัส (virus particle) และโปรตีนอีกชนิดคือ โปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้างของไวรัส (non-

structural protein) ทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, และ 3D (Harvala and Simmonds, 2009; Havarla et al., 2010) ถึงแม้ไวรัสจะมีการค้นพบมากกว่า 50 ปีแล้ว แต่หน้าที่ต่าง ๆ ของโปรตีนของไวรัสยังไม่ถูกค้นพบทั้งหมด ซึ่งหน้าที่และลักษณะของโปรตีนใน HPeV ส่วนใหญ่จะอิงตามไวรัสในกลุ่ม Picornavirus อย่างไรก็ตามโปรตีนบางตัวก็มีการศึกษาจนทราบถึงหน้าที่ของโปรตีนนั้น ๆ ดังเช่นโปรตีน 3C เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญเป็นเอนไซม์ที่จะตัด polyprotein ที่ได้จากการ translation ให้เป็นโปรตีนสายสั้น ๆ ที่ทำหน้าที่ได้ (Schultheiss et al., 1995) ส่วนโปรตีน 3D นั้น ทำหน้าที่เป็น RNA dependent RNA polymerase (RdRp) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส (Samuilova et al., 2006) และ โปรตีน 2C นั้นมีหน้าที่คล้ายกับ ATPase และยังจับกับสารพันธุกรรมของไวรัสอีกด้วย (Samuilova et al., 2006) ในส่วน structural protein ของ HPeV นั้น แตกต่างจากไวรัสในกลุ่ม Picornavirus ตัวอื่น ๆ ตรงที่จะไม่มีการตัดโปรตีน VP0 ไปเป็น VP4 และ VP2 ดังนั้นโครงสร้างของ HPeV จึงประกอบไปด้วยโปรตีนเพียงสามชนิดคือ VP0, VP3 และ VP1 (Harvala and Simmonds, 2009)

จากความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลที่มากขึ้นทำให้สามารถจำแนก HPeV ให้เป็น HPeV1 และ HPeV2 ที่ก่อนหน้านี้เคยถูกจัดให้เป็น echovirus 22 และ 23 ตามลำดับ ซึ่งด้วยความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลที่ใช้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในการจำแนกไวรัส ทำให้สามารถแยก HPeV1 ออกเป็น HPeV1A และ HPeV1B และยังทำให้สามารถจำแนก HPeV สายพันธุ์ใหม่ ๆ ได้อีกมากมาย ได้แก่ HPeV3 แยกได้จากตัวอย่างสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก (nasopharyngeal aspirate; NPA) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอาการติดเชื้อแบบเฉียบพลันในเด็กทารก (Ito et al., 2004), HPeV4 นั้นจำแนกได้จากตัวอย่างอุจจาระซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดไข้ในทารก (Benschop et al., 2006a), HPeV5 เป็นไวรัสที่ถูกจำแนกใหม่โดยอิงข้อมูลทางลำดับสารพันธุกรรมของไวรัส ซึ่งไวรัสสายพันธุ์นี้เคยถูกจัดให้เป็น HPeV2 โดยอาศัยการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แต่จากการศึกษาความสัมพันธ์ทาง phylogenetic tree ที่อิงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไวรัสแล้วพบว่าสามารถแยกไวรัสนี้เป็นสายพันธุ์ใหม่ (Oberste et al., 1998), HPeV6 จำแนกได้จากเด็กที่ป่วยด้วยโรค Reye's syndrome (Watanabe et al., 2007), HPeV7 สามารถจำแนกได้จากวิธี metagenomic ในตัวอย่างอุจจาระจากเด็กปกติไม่มีอาการของโรคใด ๆ (Li et al., 2009), HPeV8 จำแนกได้จากตัวอย่างอุจจาระของเด็กที่อาการท้องเสียเฉียบพลันในบริเวณที่มีการระบาดของโรคท้องเสียในประเทศบราซิล (Drexler et al., 2009) และ HPeV9-HPeV16 นั้นยังไม่มีรายงานออกมาอย่างเป็นทางการในเอกสารทางวิชาการ แต่มีมีรายงานที่สามารถจำแนกไวรัสสายพันธุ์ HPeV9-HPeV16

ได้ในเว็บไซต์ของ

Picornastudygroup.com

(<http://www.picornastudygroup.com/types/parechovirus/hpev.html>)

นับตั้งแต่การค้นพบ HPeV มาจนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาระบาดวิทยาของไวรัสมาอย่างต่อเนื่อง สายพันธุ์ของไวรัสที่พบมากที่สุดทั่วโลกคือ HPeV 1B และ HPeV3 ในขณะที่ HPeV1A, HPeV2, HPeV4-6 มีการรายงานว่าพบไม่มากนักเมื่อเทียบกับสองสายพันธุ์แรก (Benschop et al., 2008b; Tapia et al., 2008; Ito et al., 2010; Pham et al., 2010) อย่างไรก็ตาม HPeV7-HPeV16 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่เพิ่งค้นพบใหม่ ดังนั้นระบาดวิทยาที่แท้จริงของสายพันธุ์เหล่านี้ยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างจริงจังและมีข้อมูลที่จำกัดเป็นอย่างมาก จากการรายงานพบว่า HPeV นั้นโดยมากจะพบได้ในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 3 ขวบ (Verboon-Macielek et al., 2005; Benschop et al., 2006b; Tauriainen et al., 2007) ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นว่า HPeV1B และ HPeV3 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดทั่วโลก ดังนั้นข้อมูลระบาดวิทยาโดยมากจึงเป็นข้อมูลของไวรัสสองสายพันธุ์นี้ เช่นในการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ.1983 จนถึงปี ค.ศ.2005 พบว่า HPeV1 จำนวน 3% และ HPeV3 จำนวน 68% นั้นจำแนกได้จากเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 1 ขวบ (Khetsuriani et al., 2006) หรือการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์ที่พบว่าเด็กที่ติดเชื้อ HPeV1 และ HPeV3 นั้นส่วนใหญ่มีอายุน้อยกว่า 3 ปี (Benschop et al., 2006b)

ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อ HPeV นั้นยังไม่มีการศึกษาที่ยืนยันแน่ชัดว่าจะมีลักษณะอาการอย่างไร เพราะยังไม่มีระบบเพาะเชื้อ และสัตว์ทดลองที่เหมาะสม แต่จากข้อมูลระบาดวิทยาพบว่าเชื้อ HPeV นี้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร ซึ่งอาการที่แสดงนั้นไม่รุนแรงนัก (Harvala et al., 2008; Zhang et al., 2010; Zhong et al., 2011) จากการศึกษาของ Boivin et al. (2005) และ Harvala and Simmonds (2009) พบว่า HPeV3 นั้นมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดมากกับอาการติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) ในเด็ก นอกจากนี้มีรายงานว่าพบกลุ่มอาการที่เกิดขึ้นไม่บ่อยแต่ดูเหมือนจะเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ HPeV ดังเช่นอาการสมองอักเสบ (Encephalitis)(Abed and Boivin, 2006), กล้ามเนื้ออักเสบ (myositis) (Schnurr et al., 1996), กล้ามเนื้ออ่อนแรงเฉียบพลันในเด็ก (acute flaccid paralysis; AFP) (Ito et al., 2004), และ Reye's syndrome (Al-Sunaidi et al., 2007; Watanabe et al., 2007)

HPeV ก็เป็นดังเช่นไวรัสในกลุ่ม Picornavirus ทั่วไปที่จะมีการเปลี่ยนแปลงในลำดับสารพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการทำงานของ RdRp ที่ไม่มีความสามารถในการตรวจทานการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรม ดังนั้นเมื่อไวรัสเกิดกระบวนการจำลองตัวจึงทำให้ไวรัสมีอัตราการเปลี่ยนแปลงลำดับสารพันธุกรรมที่สูง โดยมีการรายงานถึงอัตราการกลายพันธุ์ (substitution rate) อยู่ที่ 2.2×10^{-3} ถึง 2.8×10^{-3} substitution/site/year (Faria et al., 2009) เป็นผลทำให้ HPeV เป็นไวรัสที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเกิด recombination ในสายของสารพันธุกรรมของไวรัสทำให้ไวรัสยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น ซึ่งจุดที่เกิดการ recombination นั้นพบที่บริเวณรอยต่อระหว่าง VP1 และ 2A (P1 และ P2) และบริเวณรอยต่อระหว่าง

5'UTR และ VP0 (P1) (Benschop et al., 2008a; Benschop et al., 2010; Drexler et al., 2011; Williams et al., 2009; Zoll et al., 2009) การศึกษาเพิ่มเติมโดยการสร้าง phylogenetic tree ของ structural protein อย่าง VP1/VP3 และ non-structural protein อย่าง 3D แสดงให้เห็นถึงการเกิด recombination เช่นเดียวกัน (Calvert et al., 2010) อย่างไรก็ตามการเกิด recombination นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามีผลอย่างไรกับ เซลล์เจ้าบ้าน และกับทั้งตัวไวรัสเอง

ดังที่กล่าวมาในข้างต้น HPeV นั้นถึงแม้จะไม่ก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรงในมนุษย์ แต่ก็ยังเป็นไวรัสที่มีความสำคัญมากโดยเฉพาะในเด็ก และจะเห็นว่าแม้ HPeV จะมีการค้นพบมานานแล้ว แต่ความรู้เกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้ยังเป็นปริศนาอยู่มาก ยิ่งข้อมูลที่เป็นของประชากรไทยด้วยแล้วยิ่งมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ก็เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของ HPeV ที่แยกได้จากประชากรคนไทย รวมไปถึงการจำแนกเชิงโมเลกุลของไวรัส และวิเคราะห์หาการเกิด recombination ของไวรัสชนิดนี้ ซึ่งผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าความรู้ที่ได้จากศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ทั้งเป็นความรู้พื้นฐาน และประยุกต์เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

1.1. ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ

ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจนี้เก็บจากผู้ป่วยที่มีอาการ influenza-like illness โดยเก็บสำลีป้ายโพรงหลังจมูก (Nasopharyngeal; NP, swab) ซึ่งเริ่มเก็บตั้งแต่วันที่ 14 กรกฎาคม พ.ศ.2552 ถึง วันที่ 9 มีนาคม พ.ศ.2554 จำนวนทั้งหมด 2,957 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดนั้นเก็บจากโรงพยาบาลสองแห่งคือ โรงพยาบาลชุมแพ อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น จำนวน 1,703 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลทุ่งสง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช จำนวน 1,254 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เก็บมานั้นจะถูกเก็บไว้ในสารละลายนำส่ง (transport media) ซึ่งประกอบด้วย Phosphate buffered saline (PBS) ที่มียาปฏิชีวนะ (Penicillin G เข็มขึ้น 2×10^{-6} U/I และ streptomycin เข็มขึ้น 200 mg/l) ตัวอย่างจะถูกจัดการในทันทีที่ได้รับตัวอย่าง และ เก็บที่อุณหภูมิ -70°C ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนกว่าจะถูกนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2. ตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหาร

ตัวอย่างอุจจาระเป็นตัวอย่างที่ส่งมาที่ศูนย์ เพื่อตรวจ human rotavirus ในการตรวจประจำ (routine screening) โดยตัวอย่างที่เก็บได้นั้นมีจำนวนทั้งหมด 759 ตัวอย่าง เก็บตั้งแต่วันที่ 7 มกราคม พ.ศ.2552 ถึง วันที่ 18 เมษายน พ.ศ.2554 ซึ่งตัวอย่างนั้นถูกส่งหรือเก็บมาจากโรงพยาบาลต่าง ๆ ดังนี้คือ โรงพยาบาลอุ้มผาง อำเภออุ้มผาง จ.ตาก จำนวน 12 ตัวอย่าง โรงพยาบาลชุมแพ อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น จำนวน 597 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพฯ จำนวน 150 ตัวอย่าง เมื่อได้รับตัวอย่าง อุจจาระจะถูกละลายใน PBS ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเขย่าอย่างแรง (vortex) และปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 rpm จากนั้นจะเก็บส่วนใสด้านบนที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส การสร้าง cDNA และการตรวจหา HPeV

2.1. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส

นำสารละลายตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจำนวน 200 ul มาสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี GTC-phenol-chloroform และใช้น้ำสะอาดในการละลายสารพันธุกรรมของไวรัสซึ่งก็คือ RNA ให้ได้ปริมาตร 30 ul และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะใช้ในขั้นตอนต่อไป เพื่อยืนยันการสกัดสารพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพ การตรวจหา house-keeping

gene ที่มีการแสดงออกในเซลล์ปกติ ได้แก่ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) ถูกนำมาใช้ในการศึกษา

2.2. การสร้าง cDNA

เนื่องจากสารพันธุกรรมของ HPeV เป็น RNA ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนสารพันธุกรรมของไวรัสให้เป็น cDNA ด้วยวิธีการ Reverse Transcription (RT) ซึ่งวิธีการที่ใช้นั้นตามที่กล่าวไว้ในคู่มือการใช้งานของ ImProm-II™ Reverse Transcription system (Promega, Madison, WI) และ cDNA ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.3. การตรวจหา HPeV

ในการตรวจหา HPeV นั้นใช้วิธี Nested-PCR ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วน 5'UTR โดยปรับปรุงวิธีการที่ได้นำเสนอโดย Harvala et al. (2010) ซึ่ง primer ที่ใช้นั้นดังแสดงในตารางที่ 1 และสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR นั้นดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส

ชื่อ Primer	ตำแหน่ง (อ้างอิงตาม L02971)	บริเวณที่ เพิ่มจำนวน	ลำดับสารพันธุกรรมของ primer (5'-3')	รอบของ PCR	ขนาดผลผลิต ของ PCR (bp)
HPeV-5'UTR-OS	253-276	5'UTR	GGGTGGCAGATGGCGTGCCATAA	PCR รอบแรก	355
HPeV-5'UTR-OAS	607-583	5'UTR	CCTRCGGGTACCTTCTGGGCATCC		
HPeV-5'UTR-IS	313-335	5'UTR	YCACACAGCCATCCTCTAGTAAG	PCR รอบที่สอง	267
HPeV-5'UTR-IAS	579-556	5'UTR	GTGGGCCCTTACAAC TAGTGTG		
HPeV-VP3/VP1-OS	2090-2115	VP3/VP1	GAYAATGCYATMAYACWATYTGTA	PCR รอบแรก	458
HPeV- VP3/VP1-OAS	2547-2523	VP3/VP1	ACWGTRAARATRTCHACATSATDG		
HPeV- VP3/VP1-IS	2159-2182	VP3/VP1	TTYTCMACHTGGATGMGGAARAC	PCR รอบที่สอง	320
HPeV- VP3/VP1-IAS	2479-2458	VP3/VP1	DGGYCCATCATCYTGWGCTGA		
HPeV-3D-OS	6422-6446	3D	GTNTAYARGATGATHATGATGGARA	PCR รอบแรก	854
HPeV- 3D -OAS	7275-7253	3D	YTTARTCAACACCATGGGCAYYA		
HPeV- 3D -IS	6512-6534	3D	GAYTGGCACTTYATGATYAAYGC	PCR รอบที่สอง	732
HPeV- VP3/VP1-IAS	7243-7221	3D	ATNACMACWTCATAATCATCCAC		

อุณหภูมิที่ใช้ในทั้ง PCR รอบที่หนึ่งและ PCR รอบที่สองนั้นใช้ลักษณะอุณหภูมิที่เหมือนกันดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นผลผลิตของ PCR ในรอบที่สองไปวิ่งใน 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromine และดูผลภายใต้แสงรังสีเหนือม่วง (ultraviolet; UV) ซึ่งถ้าหากตัวอย่างที่มี HPeV อยู่จะแสดงผลบวกตามขนาดของผลผลิตของ PCR ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 ตารางแสดงสารเคมีที่ใช้ในการตรวจหา HPeV

สารเคมี	PCR รอบที่หนึ่ง (ul)	PCR รอบที่สอง (ul)
PerfectTaq Plus MasterMix เข้มข้น 2.5X (5 PRIME, Darmstadt, Germany)	15	15
HPeV-5'UTR-OS เข้มข้น 10mM	0.5	-
HPeV-5'UTR-OAS เข้มข้น 10mM	0.5	-
HPeV-5'UTR-IS เข้มข้น 10mM	-	0.5
HPeV-5'UTR-IAS เข้มข้น 10mM	-	0.5
cDNA	2	-
ผลผลิตจาก PCR รอบที่หนึ่ง	-	1
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	7	6
ปริมาตรรวม	25	25

ตารางที่ 3 อุณหภูมิในการทำ PCR ในส่วน 5'UTR

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1	Pre-heat	94°C	3 นาที	1 รอบ
2	Denature	94°C	18 วินาที	40 รอบ
	Annealing	50°C	21 วินาที	
	Extension	72°C	1.30 นาที	
3	Final extension	72°C	10 นาที	1 รอบ
4	Cooling down	25°C	5 นาที	1 รอบ

3. การเพิ่มจำนวนและกาลำดับสารพันธุกรรมในส่วน VP3/VP1 และ 3D ของ HPeV

3.1. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน VP3/VP1

เพื่อการจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อ HPeV นั้นจะใช้ลำดับสารพันธุกรรมในส่วนที่เป็นช่วงรอยต่อระหว่าง VP3 และ VP1 ซึ่งในรายงานนี้จะแทนด้วย VP3/VP1 ซึ่งวิธีการนั้นจะดัดแปลงจากการศึกษาของ Harvala et al. (2010) โดยใช้วิธี One-step nested RT-PCR ซึ่ง primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมนั้นดังที่แสดงในตารางที่ (บริเวณ VP3/VP1) และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมนั้นดังแสดงในตารางที่ 4 โดยที่ PCR รอบแรกนั้นจะใช้ SuperScrip™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Paisley, UK) ในขณะที่ PCR รอบที่สองนั้นใช้ PerfectTaq Plus MasterMix (5 PRIME, Darmstadt, Germany) อุณหภูมิที่ใช้การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทั้งสองรอบนั้นดังแสดงในตารางที่ 5 จากนั้นผลผลิตของ PCR ในรอบที่สองไปวิ่งใน 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromine และดูผลภายใต้แสง UV ซึ่งถ้าหากตัวอย่างที่มี HPeV อยู่จะแสดงผลบวกตามขนาดของผลผลิตของ PCR ดังแสดงในตารางที่ 1

3.2. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน 3D ของ HPeV

เพื่อวิเคราะห์การเกิดการ recombination นั้นดังที่ Calvert et al (2010) ได้รายงานไว้ว่า การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมในส่วน 3D ควบคู่ไปกับ VP3/VP1 นั้นสามารถบ่งบอกถึงการเกิด recombination ได้ ดังนั้นจึงได้ดัดแปลงวิธีที่ Calvert et al. (2010) ได้นำเสนอไว้ดังนี้คือ วิธีการที่ใช้เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมก็เป็นดังเช่นในการเพิ่มจำนวนในส่วน VP3/VP1 คือ one-step nested RT-PCR ซึ่ง primer ที่ใช้ใน PCR ทั้งสองรอบดังแสดงในตารางที่ 1 (บริเวณ 3D) และสารเคมีที่ใช้นั้นเหมือนกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนในส่วน VP3/VP1 เพียงแต่เปลี่ยน primer ที่ใช้เป็น HPeV-3D-OS และ HPeV-3D-OAS ใน PCR แรก และใช้ HPeV-3D-IS และ HPeV-3D-IAS ใน PCR ที่สอง ส่วนอุณหภูมินั้นดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นผลผลิตของ PCR ในรอบที่สองไปวิ่งใน 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromine และดูผลภายใต้แสง UV ซึ่งถ้าหากตัวอย่างที่มี HPeV อยู่จะแสดงผลบวกตามขนาดของผลผลิตของ PCR ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 4 ตารางแสดงสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HPeV ในส่วน VP3/VP1

สารเคมี	PCR รอบที่หนึ่ง (ul)	PCR รอบที่สอง (ul)
Reaction Mix ของ SuperScrip™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Paisley, UK) (โดยที่มี dNTP 0.4 mM และ MgSO ₄ 6mM)	10	
MgSO ₄ เข้มข้น 50 mM	0.5	
Primer HPeV-VP3/VP1-OS เข้มข้น 10mM	1	
Primer HPeV-VP3/VP1-OS เข้มข้น 10mM	1	
Super Script™ III RT/Platinum® Taq Mix	0.8	
RNA	6	
DepC	0.7	
PerfectTaq Plus MasterMix เข้มข้น 2.5X		15
Primer HPeV-VP3/VP1-OS เข้มข้น 10mM		1
Primer HPeV-VP3/VP1-OS เข้มข้น 10mM		1
ผลผลิตจาก PCR รอบที่หนึ่ง		2
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ		6
ปริมาตรรวม	20	25

ตารางที่ 5 อุณหภูมิในการทำ PCR ในส่วน VP3/VP1

PCR	ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
รอบแรก	1	RT	42°C	1 ชั่วโมง	1 รอบ
	2	Inactivate RT and Pre-heat <i>Taq</i>	95°C	3 นาที	1 รอบ
	3	Denature	94°C	30 วินาที	40 รอบ
		Annealing	45°C	30 วินาที	
		Extension	68°C	1.30 นาที	
	4	Final extension	68°C	10 นาที	1 รอบ
	5	Cooling down	25°C	5 นาที	1 รอบ
รอบที่สอง	1	Pre-heat	94°C	3 นาที	1 รอบ
	2	Denature	94°C	30 วินาที	40 รอบ
		Annealing	50°C	30 วินาที	
		Extension	72°C	1.30 นาที	
	3	Final extension	72°C	10 นาที	1 รอบ
	4	Cooling down	25°C	5 นาที	1 รอบ

3.3. การหาลำดับสารพันธุกรรมในส่วน VP3/VP1 และ 3D

เมื่อได้ผลผลิตจากการทำ PCR และทำการวิ่งบน 2% agarose gel electrophoresis แล้วก็ทำการตัดผลผลิตที่อยู่ใน gel ที่มีขนาดตามที่คาดการณ์ไว้ มาทำการทำให้บริสุทธิ์ (purify) ด้วย Agarose Gelextract Mini Kit (5 PRIME, Darmstadt, Germany) จากนั้นนำส่งเมเพื่อหาลำดับสารพันธุกรรมที่ 1st BASE DNA Sequencing Services (1st BASE Laboratories, Malaysia) ผลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ขั้นต้นด้วย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), โปรแกรม Simmonics version 1.7 (www.virus-evolution.org), และ Chromas Lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), and BioEdit version 7.0.4.1 (Hall., 1999).

ตารางที่ 6 อุณหภูมิในการทำ PCR ในส่วน 3D

PCR	ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
รอบแรก	1	RT	42°C	1 ชั่วโมง	1 รอบ
	2	RT	50°C	1 นาที	20 รอบ
			53°C	1 นาที	
	3	Inactivate RT and Pre-heat <i>Taq</i>	95°C	3 นาที	1 รอบ
	4	Denature	94°C	30 วินาที	40 รอบ
		Annealing	50°C	30 วินาที	
		Extension	68°C	1.30 นาที	
	5	Final extension	68°C	10 นาที	1 รอบ
	6	Cooling down	25°C	5 นาที	1 รอบ
รอบที่ สอง	1	Pre-heat	94°C	3 นาที	1 รอบ
	2	Denature	94°C	30 วินาที	40 รอบ
		Annealing	50°C	30 วินาที	
		Extension	72°C	1.30 นาที	
	3	Final extension	72°C	10 นาที	1 รอบ
	4	Cooling down	25°C	5 นาที	1 รอบ

4. การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลและวิวัฒนาการ

ลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้ถูกนำไปฝากไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank และลำดับสารพันธุกรรมอ้างอิงนั้นได้จากฐานข้อมูล GenBank เช่นเดียวกัน (ภาคผนวก) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ การจำแนกเชิงชีวโมเลกุล และการตรวจสอบการเกิด recombination นั้นวิเคราะห์โดยการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรม MEGA 4 (Tamura et al., 2007) ซึ่งจะใช้วิธี neighbour-joining ด้วย bootstrap 1000 ในการสร้าง trees ใช้โมเดล maximum-composite-likelihood (MCL) และใช้การจัดการกับช่องว่างแบบ pairwise deletion as gap/missing data ส่วนค่าทางวิวัฒนาการ ดังเช่นค่า nucleotide substitution rate และ most recently common ancestor (MRCA) ใช้โปรแกรม Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST) version 1.6 (Drummond and Rabaut., 2007) ในการคำนวณ โดยในการคำนวณนั้นจะใช้ The relaxed clock-

uncorrelated exponential ด้วย 10 million chain was โดยใช้ GTR with gamma distribution substitution เป็นโมเดล และข้อมูลที่คำนวณด้วย BEAST จะทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรม TACER (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tacer>)

5. การพิจารณาทางด้านจริยธรรม

ตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดนั้นเป็นตัวอย่างที่ส่งมาเพื่อตรวจไวรัสที่เป็นงานประจำของศูนย์ฯ ซึ่งจะไม่มีการสัมผัสผู้ป่วยโดยตรง รวมไปถึงไม่มีการเข้าถึงหรือเปิดเผยข้อมูลส่วนตัวของผู้ป่วยยกเว้น เพศ อายุ และวันที่เก็บตัวอย่างเท่านั้น และตัวอย่างที่นำมาใช้นั้นได้รับการอนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เพื่อใช้ในการวิจัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว นอกจากนี้ระเบียบวิธีวิจัยในงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (เลขที่พิจารณาจริยธรรม IRB No.086/53)

ผลการวิจัย

1. ระบาดวิทยาของเชื้อ HPeV

จากตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจและจากระบบทางเดินอาหารทั้งหมด 3,716 ตัวอย่าง นั้น เก็บจากผู้ป่วยที่มีอาการ influenza-like illness และ ท้องเสียเฉียบพลันตามลำดับ ซึ่งแบ่งออกเป็น เพศชาย 1,833 ราย เพศหญิง 1,868 ราย และข้อมูลของเพศขาดหายไป 15 ราย โดยที่ตัวอย่างทั้งหมด นั้นเก็บในช่วงปี พ.ศ.2552 ถึง พ.ศ. 2554 ในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจทั้งหมด 2,957 ตัวอย่าง นั้นเก็บจากผู้ป่วย 2,822 ราย มีช่วงอายุตั้งแต่ 1 วัน จนถึง 90 ปี ส่วนตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 759 ตัวอย่างนั้นเก็บจากผู้ป่วยทั้งหมด 715 ราย ตั้งแต่อายุ 1 วัน จนถึง 24 ปี

ในตัวอย่างทั้งหมดนั้นได้รับการตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) และ เชื้ออิวแมนโรตาไวรัส (human rotavirus) ในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ และทางเดินอาหารตามลำดับ โดยวิธีที่ใช้ตรวจนั้นใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นภายในศูนย์ฯ คือ one-step real-time RT-PCR โดยใช้ TaqMan probe (Suwannakarn et al., 2008) ในการตรวจเชื้อไข้หวัดใหญ่ และใช้วิธี one-step RT-PCR (Theamboonlers et al., 2002) ในการตรวจหาเชื้ออิวแมนโรตาไวรัส ในทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาสามารถตรวจพบ house-keeping gene ได้ ดังนั้นการสกัด RNA จึงประสบความสำเร็จในทุกตัวอย่าง ผลจากการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจพบว่า 25 ตัวอย่างแสดงผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดบี (influenza B virus) คิดเป็น 0.9%, 343 แสดงผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H1N1 2009 (influenza A virus subtype H1N1 2009) คิดเป็น 11.6% ,115 ตัวอย่าง แสดงผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธุ์ H3N2 (influenza A virus subtype H3) คิดเป็น 3.9%, 32 ตัวอย่าง แสดงผลบวกต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่ไม่ทราบสายพันธุ์ คิดเป็น 1.1% ในขณะที่ในตัวอย่างอุจจาระนั้นแสดงผลบวกต่อ อิวแมนโรตาไวรัสเท่ากับ 348 ตัวอย่างคิดเป็น 45.9%

ในการตรวจหาเชื้อ HPeV ได้ใช้วิธีการที่มีความจำเพาะและมีความไวที่สูงคือ Nested RT-PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อส่วน 5'UTR ของไวรัสซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสได้ทุกสายพันธุ์ (Harvala et al., 2008) ผลการตรวจพบว่าสามารถตรวจพบ HPeV ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.6% ซึ่งแบ่งเป็นตัวอย่างอุจจาระ 46 ตัวอย่าง (คิดเป็น 6.1% ของตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้ทั้งหมด) และจากตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ 12 ตัวอย่าง (คิดเป็น 0.4% ของตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจทั้งหมด) ข้อมูลของตัวอย่างทั้ง 58 ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 7 การติดเชื้อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศหญิงและเพศชาย (ตารางที่ 7) ในตัวอย่างอุจจาระที่แสดงผลบวก HPeV ทั้งหมด 16 ตัวอย่างนั้นพบว่าติดเชื้อ อิวแมนโรตาไวรัสด้วยคิดเป็น 34.8% ในขณะที่มีหนึ่งตัวอย่าง

จากระบบทางเดินหายใจที่แสดงที่แสดงผลบวกและติดเชื้อร่วมกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอสายพันธุ์ H3 คิดเป็น 8.33% (ตารางที่7) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPeV นั้นที่พบจากการวิจัยนี้นั้นได้แก่ตั้งแต่อายุ 2 เดือน จนถึง 49 ปี (ตารางที่7) ช่วงอายุที่มีการติดเชื้อ HPeV มากที่สุดอยู่ระหว่างอายุ 3 ถึง 6 เดือน (รูปที่ 1A)

ตารางที่ 7 สรุปข้อมูลของตัวอย่างที่แสดงผลบวก HPeV

ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	อายุ	เพศ	ไวรัสอื่น ๆ	สายพันธุ์ ของ HPeV	3D clade
CU-B402	อุจจาระ	6 เดือน	หญิง	Negative	1B	J
CU-B408	อุจจาระ	3 เดือน	ชาย	Positive Rota	1B	J
CU-B433	อุจจาระ	1 ปี	หญิง	Negative	1B	BA
CU-B463	อุจจาระ	5 เดือน	ชาย	Positive Rota	1B	Z
CU-B478	อุจจาระ	6 เดือน	หญิง	Negative	1B	O’*
CU-B486	อุจจาระ	11 เดือน	หญิง	Negative	5	BA
CU-B500	อุจจาระ	12 ปี	ชาย	Negative	1B	O’*
CU-B579	อุจจาระ	2 เดือน	หญิง	Positive Rota	1B	J
CU-B580	อุจจาระ	9 เดือน	หญิง	Negative	1B	J
CU-B587	อุจจาระ	11 เดือน	ชาย	Negative	1B	J
CU-B588	อุจจาระ	3 เดือน	หญิง	Negative	1B	J
CU-B595	อุจจาระ	10 เดือน	หญิง	Negative	1B	J
CU-B596	อุจจาระ	11 เดือน	ชาย	Negative	1B	J
CU-B606	อุจจาระ	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	Positive Rota	5	AE’*
CU-B615	อุจจาระ	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	Positive Rota	1B	AE’*
CU-B628	อุจจาระ	1 ปี	หญิง	Negative	1B	BA
CU-B636	อุจจาระ	1 ปี	ชาย	Negative	1B	O’*
CU-B685	อุจจาระ	1 ปี	หญิง	Negative	3	W
CU-B688	อุจจาระ	3 เดือน	ชาย	Negative	1B	BA
CU-B705	อุจจาระ	6 เดือน	ชาย	Negative	4	Y
CU-B711	อุจจาระ	1 ปี	ชาย	Positive Rota	1A	K’*
CU-B806	อุจจาระ	10 เดือน	หญิง	Negative	1B	BA
CU-B811	อุจจาระ	7 เดือน	ชาย	Positive Rota	1B	J
CU-B812	อุจจาระ	11 เดือน	ชาย	Positive Rota	6	BD
CU-B825	อุจจาระ	6 เดือน	หญิง	Positive Rota	1A	BA
CU-B846	อุจจาระ	1ปี	ชาย	Negative	1B	W
CU-B847	อุจจาระ	1 ปี	หญิง	Negative	2	BC’*

CU-B850	อุจาระ	5 เดือน	ชาย	Negative	2	BC’*
CU-B851	อุจาระ	6 เดือน	ชาย	Negative	1B	BA
CU-B852	อุจาระ	5 เดือน	ชาย	Negative	2	BC’*
CU-B865	อุจาระ	5 เดือน	ชาย	Negative	2	BC’*
CU-B867	อุจาระ	1 ปี	หญิง	Negative	2	BC’*
CU-B868	อุจาระ	9 เดือน	ชาย	Negative	1B	J
CU-B869	อุจาระ	10 เดือน	ชาย	Negative	6	BD
CU-B874	อุจาระ	1 ปี	หญิง	Negative	6	BD
CU-B903	อุจาระ	6 เดือน	ชาย	Negative	1B	G’*
CU-B961	อุจาระ	6 เดือน	ชาย	Positive Rota	14	BD
CU-B984	อุจาระ	1 ปี	ชาย	Negative	6	AB’*
CU-B1002	อุจาระ	1 ปี	ชาย	Positive Rota	1B	BA
CU-B1009	อุจาระ	10 เดือน	หญิง	Positive Rota	6	BD
CU-B1046	อุจาระ	1 ปี	ชาย	Positive Rota	6	BD
CU-B1050	อุจาระ	1 ปี	ชาย	Positive Rota	6	BD
CU-B1055	อุจาระ	9 เดือน	ชาย	Positive Rota	6	BD
CU-B1064	อุจาระ	10 เดือน	ชาย	Positive Rota	6	BD
CU-B1091	อุจาระ	8 เดือน	ชาย	Negative	14	AB’*
CU-B1154	อุจาระ	16 ปี	หญิง	Negative	1B	J
CU-H403	จากทางเดินหายใจ	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	หญิง	Negative	1B	O’*
CU-H2107	จากทางเดินหายใจ	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	หญิง	Positive H3	1A	AN
CU-H2108	จากทางเดินหายใจ	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	ชาย	Negative	4	AN
CU-H2159	จากทางเดินหายใจ	ข้อมูลไม่สมบูรณ์	หญิง	Negative	6	BD
CU-H2779	จากทางเดินหายใจ	49 ปี	หญิง	Negative	6	BD
CU-C315	จากทางเดินหายใจ	9 เดือน	หญิง	Negative	1B	Z
CU-C534	จากทางเดินหายใจ	2 ปี	หญิง	Negative	6	BD
CU-C561	จากทางเดินหายใจ	2 ปี	หญิง	Negative	1B	Z
CU-C724	จากทางเดินหายใจ	7 ปี	หญิง	Negative	10	K’*
CU-C763	จากทางเดินหายใจ	2 ปี	ชาย	Negative	6	BD
CU-C936	จากทางเดินหายใจ	1 ปี	ชาย	Negative	6	BD
CU-C1204	จากทางเดินหายใจ	3 ปี	หญิง	Negative	6	BD

* Clade ของ 3D ที่ถูกจัดใหม่จากการศึกษา

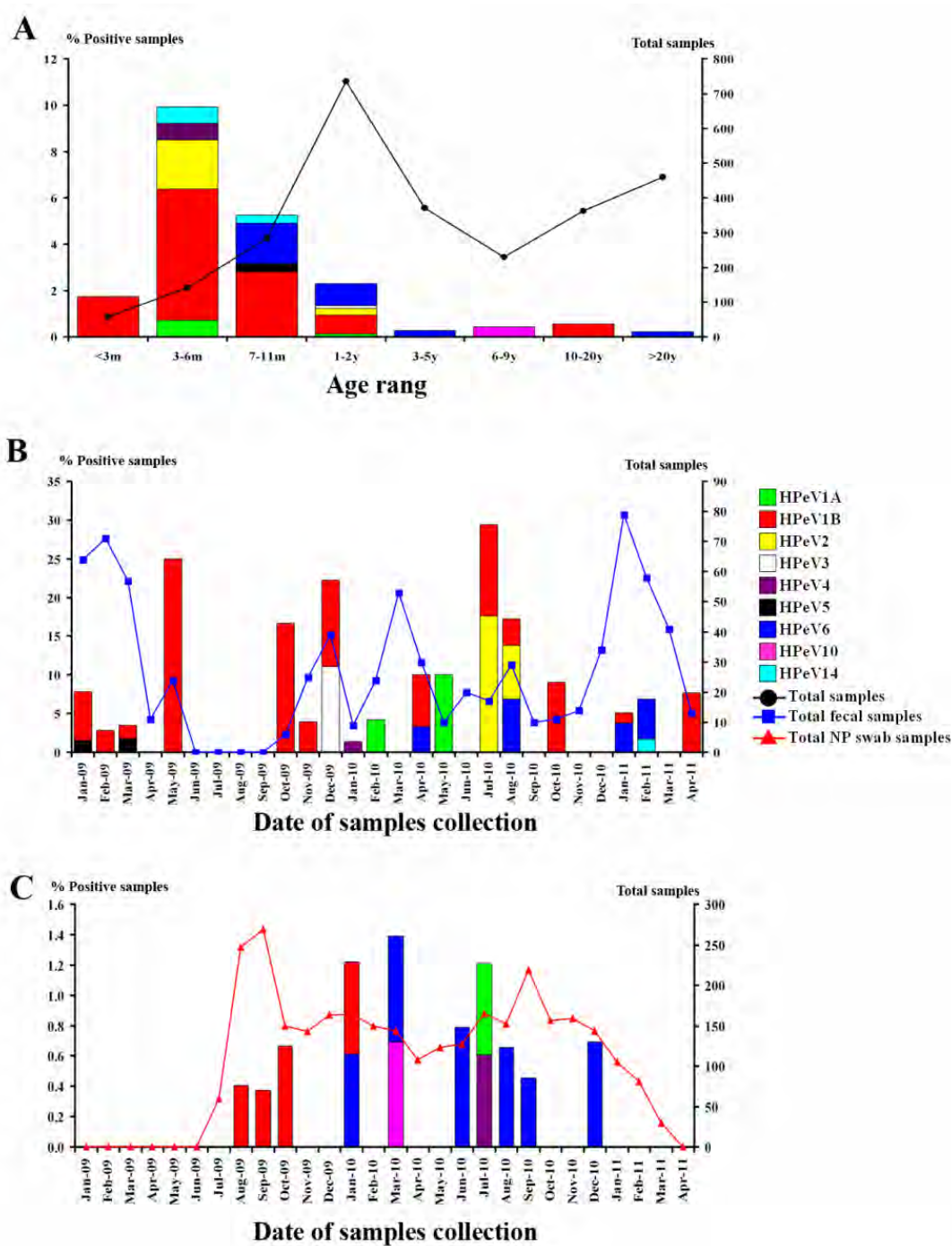
2. การจำแนกเชิงโมเลกุลของเชื้อ HPeV

ในตัวอย่าง 58 ตัวอย่างแสดงผลบวกในส่วน 5’UTR ของ HPeV นั้นสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วน VP3/VP1 ได้ทั้งหมด ซึ่งลำดับสารพันธุกรรมในส่วนนี้นั้นมีความสำคัญใน

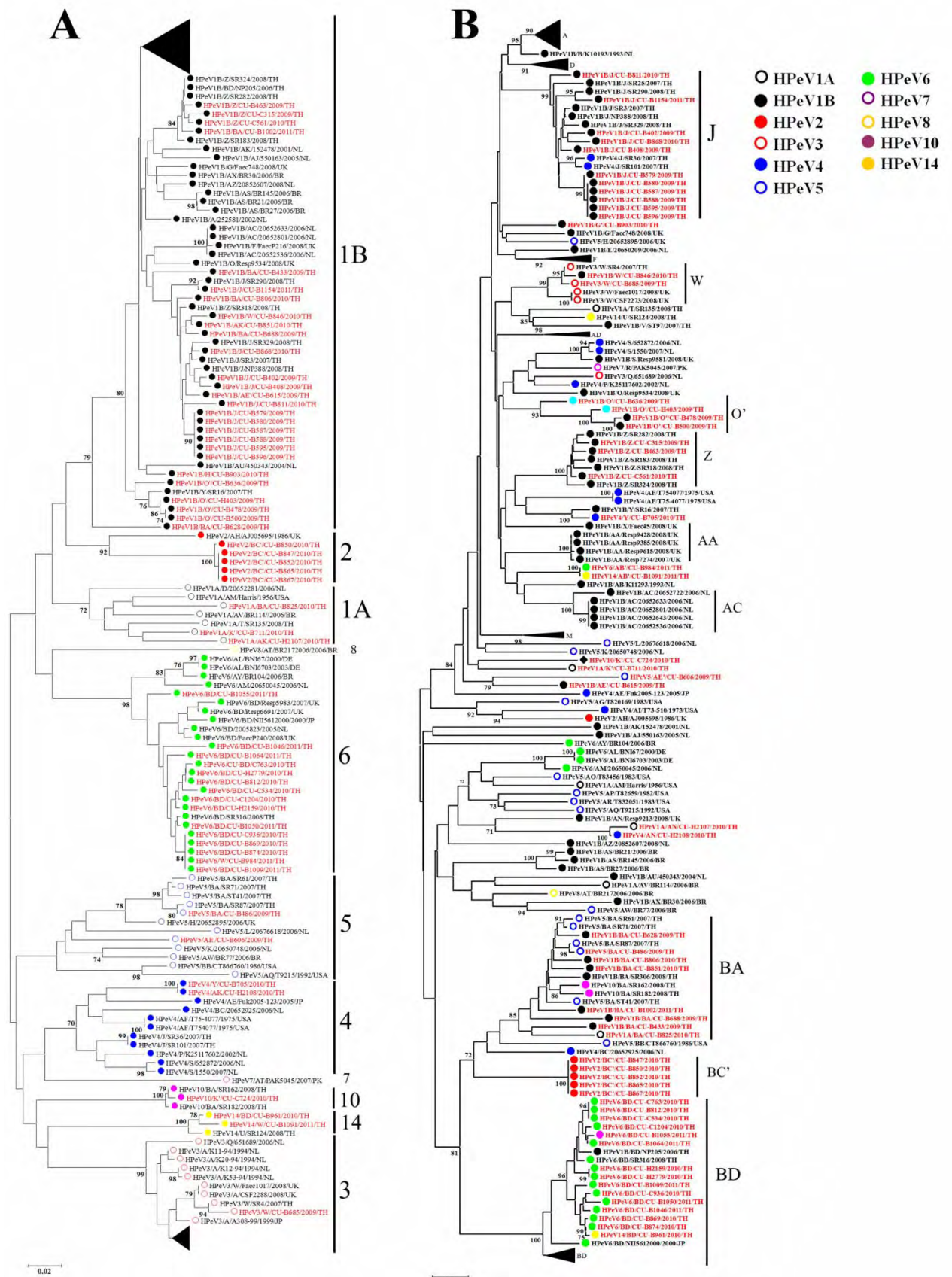
การจำแนกสายพันธุ์ของ HPeV ดังที่ Calvert et al (2010) ได้แสดงไว้ โดยอาศัยการวิเคราะห์ phylogenetic tree เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และผลจากการศึกษานี้สามารถสร้างเป็น phylogenetic tree ดังแสดงในรูป 2A และสรุปได้ว่าจากตัวอย่าง 58 ตัวอย่างแสดงผลบวก HPeV นั้น จำแนกเป็น HPeV1A จำนวน 3 ตัวอย่าง, HPeV1B จำนวน 27 ตัวอย่าง และในตัวอย่างถูกจำแนกให้เป็น HPeV1B นี้มีหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลที่น่าสนใจคือตัวอย่าง CU-B628 ซึ่งหากพิจารณาตาม กิ่ง (Clade) ของ phylogenetic tree แล้วจะพบว่าตัวอย่างนี้แยกออกมาเป็น clade เฉพาะที่ไม่สามารถเกาะเข้ากับตัวอย่างอ้างอิงใด ๆ (รูปที่ 2A) และเมื่อวิเคราะห์หลังในรายละเอียดในแง่ของความแปรผัน (Divergent) พบว่า CU-B628 นี้มีค่าความแปรผัน หรือ percent divergent อยู่ที่ประมาณ 24% เมื่อเทียบกับ Harris strain ที่เป็น HPeV1A และ ประมาณ 18% เมื่อเทียบกับกลุ่มของ HPeV1B ทั้งกลุ่ม ตัวอย่างที่เหลือสามารถจำแนกได้เป็น HPeV2 จำนวน 5 ตัวอย่าง, HPeV3 จำนวน 1 ตัวอย่าง, HPeV4 จำนวน 2 ตัวอย่าง, HPeV5 จำนวน 2 ตัวอย่าง, HPeV6 จำนวน 15 ตัวอย่าง, HPeV10 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ HPeV14 จำนวน 2 ตัวอย่าง (รูปที่ 2A และ ตารางที่ 7)

เมื่อเปรียบถึงประเภทของตัวอย่างและความหลากหลายของสายพันธุ์ของไวรัสแล้วพบว่า ตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารหรือตัวอย่างอุจจาระนั้นมีความหลากหลายของสายพันธุ์ที่มากกว่า ซึ่งในการศึกษานี้พบสายพันธุ์ที่แตกต่างกันถึง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ HPeV1A, HPeV1B, HPeV2, HPeV3, HPeV4, HPeV5, HPeV6, และ HPeV14 (รูปที่ 1B และ ตารางที่ 7) ในขณะที่ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจพบเพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ HPeV1A, HPeV1B, HPeV4, HPeV6, และ HPeV10 (รูปที่ 1C และ ตารางที่ 7)

รูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการกระจายของอายุ และช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างที่แสดงผลบวก HPeV โดยที่ (A) คือ การกระจายของอายุของตัวอย่างที่แสดงผลบวก HPeV, (B) คือระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหาร และ (C) คือระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ



รูปที่ 2 แสดง phylogenetic tree VP3/VP1 (A) และ 3D (B) ในแต่ละกิ่งของ tree นั้นจะบ่งบอกรายละเอียดดังนี้คือ สายพันธุ์/clade ของ 3D/ชื่อตัวอย่าง/ปีที่เก็บตัวอย่าง/ประเทศ สัญลักษณ์ที่แสดงไว้หน้ากิ่งนั้นจะแบ่งตามสายพันธุ์โดยอิงตามการแบ่งกลุ่มของ tree ในส่วนของ VP3/VP1 (A) และตัวอย่างที่แยกได้จากการศึกษานี้แสดงในตัวอักษรสีแดง ค่า bootstrap ที่แสดงใน tree นั้นมีค่ามากกว่า 70 เท่านั้น และในกลุ่มใดของ tree ที่ไม่มีตัวอย่างที่ได้จากการศึกษานี้จัดอยู่จะถูกรวบรวมเป็นสามเหลี่ยมทึบใน tree

จากการศึกษานี้พบว่าผู้ที่ติดเชื้อ HPeV นั้นส่วนใหญ่มียาอยู่น้อยกว่า 2 ปี ซึ่งสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดก็คือ HPeV1B และพบในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ขวบ ยกเว้นหนึ่งตัวอย่างที่เป็นผู้หญิงและมีอายุ 16 ปี (ตารางที่ 7 และ รูปที่ 1A) ในขณะที่สายพันธุ์ที่พบบ่อยเป็นอันดับสองคือ HPeV6 นั้นพบว่าสามารถตรวจพบได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่าเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 7 เดือน ถึง 5 ปี และมีหนึ่งตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอายุ 49 ปี (รูปที่ 1A และ ตารางที่ 7) ซึ่งความแตกต่างกันของกลุ่มอายุที่พบ HPeV1B และ HPeV6 นั้นไม่มีความสำคัญทางสถิติ (ค่า p เท่ากับ 0.302 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ในส่วนของสายพันธุ์ที่มีการรายงานว่าพบใหม่คือ HPeV10 และ HPeV14 นั้นจากการศึกษานี้สามารถแยกได้จากตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยหญิงที่มีอายุ 7 ปี และตัวอย่างอุจจาระสองตัวอย่างที่เก็บจากเด็กผู้ชายที่มีอายุ 6 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ (รูปที่ 1A และ ตารางที่ 7) HPeV1A และ HPeV2 นั้นสามารถพบได้ในผู้ป่วยที่มีอายุอยู่ในช่วง 3-6 เดือน และ 1-2 ปี (รูปที่ 1A) และในสายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนน้อยจากการศึกษานี้ได้แก่ HPeV3, HPeV4, และ HPeV5 นั้นสามารถพบได้ในผู้ป่วยที่อายุในช่วง 1-2 ปี, 3-6 เดือน, และ 7-12 เดือน ตามลำดับ (รูปที่ 1A และ ตารางที่ 7)

การกระจายของการพบ HPeV ในตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารและจากระบบทางเดินหายใจแสดงในรูปที่ 1B และ 1C ตามลำดับ จากการศึกษานี้ HPeV1A นั้นสามารถพบได้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนมีนาคม ปี พ.ศ.2552 ในตัวอย่างอุจจาระ และในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2552 ในตัวอย่างจะทางเดินหายใจ (รูปที่ 1B และ รูปที่ 1C) ส่วน HPeV1B ที่แยกจากตัวอย่างอุจจาระนั้นดูเหมือนจะไม่มีเฉพาะในการพบ ซึ่งจะเห็นว่าสามารถพบ HPeV1B ได้ตลอดทั้งช่วงของการศึกษา (รูปที่ 1B) ในขณะที่ HPeV1B ที่แยกได้จากตัวอย่างทางเดินหายใจนั้นพบเพียงแค่ช่วงแรกของการศึกษาเท่านั้น จากนั้น HPeV6 ก็เข้ามาแทนที่ (รูปที่ 1C) HPeV2 นั้นพบเพียงช่วงสั้น ๆ ของการศึกษาเท่านั้น (เดือนมิถุนายน ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2553) HPeV3 ที่สามารถพบได้เพียงตัวอย่างเดียวนั้นเก็บได้ในเดือน ธันวาคม พ.ศ.2552 (รูปที่ 1B) HPeV4 ที่แยกได้จากตัวอย่าง 2 แหล่งนั้นพบได้ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันคือ HPeV4 ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระนั้นพบในเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 และที่ได้จากตัวอย่างจากเดินหายใจนั้นแยกได้ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2553 (รูปที่ 1B และ รูปที่ 1C) ในขณะที่ HPeV5 นั้นสามารถพบเพียงตอนต้นของศึกษา (ช่วงเดือนมกราคม ถึงเดือนมีนาคม

พ.ศ.2009) จากนั้นก็ไม่สามารถตรวจพบอีก (รูปที่ 1B) และในสายพันธุ์ที่มีการรายงานว่าพบใหม่ HPeV10 และ HPeV14 นั้นสามารถพบได้ในเดือนมีนาคม พ.ศ.2553 และกุมภาพันธ์ พ.ศ.2554 ตามลำดับ

3. การเกิด recombination

เนื่องจาก 3D เป็นยีนที่อยู่ปลายทางด้าน 3' ของไวรัส ดังนั้นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กันระหว่างลำดับของสารพันธุกรรมในส่วน VP3/VP1 และส่วน 3D จึงถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์การเกิด recombination (Calvert et al., 2010) ตัวอย่างทั้ง 58 ตัวอย่างที่แสดงผลบวก HPeV นั้นสามารถเพิ่มจำนวนและหาลำดับสารพันธุกรรมในส่วน 3D ได้ทั้งหมดและสามารถสร้าง phylogenetic tree ในส่วน 3D จำแนก clade ได้ดังแสดงในรูปที่ 2B และตารางที่ 7 ดังที่มีการรายงานไว้ว่าในการจำแนก clade ของ 3D นั้นอาศัยความแปรผันในระดับของสารพันธุกรรมที่มีมากกว่า 5.5% (Calvert et al., 2010) ซึ่งจากตัวอย่างที่ได้จากการศึกษานี้มีความแปรผันในระดับพันธุกรรมที่มากพอให้เห็นได้ชัดคืออยู่ในช่วง 6.2%-16.1% เมื่อเทียบกับสมาชิกที่อยู่ใน clade ใกล้เคียงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง (ตารางที่ 8) ดังนั้นใน 16 ตัวอย่างนี้จึงควรที่จะถูกจัดให้อยู่ใน clade ใหม่ของ phylogenetic tree ของ 3D (ตารางที่ 7) จากการวิเคราะห์การเกิด recombination โดยอาศัยหลักการที่ Calvert et al. (2010) แสดงไว้ว่าหากการจัดกลุ่มของ phylogenetic tree ในส่วน VP3/VP1 ที่เป็นตอนต้นของสารพันธุกรรมของไวรัส กับการจัดกลุ่มของ phylogenetic tree ในส่วน 3D ที่เป็นส่วนปลายของสารพันธุกรรมของไวรัส ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน นั้นแสดงว่าไวรัสเกิด recombination ในตัวของสารพันธุกรรมของไวรัส ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงพบการเกิด recombination ในทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คือ HPeV1A 3 ตัวอย่าง (CU-B711, CU-B825 and CU-H2107), HPeV1B 7 ตัวอย่าง (CU-B433, CU-B615, CU-B688, CU-B806, CU-B846, CU-B851, and CU-B1002), HPeV4 2 ตัวอย่าง (CU-B705 and CU-H2018), HPeV5 1 ตัวอย่าง (CU-B606), HPeV6 1 ตัวอย่าง (CU-B984), และ HPeV14 2 ตัวอย่าง (CU-B961 and CU-B1091)

4. วิวัฒนาการของเชื้อ HPeV

จากการคำนวณค่า substitution rate ในส่วน VP3/VP1 ที่นำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ HPeV โดยใช้ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่มีการรายงานไว้รวมกับที่ได้จากการศึกษานี้พบว่ามีความเท่ากับ 3.02×10^{-3} nucleotides/site/year (โดยมีค่า highest posterior density, HPD, interval เท่ากับ 2.29×10^{-3} ถึง 3.83×10^{-3}) แต่เนื่องจากจำนวนข้อมูลของลำดับสารพันธุกรรมของ HPeV1A, HPeV2, HPeV4, HPeV5, และ HPeV7-HPeV16 มีอยู่น้อยเกินไปหรือไม่เลย ดังนั้นจึงมีเพียง HPeV1B, HPeV3 และ HPeV6 เท่านั้นที่นำมาวิเคราะห์ถึงค่าทางวิวัฒนาการอย่างละเอียด ซึ่งค่าที่ได้นั้นดังแสดงในตารางที่ 9 จากค่าอัตราส่วน non-synonymous ต่อ synonymous change

per site (d_N/d_S) นั้นแสดงให้เห็นว่าทั้งสามสายพันธุ์ของไวรัส (HPeV1B, HPeV3, และ HPeV6) นั้นอยู่ภายใต้การคัดเลือกตามธรรมชาติ (Neutral selection) และจากค่า substitution rate ของ HPeV1B นั้นเท่ากับ 9.11×10^{-3} nucleotides/site/year ซึ่งมีค่ามากกว่า HPeV3 ประมาณ 3 เท่า และมากกว่า HPeV6 ประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ตารางสรุปค่าความแปรผันของไวรัสที่ถูกจัดให้เป็น clade ของ 3D clade ใหม่ที่ได้จากการศึกษา

ตัวอย่าง	Clade ของ 3D ที่ใกล้ที่สุด	Divergence เมื่อเทียบกับ clade ของ 3D ที่ใกล้ที่สุด (%)*
CU-B478	O	9.8
CU-B500	O	9.4
CU-B606	AE	16.1
CU-B615	AE	14.0
CU-B636	O	7.2
CU-B711	K	12.0
CU-B847	BC	10.9
CU-B850	BC	10.9
CU-B852	BC	10.9
CU-B865	BC	10.9
CU-B867	BC	10.9
CU-B903	G	6.6
CU-B984	AB	6.2
CU-B1091	AB	6.2
CU-H403	O	9.6
CU-C724	K	10.9

*ใช้โมเดล maximum composite likelihood ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 9 ค่าประมาณทางวิวัฒนาการของ HPeV1B, HPeV3, และ HPeV6

สายพันธุ์ของHPeV	Distance*	d_N/d_S *	Substitution rate ($\times 10^{-3}$)	MRCA
1B	0.1000	0.0099	9.11 (5.14-13.36)	1985 (1978-1991)
3	0.0346	0.0181	3.03 (1.57-4.49)	1990 (1985-1995)
6	0.0607	0.0334	5.10 (2.32-8.24)	1994 (1987-1999)

* คำนวณโดยใช้ maximum composite likelihood เป็น โมเดล

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

1. ระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อ HPeV

เชื้อ HPeV เป็นสมาชิกในกลุ่มของ Picornaviruses มีสารพันธุกรรมแบบ single stranded RNA สายบวก จากความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลในปัจจุบันสามารถจำแนก HPeV ได้เป็น 16 สายพันธุ์ (Genotype) โดยอิงตามลำดับของสารพันธุกรรมในส่วน of VP1 (<http://www.picornastudygroup.com/types/parechovirus/hpev.html>) ถึงแม้ว่าจะยังไม่สามารถพิสูจน์ได้โดยตรงว่าไวรัสก่อให้เกิดโรคได้จริงหรือไม่ เพราะระบบการเพาะเลี้ยงไวรัสทั้งใน cell culture และ สัตว์ทดลองยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก แต่จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาแสดงให้เห็นว่า HPeV มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคทั้งในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบประสาทส่วนกลาง (central nerves system, CNS) ซึ่งในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสดูเหมือนจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่แตกต่างกันออกไป เช่น HPeV1 นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่ HPeV3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด และเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็ก (Abed and Boivin, 2006; Boivin et al., 2005; Harvala and Simmonds, 2009) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในไวรัสชนิดนี้ยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของไวรัสจึงมีความสำคัญอย่างมากทั้งแง่ขององค์ความรู้พื้นฐานเพื่อเข้าใจชีววิทยาของไวรัสมากยิ่งขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมโรคได้

ในการศึกษานี้ใช้หลักการทางชีววิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาการระบาดวิทยา จำแนกสายพันธุ์ และการเกิด recombination ของไวรัส ในการตรวจหา HPeV นั้นได้ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วน 5'UTR ที่มีความเหมือนกันมากในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัส ดังนั้นสารพันธุกรรมของไวรัสในส่วนนี้จึงถูกเลือกเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัส จากการศึกษาพบว่าสามารถพบไวรัสได้ในตัวอย่างทั้งหมด 58 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ทำการตรวจทั้งหมด 3,716 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.6% โดยแบ่งเป็นพบในตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 46 ตัวอย่างจากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 759 ตัวอย่างคิดเป็น 6.1% และ พบในตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจ 12 ตัวอย่างจาก 2,957 ตัวอย่างคิดเป็น 0.4% ถ้าหากเปรียบเทียบกับการศึกษาทางระบาดวิทยาก่อนหน้านี้คือ พบ 1.2% ในตัวอย่างระบบทางเดินหายใจ (Harvala et al., 2008) และ 16.3% ในตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหาร (Benschop et al., 2008b) ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ได้จากการศึกษานี้ แต่อย่างไรก็ตามค่าระบาดวิทยาที่ได้จากการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บได้มาศึกษา ไม่ได้คัดเอาตัวอย่างที่เก็บมาจากบุคคลเดียวกันออกไปซึ่งต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่จะใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บจากบุคคลที่ซ้ำกัน ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลประการหนึ่งที่ทำให้ระบาดวิทยาที่ได้

จากการศึกษานี้มีค่าที่น้อยกว่าค่าที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ อีกประการหนึ่งคือค่าระบาดของวิทยาของไวรัสนั้นอาจจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ และ ปีที่ทำการศึกษา นอกจากนี้หลักในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาก็มีผลต่อค่าของระบาดวิทยา ดังเช่นการรายงานของ Pham et al. (2010) ซึ่งได้ศึกษาระบาดของวิทยาของ HPeV ในตัวอย่างคนไทย โดยในการศึกษานั้นได้เก็บตัวอย่างที่ผ่านการตรวจ human rotavirus และ นำเอาตัวอย่างที่แสดงผลลบของ human rotavirus มาตรวจหา HPeV ผลการตรวจพบ HPeV 14.6% ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งมีค่าที่มากกว่าที่ได้จากการศึกษานี้ที่เท่ากับ 6.1% ในตัวอย่างอาจจะเป็นอย่างมาก แต่หากคิดเอาตัวอย่างที่แสดงผลบวก human rotavirus ออกจากการศึกษานี้ก็จะพบว่าค่าระบาดของวิทยาของ HPeV มีความใกล้เคียง (11.2%) กับที่ Pham et al. (2010) รายงานไว้ ดังนั้นช่วงเวลาในการศึกษา สถานที่เก็บตัวอย่าง และคุณสมบัติของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีผลต่อการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ HPeV ที่ได้จากการศึกษานี้

ดังเช่นกับการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้ที่ติดเชื้อ HPeV มีอายุน้อยกว่า 2 ขวบ โดยช่วงอายุที่มีความถี่สูงสุดคือ 3 ถึง 6 เดือน (รูปที่ 1A) จากการศึกษานี้พบว่า HPeV1B ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยที่เป็นเด็ก ในขณะที่ HPeV6 ที่พบมากเป็นอันดับสองจากการศึกษานี้สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า อย่างไรก็ตามจำนวนที่ตรวจพบในสายพันธุ์อื่น ๆ นั้นมีน้อยดังนั้นจึงยังสรุปลงไปรายละเอียดไม่ได้ว่าในแต่ละสายพันธุ์มีการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ช่วงอายุต่าง ๆ แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งการศึกษาในตัวอย่างที่มากขึ้นจะช่วยให้สามารถสรุปได้ดีขึ้น ถึงแม้จากรายงานต่าง ๆ พบว่า HPeV นั้นส่วนใหญ่จะพบในตัวอย่างที่เก็บได้จากผู้ป่วยเด็ก แต่ก็มีรายงานถึงการตรวจพบ HPeV ในผู้ป่วยที่มีอายุมากขึ้นเช่นกัน (Figuerola et al., 1989; Abed and Boivin, 2006; Li et al., 2009; Tapia et al., 2008) และในการศึกษานี้ก็พบว่าสามารถตรวจพบ HPeV ได้ในผู้ป่วยที่มีอายุมากขึ้นเช่นกัน แต่เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้เป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจสอบข้อมูลนอกเหนือที่ระบุไว้ในขั้นตอนวิธีการวิจัยได้ ดังนั้นจึงไม่ทราบแน่ชัดว่าผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่พบ HPeV จากการศึกษานี้มีโรคอื่นใดอีกหรือไม่ อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษานี้ก็เป็นอีกหนึ่งหลักฐานว่าสามารถตรวจพบ HPeV ได้ในผู้ป่วยที่มีอายุมากขึ้น

การศึกษาระบาดวิทยาของ HPeV นั้นในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่มากนัก ดังนั้นข้อมูลยังมีอย่างจำกัด จากการศึกษานี้พบว่า HPeV นั้นมีการกระจายเป็นสองช่วงคือ ในฤดูร้อนตั้งแต่เดือน เมษายน ถึง มิถุนายน และ ฤดูหนาว เดือนธันวาคม ถึง มกราคม (รูปที่ 1B และ 1C) ซึ่งสอดคล้องกับพื้นที่ที่มีการรายงานไว้ใน Scotland (Harvala et al., 2008) เมื่อพิจารณาไปในสายพันธุ์แล้วพบว่า HPeV3 ที่พบเพียงหนึ่งตัวอย่างจากการศึกษานี้พบในช่วงฤดูหนาว ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบมากในฤดูร้อน (Benschop et al 2006b; Havala and

Simmonds, 2009) ส่วนสองสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้คือ HPeV1B และ HPeV6 นั้นมีการกระจายที่แตกต่างกันในตัวอย่างไม่ได้จากระบบทางเดินหายใจและจากระบบทางเดินอาหารคือในระบบทางเดินหายใจนั้น ช่วงแรกของการศึกษาจะพบ HPeV1B และถูกแทนที่ด้วย HPeV6 ในช่วงหลังของการศึกษา (รูปที่ 1C) ในขณะที่ในตัวอย่างไม่จากระบบทางเดินอาหารนั้นจะพบ HPeV1B ตลอดช่วงเวลาของการศึกษาส่วน HPeV6 นั้น พบประปรายในช่วงหลังของการศึกษา (รูปที่ 1B) และที่น่าสนใจก็คือในการศึกษานี้พบ HPeV2 ในจำนวนที่มาก เทียบกับการศึกษาที่มีการรายงานขณะนี้ที่ไม่มีการพบ HPeV2 เลย (Benschop et al., 2008b; Havalala et al., 2008) แต่การพบ HPeV2 ในการศึกษานี้เป็นเพียงแค่ช่วงสั้น ๆ คือ เดือน กรกฎาคม ถึง สิงหาคม พ.ศ.2553 เท่านั้น (รูปที่ 1B) ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด ดังที่กล่าวไว้ในตอนต้น การศึกษาทางระบาดวิทยาโดยเฉพาะการศึกษาลงในรายละเอียดของสายพันธุ์ยังจำเป็นต้องการเข้าใจชีววิทยาของ HPeV

2. การจำแนกเชิงโมเลกุล การเกิด recombination และ วิวัฒนาการของเชื้อ HPeV

ในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสที่อาศัยลำดับสารพันธุกรรมในส่วน VP3/VP1 ประกอบกับการจัดกลุ่มใน phylogenetic tree ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าสามารถจำแนก HPeV ออกได้ 9 สายพันธุ์ได้แก่ HPeV1A, HPeV1B, HPeV2, HPeV3, HPeV4, HPeV5, HPeV6, HPeV10, HPeV14 (ตารางที่ 7 และรูป 2A) HPeV1B นั้นสามารถพบมากที่สุดในการศึกษานี้ จาก phylogenetic tree สามารถจำแนก HPeV1B เข้าไปอยู่ใน 6 clade ที่แตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับพันธุกรรมของไวรัส (รูปที่ 2A) ซึ่งหนึ่งในตัวอย่างที่ถูกจำแนกเป็น HPeV1B ได้แก่ CU-B628 นั้นมีความน่าสนใจเพราะจาก phylogenetic tree ตัวอย่างนี้แยกออกมาจาก clade อื่น ๆ อย่างชัดเจนและเมื่อคำนวณหาความสัมพันธ์กับ Harris strain มีค่าเท่ากับ 24 % ซึ่งถือว่ามีความต่างมาก แต่อย่างไรก็ตาม ตามข้อกำหนดของการแบ่งสายพันธุ์ของ HPeV นั้นความแตกต่างในระดับสารพันธุกรรมจะต้องมีมากกว่า 25% ดังนั้น CU-B628 จึงยังถูกจัดให้อยู่ในสายพันธุ์ HPeV1B ไม่สามารถจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ใหม่ได้ แต่ถึงกระนั้นจากความแตกต่างของตัวอย่าง CU-B628 นี้เป็นหลักฐานหนึ่งที่สนับสนุนถึงความหลากหลายที่มีมากในไวรัสชนิดนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ในรายละเอียดของประเทศที่พบไวรัสในแต่ละ clade ของ phylogenetic tree แล้วพบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากการศึกษานี้ถูกจัดเข้าไปในกลุ่มของไวรัสที่แยกได้ในประเทศไทยจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่า การกระจายทางด้านภูมิประเทศของไวรัสชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงในแต่ละประเทศหรือบริเวณที่ศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่าอัตราการวิเคราะห้ทางวิวัฒนาการในส่วนของ VP3/VP1 นั้นเท่ากับ 3.02×10^{-3} substitution/site/year สำหรับ HPeV ซึ่งมีค่ามากกว่าที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Faria et al., 2009) นั้น โดยค่าที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีวิวัฒนาการที่ไม่รวดเร็วนัก แต่อย่างไรก็ตามจากการสร้าง phylogenetic tree จะพบว่าไวรัสมีความหลากหลายที่สูงพอสมควร ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางวิวัฒนาการแยกออกไปในแต่ละสายพันธุ์แล้วพบว่ามีความแตกต่างกัน เนื่องจากการศึกษานี้มีการนำตัวอย่างมาไว้ในปริมาณที่มากขึ้นดังนั้นค่าที่ประมาณได้จากการทดลองนี้จึงมีค่าที่มากกว่าที่มีการประมาณไว้ก่อนหน้านี้ (Clavert et al., 2010) เช่นเดียวกับค่า d_N/d_S ที่ได้จากการศึกษานี้ก็มีค่ามากกว่าที่มีการประมาณไว้ก่อนหน้านี้ (Clavert et al., 2010) ในขณะที่ค่า MRCA ซึ่งก็คือเวลาที่ใกล้ที่สุดที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (ตารางที่ 9) ที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับที่มีการประมาณไว้ (Clavert et al., 2010) จากค่าวิวัฒนาการที่ประมาณได้จากการศึกษานี้ที่ค่อนข้างมีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ดังนั้นการศึกษาในตัวอย่างที่มากขึ้นจะทำให้เข้าใจในลักษณะของวิวัฒนาการที่เพิ่มมากขึ้น

เนื่องจากจากสารพันธุกรรมของไวรัสเป็นสายยาวเพียงเส้นเดียว ดังนั้นไวรัสจึงมีโอกาในการเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเป็นบางส่วน ซึ่งมีการรายงานถึงการเกิดในการ recombination จากการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมทั้งตัว โดยผลการศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าจุดที่จะเกิด recombination นั้นได้แก่ส่วนที่เป็นช่วงต่อระหว่าง 5'UTR และ P1 และ P1 และ P2 (Benschop et al., 2008a; Benschop et al., 2010; Drexler et al., 2011; Williams et al., 2009; Zoll et al., 2009) แต่เนื่องจากการหาลำดับสารพันธุกรรมทั้งตัวของไวรัสนั้นทำได้ลำบากทั้งในแง่ของงบประมาณ ระยะเวลา และการวิเคราะห์ข้อมูล Clavert et al. (2010) จึงได้นำเสนอวิธีการวิเคราะห์การจับกลุ่มใน phylogenetic tree ของ structural gene ที่อยู่บริเวณส่วนต้นของสารพันธุกรรมของไวรัส เปรียบเทียบกับ phylogenetic tree ของ non-structure gene ในที่นี้ใช้ 3D ที่อยู่บริเวณส่วน 3' ของสารพันธุกรรมไวรัส ซึ่งโดยปกติการจับกลุ่มทั้งในตอนต้นและตอนท้ายของสารพันธุกรรมของไวรัสจะต้องไปในแนวทางเดียวกัน แต่ถ้าหากมีการแยกกลุ่มกลุ่มไปนั้น แสดงให้เห็นถึงการเกิด recombination (Clavert et al., 2010) จากการจัดกลุ่มของ 3D ดังที่แสดงในรูปที่ 2B นั้นสามารถจำแนกตัวอย่างที่ได้จากการศึกษานี้ออกเป็น clade ต่าง ๆ ดังที่แสดงในรูปที่ 2B และ ตารางที่ 7 แต่มีตัวอย่างกลุ่มหนึ่งมีความแปรผันในระดับของลำดับสารพันธุกรรมจนสามารถจัดให้อยู่ใน clade ใหม่ได้ตามข้อกำหนดของ Clavert et al. (2010) ดังที่แสดงในตารางที่ 7 และเมื่อวิเคราะห์การเกิด recombination พบว่าจากตัวอย่างที่แสดงผลบวก HPeV ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง มีการเกิด recombination ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คิดเป็น 27.6% โดยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ HPeV1B คิดเป็น 27% ของตัวอย่าง HPeV1B ที่แยกได้ทั้งหมด ส่วน HPeV6 ที่มีระบาดวิทยาเป็นอันดับสองจากการศึกษานี้พบว่ามี recombination เพียงแค่ 1 ตัวอย่าง

คิดเป็น 6% ของตัวอย่าง HPeV6 ทั้งหมดนอกเหนือจากนี้ก็คือสายพันธุ์ HPeV1A, HPeV4, HPeV5 และ HPeV14 แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่แสดงผลบวกในสายพันธุ์เหล่านี้มีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถสรุปถึงความถี่ของการเกิด recombination ได้ ซึ่งผลจากการเกิด recombination หรือขั้นตอนการเกิด recombination นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจ การศึกษาเกี่ยวกับ recombination นี้จึงยังจำเป็นต้องลงในรายละเอียดต่อไป

แม้ว่า HPeV จะมีการค้นพบมามากกว่า 50 ปี แต่ความรู้เกี่ยวกับไวรัสนี้ยังมีน้อยมาก ไม่ว่าจะเป็น ชีววิทยา ระบาดวิทยา วิวัฒนาการ หรือแม้แต่การก่อให้เกิดโรคก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจ ดังนั้นการศึกษาทั้งในเชิงกว้าง และเชิงลึกของไวรัสนี้ยังจำเป็นต้องให้ความสำคัญต่อไป และความรู้ที่ได้นี้ยังสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับไวรัสที่อยู่ในกลุ่ม Picornavirus ตัวอื่น ๆ ที่ยังไม่เป็นที่เข้าใจดังเช่น HPeV นี้ได้เช่นเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จไปไม่ได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ (TRG5380019) สำนักงานกองทุนวิจัย, ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก กองทุนรัชฎาภิเษกสมโภชน์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กองทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (HR1155A) สำนักงานการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ, ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ทุนโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย, เจ้าหน้าที่ทุกท่านภายในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และผู้ป่วยผู้เป็นเจ้าของตัวอย่างทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

- Abed, Y., Boivin, G., 2006. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 12; 969-975.
- Al-Sunaidi, M., Williams, C.H., Hughes, P.J., Schnurr, D.P., Stanway, G., 2007. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J. Virol.* 81; 1013-1021.
- Benschop, K.S., de Vries, M., Minnaar, R.P., Stanway, G., van der Hoek, L., Wolthers, K.C., Simmonds, P., 2010. Comprehensive full-length sequence analyses of human parechoviruses: diversity and recombination. *J. Gen. Virol.* 91; 145-154.
- Benschop, K., Thomas, X., Serpenti, C., Molenkamp, R., Wolthers, K. 2008b. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 46; 3965-3970.
- Benschop, K.S., Schinkel, J., Luken, M.E., van den Broek, P.J., Beersma, M.F., Menelik, N., van Eijk, H.W., Zaaijer, H.L., VandenBroucke-Grauls, C.M., Beld, M.G., Wolthers, K.C., 2006a. Fourth human parechovirus serotype. *Emerg. Infect. Dis.* 12; 1572-1575.
- Benschop, K.S., Schinkel, J., Minnaar, R.P., Pajkrt, D., Spanjerberg, L., Kraakman, H.C., Berkhout, B., Zaaijer, H.L., Beld, M.G., Wolthers, K.C., 2006b. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin. Infect. Dis.* 42; 204-210.
- Benschop, K.S., Williams, C.H., Wolthers, K.C., Stanway, G., Simmonds, P., 2008a. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *J. Gen. Virol.* 89; 1030-1035.
- Boivin, G., Abed, Y., Boucher, F.D., 2005. Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* 11; 103-105.
- Calvert, J., Chieochansin, T., Benschop, K.S., McWilliam, Leitch, E.C., Drexler, J.F., Grywna, K., da Costa, Ribeiro, H. Jr., Drosten, C., Harvala, H., Poovorawan, Y., Wolthers, K.C., Simmonds, P., 2010. Recombination dynamics of human parechoviruses: investigation of type-specific differences in frequency and epidemiological correlates. *J. Gen. Virol.* 91; 1229-1238.

- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC. Evol. Bio.* 7; 214.
- Drexler, J.F., Grywna, K., Lukashev, A., Stöcker, A., Almeida, P.S., Wieseler, J., Ribeiro, T.C., Petersen, N., Ribeiro, Had, C. Jr., Belalov, I., Kümmerer, B.M., Drosten, C., 2011. Full genome sequence analysis of parechoviruses from Brazil reveals geographical patterns in the evolution of non-structural genes and intratypic recombination in the capsid region. *J. Gen. Virol.* 92; 564-571.
- Drexler, J.F., Grywna, K., Stöcker, A., Almeida, P.S., Medrado-Ribeiro, T.C., Eschbach-Bludau, M., Petersen, N., da Costa-Ribeiro-Jr. H., Drosten, C., 2009. Novel human parechovirus from Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15; 310-313.
- Faria, N.R., de Vries, M., van Hemert, F.J., Benschop, K., van der Hoek, L., 2009. Rooting human parechovirus evolution in time. *BMC. Evol. Biol.* 9;164.
- Figueroa, J.P., Ashley, D., King, D., Hull, B., 1989. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J. Med. Virol.* 29; 315-319.
- Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Takeda, N., Sakae, K., 2004. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J. Gen. Virol.* 85; 391-398.
- Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Kabashima, Y., Hasegawa, A., Nagaya, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, S., Fujiura, A., Sakae, K., Minagawa, H., 2010. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 48; 2683-2688.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41; 95-98.
- Harvala, H., Robertson, I., McWilliam, Leitch, E.C., Benschop, K., Wolthers, K.C., Templeton, K., Simmonds, P., 2008. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J. Clin. Microbiol.* 46; 3446-3453.
- Harvala, H., Simmonds, P., 2009. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J. Clin. Virol.* 45; 1-9.
- Harvala, H., Wolthers, K.C., Simmonds, P., 2010. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23; 224-230.

- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A., 2006. Enterovirus surveillance : United State. MMWR. Surveill. Summ. 55; 1-20.
- Li, L., Victoria, J., Kapoor, A., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M.M., Angez, M., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2009. Genomic characterization of novel human parechovirus type. *Emerg. Infect. Dis.* 15; 288-291.
- Nateri, A.S., Hughes, P.J., Stanway, G., 2000. In vivo and in vitro identification of structural and sequence elements of the human parechovirus 5' untranslated region required for internal initiation. *J. Virol.* 74; 6269-6277.
- Nateri, A.S., Hughes, P.J., Stanway, G., 2002. Terminal RNA replication elements in human parechovirus 1. *J. Virol.* 76; 13116-13122.
- Oberste, M.S., Maher, K., Pallansch, M.A., 1998. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus. Res.* 56; 217-223.
- Pham, N.T., Trinh, Q.D., Khamrin, P., Maneekarn, N., Shimizu, H., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H., 2010. Diversity of human parechoviruses isolated from stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 48; 115-119.
- Samuilova, O., Krogerus, C., Fabrichniy, I., Hyypiä, T., 2006. ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *J. Virol.* 80; 1053-1058.
- Schultheiss, T., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Gauss-Müller, V., 1995. Polyprotein processing in echovirus 22: a first assessment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217;1120-7.
- Schnurr, D., Dondero, M., Holland, D., Connor, J., 1996. Characterization of echovirus 22 variants. *Arch Virol.* 141; 1749-1758.
- Stanway, G., Kalkkinen, N., Roivainen, M., Ghazi, F., Khan, M., Smyth, M., Meurman, O., Hyypiä, T., 1994. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J. Virol.* 68; 8232-8238.
- Stanway G., Hyypia T., 1999. Parechoviruses. *J. Virol.* 73; 5249-5254.
- Wigand, R., Sabin, A.B., 1961. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 11, 224-247.

- Suwannakarn, K., Payungporn, S., Chieochansin, T., Samransamruajkit, R., Amonsin, A., Songserm, T., Chaisingh, A., Chamnanpood, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., 2008. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *J. Virol. Methods.* 152; 25-31.
- Tapia, G., Cinek, O., Witsø, E., Kulich, M., Rasmussen, T., Grinde, B., Rønningen, K.S., 2008. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *J. Med. Virol.* 80; 1835-1842.
- Tauriainen, S., Martiskainen, M., Oikarinen, S., Lönnrot, M., Viskari, H., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M., Hyöty, H., 2007. Human parechovirus 1 infections in young children—no association with type 1 diabetes. *J. Med. Virol.* 79:457-462.
- Theamboonlers, A., Veravigrom, M., Yambangyang, O., Trairatvorakul, P., Chongsrisawat, V., Poovorawan, Y., 2002. The incidence of rotavirus a isolates of G genotype in Thailand in 2002-2004. *Acta. Virol.* 49; 111-115.
- Verboon-Maciolek, M.A., Krediet, T.G., Gerards, L.J., Fleer, A., van Loon, T.M., 2005. Clinical and epidemiologic characteristics of viral infections in a neonatal intensive care unit during a 12-year period. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24; 901-904.
- Watanabe K., Oie, M., Higuchi, M., Nishikawa, M., Fujii, M., 2007. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg. Infect. Dis.* 13; 889-895.
- Williams, C.H., Panayiotou, M., Girling, G.D., Peard, C.I., Oikarinen, S., Hyöty, H., Stanway, G., 2009. Evolution and conservation in human parechovirus genomes. *J. Gen. Virol.* 90; 1702-1712.
- Zhang, D.L., Jin, Y., Li, D.D., Cheng, W.X., Xu, Z.Q., Yu, J.M., Jin, M., Yang, S.H., Zhang, Q., Cui, S.X., Liu, N., Duan, Z.J., 2010. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03390.x. [Epub ahead of print].
- Zhong, H., Lin, Y., Sun, J., Su, L., Cao, L., Yang, Y., Xu, J., 2011. Prevalence and genotypes of human parechovirus in stool samples from hospitalized children in Shanghai, China, 2008 and 2009. *J. Med. Virol.* doi: 10.1002/jmv.22114. [Epub ahead of print].

Zoll, J., Galama, J.M., van Kuppeveld, F.J., 2009. Identification of potential recombination breakpoints in human parechoviruses. *J. Virol.* 83; 3379-3383.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ด้านองค์ความรู้

- 1.1. ได้ทราบข้อมูลระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของเชื้อพรีโซไวรัสในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้
- 1.2. ได้ทราบข้อมูลสายพันธุ์ของเชื้อพรีโซไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทย เพื่อประยุกต์ใช้ในการศึกษาวัคซีนเพื่อด้านการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้
- 1.3. ได้ทราบข้อมูลการเกิด recombination ของเชื้อพรีโซไวรัส เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

2. ด้านข้อมูลสาธารณะ

- 2.1. ได้ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งในส่วน VP3/VP1 และ 3D ซึ่งฝากในในฐานข้อมูล GenBank (ดูในภาคผนวก)
- 2.2. ได้เผยแพร่งานวิจัยในหัวข้อ เรื่อง “Molecular Epidemiology, Genome Characterization, and Recombination Event of Human Parechovirus” ในวารสาร Virology ฉบับที่ 421 ปี 2011 หน้า 159-166 (ดูภาคผนวก)

การเชื่อมโยงกับต่างประเทศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจาก Prof.Peter Simmonds จาก Centre for Immunity, Infection and Evolution, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, Kings Buildings, West Main Road, Edinburgh EH9 3JT, United Kingdoms.

ภาคผนวก

ตารางแสดงข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด

Sequences name	Genotype	3D clade	GenBank Accession No.			Country*	Year
			Full length	VP3/VP1	3D		
20652281	HPeV1A	D	-	GU946757	GU946903	NL	2001
CU-B711	HPeV1A	K'	-	JN106551	JN106493	TH	2002
CU-B825	HPeV1A	BA	-	JN106555	JN106497	TH	2004
BR114	HPeV1A	AV	-	GU946806	GU946967	BR	2004
CU-H2107	HPeV1A	AN	-	JN106578	JN106520	TH	2005
Harris	HPeV1A	AM	S45208	-	-	USA	2006
SR135	HPeV1A	T	-	GU946758	GU946904	TH	2006
152478	HPeV1B	AK	GQ183018	-	-	NL	2006
252581	HPeV1B	A	GQ183019	-	-	NL	2006
450343	HPeV1B	AU	GQ183020	-	-	NL	2006
452251	HPeV1B	AD	-	GU946704	GU946837	NL	2006
550163	HPeV1B	AJ	GQ183021	-	-	NL	2006
650081	HPeV1B	A	-	GU946681	GU946814	NL	2006
650941	HPeV1B	A	-	GU946682	GU946815	NL	2006
650989	HPeV1B	A	-	GU946683	GU946816	NL	2006
851625	HPeV1B	M	-	GU946705	GU946383	NL	2006
2067703	HPeV1B	AD	-	GU946698	GU946831	NL	2006
20650209	HPeV1B	E	-	GU946684	GU946817	NL	2006
20650427	HPeV1B	D	-	GU946685	GU946818	NL	2006
20650606	HPeV1B	D	-	GU946686	GU946819	NL	2006
20650750	HPeV1B	D	-	GU946687	GU946820	NL	2006
20650854	HPeV1B	M	-	GU946688	GU946821	NL	2006
20651625	HPeV1B	D	-	GU946689	GU946822	NL	2006
20652536	HPeV1B	AC	-	GU946690	GU946823	NL	2006
20652633	HPeV1B	AC	-	GU946691	GU946824	NL	2008
20652643	HPeV1B	AC	-	GU946692	GU946825	NL	2011
20652722	HPeV1B	AC	-	GU946693	GU946826	NL	2011
20652801	HPeV1B	AC	-	GU946694	GU946827	NL	2009
20676271	HPeV1B	D	-	GU946695	GU946828	NL	2009
20676323	HPeV1B	D	-	GU946696	GU946829	NL	2009
20676981	HPeV1B	D	-	GU946697	GU946830	NL	2009
20852607	HPeV1B	AZ	-	GU946699	GU946832	NL	2009
CU-B1002	HPeV1B	BA	-	JN106569	JN106511	TH	2009
CU-B1154	HPeV1B	J	-	JN106576	JN106518	TH	2009
CU-B402	HPeV1B	J	-	JN106531	JN106473	TH	2009
CU-B408	HPeV1B	J	-	JN106532	JN106474	TH	2009
CU-B433	HPeV1B	BA	-	JN106533	JN106475	TH	2009
CU-B463	HPeV1B	Z	-	JN106534	JN106476	TH	2009
CU-B478	HPeV1B	O'	-	JN106535	JN106477	TH	2009

CU-B500	HPeV1B	O'	-	JN106537	JN106479	TH	2009
CU-B579	HPeV1B	J	-	JN106538	JN106480	TH	2009
CU-B580	HPeV1B	J	-	JN106539	JN106481	TH	2009
CU-B587	HPeV1B	J	-	JN106540	JN106482	TH	2009
CU-B588	HPeV1B	J	-	JN106541	JN106483	TH	2010
CU-B595	HPeV1B	J	-	JN106542	JN106484	TH	2010
CU-B596	HPeV1B	J	-	JN106543	JN106485	TH	2010
CU-B615	HPeV1B	AE'	-	JN106545	JN106487	TH	2010
CU-B628	HPeV1B	BA	-	JN106546	JN106488	TH	2010
CU-B636	HPeV1B	O'	-	JN106547	JN106489	TH	2010
CU-B688	HPeV1B	BA	-	JN106549	JN106491	TH	2003
CU-B806	HPeV1B	BA	-	JN106552	JN106494	TH	2006
CU-B811	HPeV1B	J	-	JN106553	JN106495	TH	2006
CU-B846	HPeV1B	W	-	JN106556	JN106498	TH	2006
CU-B851	HPeV1B	AK	-	JN106559	JN106501	TH	2006
CU-B868	HPeV1B	J	-	JN106563	JN106505	TH	2009
CU-B903	HPeV1B	G'	-	JN106566	JN106508	TH	2010
BNI788ST	HPeV1B	AD	EF051629	-	-	DE	2008
BR145	HPeV1B	AS	-	GU946800	GU946961	BR	2008
BR21	HPeV1B	AS	-	GU946797	GU946958	BR	2008
BR27	HPeV1B	AS	-	GU946798	GU946959	BR	2008
BR30	HPeV1B	AX	-	GU946799	GU946960	BR	2008
CU-C315	HPeV1B	Z	-	JN106524	JN106466	TH	2008
CU-C561	HPeV1B	Z	-	JN106525	JN106468	TH	2008
Faec1102	HPeV1B	BD	-	FJ847969	GU946843	UK	2008
Faec1107	HPeV1B	D	-	FJ847968	GU946844	UK	2008
Faec1110	HPeV1B	BD	-	FJ847970	GU946845	UK	2008
Faec45	HPeV1B	X	-	FJ847974	GU946841	UK	2008
Faec748	HPeV1B	G	-	GU946708	GU946842	UK	2008
FaecP156	HPeV1B	BD	-	GU946709	GU946846	UK	2008
FaecP164	HPeV1B	D	-	GU946710	GU946847	UK	2008
FaecP181	HPeV1B	BD	-	GU946711	GU946848	UK	2008
FaecP198	HPeV1B	BD	-	GU946712	GU946849	UK	2008
FaecP207	HPeV1B	F	-	GU946713	GU946850	UK	2008
FaecP208	HPeV1B	F	-	GU946714	GU946851	UK	2009
FaecP216	HPeV1B	F	-	GU946715	GU946852	UK	1993
FaecP229	HPeV1B	D	-	GU946716	GU946853	UK	1993
FaecP235	HPeV1B	D	-	GU946717	GU946854	UK	1993
FaecP243	HPeV1B	D	-	GU946718	GU946855	UK	1993
FaecP245	HPeV1B	D	-	GU946719	GU946856	UK	1993
FaecP247	HPeV1B	BD	-	GU946720	GU946857	UK	1993
CU-H403	HPeV1B	O'	-	JN106577	JN106519	TH	1993

K10193	HPeV1B	B	-	GU946700	GU946833	NL	1994
K11293	HPeV1B	AB	-	GU946701	GU946834	NL	1994
K12993	HPeV1B	M	GQ183022	-	-	NL	2006
K14193	HPeV1B	M	-	GU946702	GU946835	NL	2008
K15093	HPeV1B	M	GQ183023	-	-	NL	2008
K15893	HPeV1B	M	-	GU946703	GU946836	NL	2008
K17593	HPeV1B	M	-	GU946707	GU946840	NL	2008
K5494	HPeV1B	M	GQ183024	-	-	NL	2008
K6394	HPeV1B	M	GQ183025	-	-	NL	2008
NP205	HPeV1B	BD	-	GU946754	GU946900	TH	2007
NP388	HPeV1B	J	-	GU946755	GU946901	TH	2007
Resp10182	HPeV1B	BD	-	GU946742	GU946886	UK	2007
Resp10233	HPeV1B	BD	-	GU946743	GU946887	UK	2007
Resp10234	HPeV1B	BD	-	GU946744	GU946888	UK	2007
Resp10777	HPeV1B	BD	-	FJ847950	GU946889	UK	2007
Resp5612	HPeV1B	AD	-	GU946721	GU946858	UK	2007
Resp5751	HPeV1B	F	-	GU946722	GU946859	UK	2007
Resp5780	HPeV1B	F	-	GU946723	GU946860	UK	2007
Resp5800	HPeV1B	BD	-	GU946724	GU946861	UK	2007
Resp5852	HPeV1B	F	-	GU946725	GU946862	UK	2007
Resp5860	HPeV1B	BD	-	GU946726	GU946863	UK	2007
Resp5870	HPeV1B	AD	-	GU946727	GU946864	UK	2007
Resp6083	HPeV1B	AD	-	GU946728	GU946865	UK	2007
Resp6229	HPeV1B	F	-	GU946729	GU946866	UK	2007
Resp6363	HPeV1B	BD	-	GU946730	GU946867	UK	2007
Resp6374	HPeV1B	AD	-	GU946731	GU946868	UK	2007
Resp6637	HPeV1B	F	-	GU946732	GU946869	UK	2008
Resp6880	HPeV1B	D	-	GU946733	GU946870	UK	2008
Resp6888	HPeV1B	BD	-	GU946734	GU946871	UK	2008
Resp7141	HPeV1B	F	-	GU946735	GU946872	UK	2008
Resp7173	HPeV1B	AD	-	GU946736	GU946873	UK	2008
Resp7274	HPeV1B	AA	-	GU946737	GU946874	UK	2008
Resp7279	HPeV1B	BD	-	GU946738	GU946875	UK	2008
Resp9213	HPeV1B	AN	-	FJ847954	GU946876	UK	2008
Resp9268	HPeV1B	F	-	GU946739	GU946877	UK	2008
Resp9369	HPeV1B	BD	-	FJ847956	GU946880	UK	2008
Resp9378	HPeV1B	D	-	FJ847957	GU946878	UK	2007
Resp9385	HPeV1B	AA	-	FJ847958	GU946879	UK	2008
Resp9418	HPeV1B	BD	-	FJ847959	GU946881	UK	2007
Resp9428	HPeV1B	AA	-	FJ847960	GU946882	UK	2008
Resp9534	HPeV1B	O	-	FJ847961	GU946883	UK	2008
Resp9581	HPeV1B	S	-	FJ847954	GU946884	UK	2007
Resp9615	HPeV1B	AA	-	FJ847965	GU946885	UK	2008

SR16	HPeV1B	Y	-	GU946745	GU946891	TH	2008
SR183	HPeV1B	Z	-	GU946747	GU946893	TH	2008
SR25	HPeV1B	J	-	GU946746	GU946892	TH	2008
SR282	HPeV1B	Z	-	GU946748	GU946894	TH	2007
SR290	HPeV1B	J	-	GU946749	GU946895	TH	1986
SR3	HPeV1B	J	-	GU946744	GU946890	TH	2010
SR306	HPeV1B	BA	-	GU946750	GU946896	TH	2010
SR318	HPeV1B	Z	-	GU946751	GU946897	TH	2010
SR324	HPeV1B	Z	-	GU946752	GU946898	TH	2010
SR329	HPeV1B	J	-	GU946753	GU946899	TH	2010
ST97	HPeV1B	V	-	GU946756	GU946902	TH	2001
AJ005695	HPeV2	AH	AJ005695	-	-	UK	2002
CU-B847	HPeV2	BC'	-	JN106557	JN106499	TH	2004
CU-B850	HPeV2	BC'	-	JN106558	JN106500	TH	2006
CU-B852	HPeV2	BC'	-	JN106560	JN106502	TH	2004
CU-B865	HPeV2	BC'	-	JN106561	JN106503	TH	2006
CU-B867	HPeV2	BC'	-	JN106562	JN106504	TH	2006
152037	HPeV3	A	GQ183026	-	-	NL	2006
251360	HPeV3	A	GQ183027	-	-	NL	2006
450936	HPeV3	A	GQ183028	-	-	NL	2008
451289	HPeV3	A	-	GU946759	GU946905	NL	2008
451615	HPeV3	A	-	GU946760	GU946906	NL	2008
651689	HPeV3	Q	GQ183029	-	-	NL	1999
851439	HPeV3	A	-	GU946767	GU946913	NL	2009
851659	HPeV3	A	-	GU946766	GU946912	NL	2001
851701	HPeV3	A	-	GU946768	GU946914	NL	2008
20851546	HPeV3	A	-	GU946762	GU946908	NL	2008
20851576	HPeV3	A	-	GU946761	GU946907	NL	2008
20852199	HPeV3	A	-	GU946763	GU946909	NL	2008
A308-99	HPeV3	A	AB084913	-	-	JP	2008
CU-B685	HPeV3	W	-	JN106548	JN106490	TH	2008
Can82853-01	HPeV3	A	AJ889918	-	-	CA	2008
CSF2147	HPeV3	A	-	FJ848003	GU946929	UK	2008
CSF2169	HPeV3	A	-	FJ848002	GU946930	UK	2006
CSF2273	HPeV3	W	-	FJ848012	GU946931	UK	2006
CSF2288	HPeV3	A	-	FJ848009	GU946932	UK	2008
CSF2307	HPeV3	A	-	FJ848008	GU946933	UK	2008
CSF2327	HPeV3	A	-	FJ848011	GU946934	UK	2008
CSF2369	HPeV3	A	-	FJ848012	GU946935	UK	2006
CSF2389	HPeV3	A	-	FJ848004	GU946936	UK	2008
CSF721	HPeV3	A	-	FJ848001	GU946927	UK	2008
CSF874	HPeV3	A	-	FJ848000	GU946928	UK	2008

Faec1017	HPeV3	W	-	GU946771	GU946918	UK	2008
Faec1406	HPeV3	A	-	FJ847967	GU946919	UK	1994
Faec1434	HPeV3	A	-	GU946772	GU946920	UK	1994
Faec1441	HPeV3	A	-	GU946773	GU946921	UK	1994
Faec708	HPeV3	A	-	GU946769	GU946915	UK	1994
Faec713	HPeV3	A	-	GU946770	GU946916	UK	1994
Faec983	HPeV3	A	-	FJ847999	GU946917	UK	1994
FaecP171	HPeV3	A	-	GU946774	GU94692	UK	2008
K11-94	HPeV3	A	GQ183030	-	-	NL	2008
K12-94	HPeV3	A	GQ183031	-	-	NL	2008
K20-94	HPeV3	A	GQ183032	-	-	NL	2008
K53-94	HPeV3	A	-	GU946764	GU946910	NL	2007
K55-94	HPeV3	A	-	GU946765	GU946911	NL	2007
K8-94	HPeV3	A	-	GU946766	GU946912	NL	2006
Resp10324	HPeV3	A	-	FJ847949	GU946924	UK	2006
Resp10681	HPeV3	A	-	FJ847947	GU946740	UK	2010
Resp11270	HPeV3	A	-	FJ847952	GU946926	UK	2005
Resp9530	HPeV3	A	-	FJ847949	GU946924	UK	2010
SR4	HPeV3	W	-	GU946776	GU946937	TH	2002
1550	HPeV4	S	-	GU946779	GU946940	NL	2007
652872	HPeV4	S	-	GU946777	GU946938	NL	2007
20652925	HPeV4	BC	-	GU946778	GU946939	NL	1973
CU-B705	HPeV4	Y	-	JN106550	JN106492	TH	1975
Fuk2005-123	HPeV4	AE	AB433629	-	-	JP	1975
CU-H2108	HPeV4	AN	-	JN106579	JN106521	TH	2006
K25117602	HPeV4	P	DQ315670	-	-	NL	2006
SR101	HPeV4	J	-	GU946781	GU946942	TH	2006
SR36	HPeV4	J	-	GU946780	GU946941	TH	2009
T73-510	HPeV4	AI	-	-	AM933163	USA	2006
T75-4077	HPeV4	AF	AM235750	-	-	USA	1973
20650748	HPeV5	K	-	GU946782	GU946943	NL	2007
20652895	HPeV5	H	-	GU946783	GU946944	UK	2007
20676618	HPeV5	L	-	GU946784	GU946945	NL	2007
CU-B606	HPeV5	AE'	-	JN106544	JN10648	TH	1983
BR77	HPeV5	AW	-	GU946812	GU946973	BR	1982
CT866760	HPeV5	BB	AF055846	-	-	USA	1983
SR61	HPeV5	BA	-	GU946785	GU946946	TH	1983
SR71	HPeV5	BA	-	GU946786	GU946947	TH	1992
SR87	HPeV5	BA	-	GU946787	GU946948	TH	2005
ST41	HPeV5	BA	-	GU946788	GU946949	TH	2006
T820169	HPeV5	AG	-	-	AM933161	USA	2011
T82659	HPeV5	AP	-	-	AM933160	USA	2011

T832051	HPeV5	AR	-	-	AM933164	USA	2011
T83456	HPeV5	AO	-	-	AM933159	USA	2011
T9215	HPeV5	AQ	AM235749	-	-	USA	2011
2005823	HPeV6	BD	EU077518	-	-	NL	2009
20650045	HPeV6	AM	EU556224	-	-	NL	2010
CU-B1009	HPeV6	BD	-	JN106570	JN106512	TH	2010
CU-B1046	HPeV6	BD	-	JN106571	JN106513	TH	2010
CU-B1050	HPeV6	BD	-	JN106572	JN106514	TH	2011
CU-B1055	HPeV6	BD	-	JN106573	JN106515	TH	2000
CU-B1064	HPeV6	BD	-	JN106574	JN106516	TH	2003
CU-B486	HPeV6	BA	-	JN106536	JN106478	TH	2006
CU-B812	HPeV6	BD	-	JN106554	JN106496	TH	2010
CU-B869	HPeV6	BD	-	JN106564	JN106506	TH	2010
CU-B874	HPeV6	BD	-	JN106565	JN106507	TH	2010
CU-B984	HPeV6	AB'	-	JN106568	JN106510	TH	2010
BNI67	HPeV6	AL	EU022171	-	-	DE	2008
BNI6703	HPeV6	AL	EU024629	-	-	DE	2010
BR104	HPeV6	AY	-	GU946813	GU946974	BR	2010
CU-C1204	HPeV6	BD	-	JN106530	JN106472	TH	2000
CU-C534	HPeV6	BD	-	JN106526	JN106467	TH	2007
CU-C763	HPeV6	BD	-	JN106528	JN106470	TH	2007
CU-C936	HPeV6	BD	-	JN106529	JN106471	TH	2008
FaecP240	HPeV6	BD	-	GU946790	GU946951	UK	2007
CU-H2159	HPeV6	BD	-	JN106580	JN106522	TH	2006
CU-H2779	HPeV6	BD	-	JN106581	JN106523	TH	2001
NII5612000	HPeV6	BD	AB252582	-	-	JP	2002
Resp5983	HPeV6	BD	-	GU946791	GU946952	UK	2004
Resp6691	HPeV6	BD	-	GU946792	GU946953	UK	2004
SR316	HPeV6	BD	-	GU946793	GU946954	TH	2005
PAK5045	HPeV7	R	EU716175	-	-	PK	2006
BR2172006	HPeV8	AT	EU716175	-	-	BR	2006
CU-C724	HPeV10	K'	-	JN106527	JN106469	TH	2010
SR162	HPeV10	BA	-	GU946794	GU946955	TH	2008
SR182	HPeV10	BA	-	GU946795	GU946956	TH	2008
CU-B1091	HPeV14	AB'	-	JN106575	JN106517	TH	2011
CU-B961	HPeV14	BD	-	JN106567	JN106509	TH	2010
SR124	HPeV14	U	-	GU946796	GU946957	TH	2008

ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษานี้แสดงในตัวอักษรตัวหนา

* BR: Brazil; CA: Canada; DE: Germany; JP: Japan; PK: Pakistan; NL: The Netherland; TH: Thaland; USA: United State of America;
UK: United Kingdom.

Manuscript



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro


Molecular epidemiology, genome characterization, and recombination event of human parechovirus

Thaweesak Chiochansin, Preeyaporn Vichi Wattana, Sumeth Korkong, Apiradee Theamboonlers, Yong Poovorawan*

Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2011

Returned to author for revision

22 September 2011

Accepted 24 September 2011

Available online 21 October 2011

Keywords:

Human parechovirus

HPeV

Recombination

Genotype

ABSTRACT

Human Parechovirus (HPeV), a member of the *Picornaviridae* family, is an infectious agent mostly affecting children. There are 16 recognized genotypes which have globally spread. This study incorporated a total of 2957 nasopharyngeal (NP) swab and 759 fecal samples that were collected from different parts of Thailand. The NP of HPeV was detected in 0.4% of NP swab and 6.1% of fecal samples. The majority of HPeV infections occur in infants below the age of 2 years, while infections were detected in children above the age of 10 years as well. Various genotypes comprising 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6, 10 and 14 have been characterized. This study revealed recombination events in 16 samples in which HPeV1B was shown as the highest frequency. In conclusion, HPeV can be detected in both the respiratory and GI tract. Moreover, HPeV which circulates in Thailand is highly diverse and subject to recombination.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Human parechovirus (HPeV) is a small non-enveloped single stranded RNA virus of positive polarity which belongs to the vast family, *Picornaviridae*. The virus has first been discovered from an outbreak of diarrhea among children in 1961. Based on their serology and clinical presentation, the virus was defined as echovirus 22 and 23 of the genus *Enterovirus* (Wigand and Sabin, 1961). However, studies on genetics, protein translation and biological properties of the virus have shown that it is different from other members of the genus *Enterovirus*. Hence, it has been reclassified into a new genus, *Parechovirus* and those viruses previously defined as echovirus 22 and 23 were re-named HPeV1 and HPeV2, respectively (Stanway and Hyypia, 1999; Stanway et al., 1994). Recently, additional types of HPeV have been reported, which were associated with different clinical manifestations. For example, HPeV3 was isolated from nasopharyngeal aspirates (NPA) and related to sepsis in neonates (Ito et al., 2004). HPeV4 was isolated from fecal samples and related to fever in neonates (Benschop et al., 2006a). HPeV5 had previously been defined as HPeV2 based on serology of children presenting with high fever but upon genome analysis was re-classified as type five (Oberste et al., 1998). HPeV6 was isolated from one child suffering from Reye's syndrome (Watanabe et al., 2007), HPeV7 was identified by metagenomic method

in fecal samples of a healthy child (Li et al., 2009), HPeV8 was isolated from fecal samples during an outbreak of acute diarrhea in Brazil (Drexler et al., 2009), and HPeV9 to HPeV16 which unpublished but had already been assigned by the following website (<http://www.picornastudygroup.com/types/parechovirus/hpev.html>).

Since the first report of HPeV infection, the epidemics of virus have been continuously reported. The most common genotype of the virus that could be isolated worldwide was HPeV1B followed by HPeV3. In contrast, other genotypes such as HPeV1A, HPeV2, and HPeV4–6 were less common among infected patients than those two dominant genotypes (Benschop et al., 2008b; Ito et al., 2010; Pham et al., 2010; Tapia et al., 2008). It should be noted that HPeV7 to 16 are a new genotypes that have been recently discovered. Thus, epidemiology and prevalence of these genotypes have not been fully established. The virus was mostly detected in children especially in infants below the age of 3 years (Benschop et al., 2006b; Tauriainen et al., 2007; Verboon-Macielek et al., 2005). However, patients above the age of 10 years have also been noted (Abed and Boivin, 2006; Figueroa et al., 1989; Tapia et al., 2008; Watanabe et al., 2007). The longitudinal surveillance in USA between 1983 and 2005 has shown 3% of HPeV1 and 68% of HPeV2 had been isolated from infants less than 1 year old (Khetsuriani et al., 2006). In contrast, a study conducted in the Netherlands in 2000 has proposed that children below the age of 3 years were infected with HPeV1 and HPeV3 (Benschop et al., 2006b). The clinical presentations of HPeV infection were associated with mild disease of the respiratory and gastrointestinal (GI) tract (Harvala et al., 2008; Zhang et al., 2010; Zhong et al., 2011). According to a recent study, HPeV, especially HPeV3, was strongly associated with sepsis in neonates (Boivin et al., 2005; Harvala et al., 2009).

* Corresponding author at: Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Fax: +66 2256 4929.

E-mail address: Yong.P@chula.ac.th (Y. Poovorawan).

The HPeV genome comprises approximately 7300 nucleotides flanked by an un-translated region (UTR) at both the 5' and 3' end. The virus translates a polyprotein with one single open reading frame (ORF) which is subsequently cleaved during the post-translational process into 3 structural proteins, VP0, VP3 and VP1, and 7 non-structural proteins, 2A–2C and 3A–3D (Harvala and Simmonds, 2009; Harvala et al., 2010).

Based on differences in antigenicity along with vast diversities in the virus genome, 16 types of HPeV have been classified (<http://www.picornastudygroup.com/types/parechovirus/hpev.html>). Rapid changes in their genomes normally occurring in the course of the

replication cycle and thus contributing to antigenic drift with substitution rates ranging from 2.2×10^{-3} to 2.8×10^{-3} have been shown (Faria et al., 2009). Like with other picornaviruses, recombination in their genome had been detected and the breaking point of recombination was shown at the junction between P1 and P2 and the 5'UTR and P1 region (Benschop et al., 2008a, 2010; Drexler et al., 2011; Williams et al., 2009; Zoll et al., 2009). The different clusters on the phylogenetic tree of structural and non-structural genes have been clearly shown in a previous study (Calvert et al., 2010) which pointed out that recombination had occurred; however, both process and effect of this event in HPeV have remained unclear.

Table 1
Summary of HPeV positive samples.

Samples code	Samples type	Age	Sex	Other virus	HPeV type	3Dpol clade
CU-B402	Fecal	6 Mo	F	Negative	1B	J
CU-B408	Fecal	3 Mo	M	Positive Rota	1B	J
CU-B433	Fecal	1 Yr	F	Negative	1B	BA
CU-B463	Fecal	5 Mo	M	Positive Rota	1B	Z
CU-B478	Fecal	6 Mo	F	Negative	1B	O*
CU-B486	Fecal	11 Mo	F	Negative	5	BA
CU-B500	Fecal	12 Yr	M	Negative	1B	O*
CU-B579	Fecal	2 Mo	F	Positive Rota	1B	J
CU-B580	Fecal	9 Mo	F	Negative	1B	J
CU-B587	Fecal	11 Mo	M	Negative	1B	J
CU-B588	Fecal	3 Mo	F	Negative	1B	J
CU-B595	Fecal	10 Mo	F	Negative	1B	J
CU-B596	Fecal	11 Mo	M	Negative	1B	J
CU-B606	Fecal	NS	NS	Positive Rota	5	AE'
CU-B615	Fecal	NS	NS	Positive Rota	1B	AE'
CU-B628	Fecal	1 Yr	F	Negative	1B	BA
CU-B636	Fecal	1 Yr	M	Negative	1B	O*
CU-B685	Fecal	1 Yr	F	Negative	3	W
CU-B688	Fecal	3 Mo	M	Negative	1B	BA
CU-B705	Fecal	6 Mo	M	Negative	4	Y
CU-B711	Fecal	1 Yr	M	Positive Rota	1A	K'
CU-B806	Fecal	10 Mo	F	Negative	1B	BA
CU-B811	Fecal	7 Mo	M	Positive Rota	1B	J
CU-B812	Fecal	11 Mo	M	Positive Rota	6	BD
CU-B825	Fecal	6 Mo	F	Positive Rota	1A	BA
CU-B846	Fecal	1 Yr	M	Negative	1B	W
CU-B847	Fecal	1 Yr	F	Negative	2	BC'
CU-B850	Fecal	5 Mo	M	Negative	2	BC'
CU-B851	Fecal	6 Mo	M	Negative	1B	BA
CU-B852	Fecal	5 Mo	M	Negative	2	BC'
CU-B865	Fecal	5 Mo	M	Negative	2	BC'
CU-B867	Fecal	1 Yr	F	Negative	2	BC'
CU-B868	Fecal	9 Mo	M	Negative	1B	J
CU-B869	Fecal	10 Mo	M	Negative	6	BD
CU-B874	Fecal	1 Yr	F	Negative	6	BD
CU-B903	Fecal	6 Mo	M	Negative	1B	G'
CU-B961	Fecal	6 Mo	M	Positive Rota	14	BD
CU-B984	Fecal	1 Yr	M	Negative	6	AB'
CU-B1002	Fecal	1 Yr	M	Positive Rota	1B	BA
CU-B1009	Fecal	10 Mo	F	Positive Rota	6	BD
CU-B1046	Fecal	1 Yr	M	Positive Rota	6	BD
CU-B1050	Fecal	1 Yr	M	Positive Rota	6	BD
CU-B1055	Fecal	9 Mo	M	Positive Rota	6	BD
CU-B1064	Fecal	10 Mo	M	Positive Rota	6	BD
CU-B1091	Fecal	8 Mo	M	Negative	14	AB'
CU-B1154	Fecal	16 Yr	F	Negative	1B	J
CU-H403	NP sawab	NS	F	Negative	1B	O*
CU-H2107	NP sawab	NS	F	Positive H3	1A	AN
CU-H2108	NP sawab	NS	M	Negative	4	AN
CU-H2159	NP sawab	NS	F	Negative	6	BD
CU-H2779	NP sawab	49 Yr	F	Negative	6	BD
CU-C315	NP sawab	9 Mo	F	Negative	1B	Z
CU-C534	NP sawab	2 Yr	F	Negative	6	BD
CU-C561	NP sawab	2 Yr	F	Negative	1B	Z
CU-C724	NP sawab	7 Yr	F	Negative	10	K'
CU-C763	NP sawab	2 Yr	M	Negative	6	BD
CU-C936	NP sawab	1 Yr	M	Negative	6	BD
CU-C1204	NP sawab	3 Yr	F	Negative	6	BD

Abbreviation: Mo; Month, Yr; Year, NS; Not specify.

* The new 3Dpol clade defined in this study.

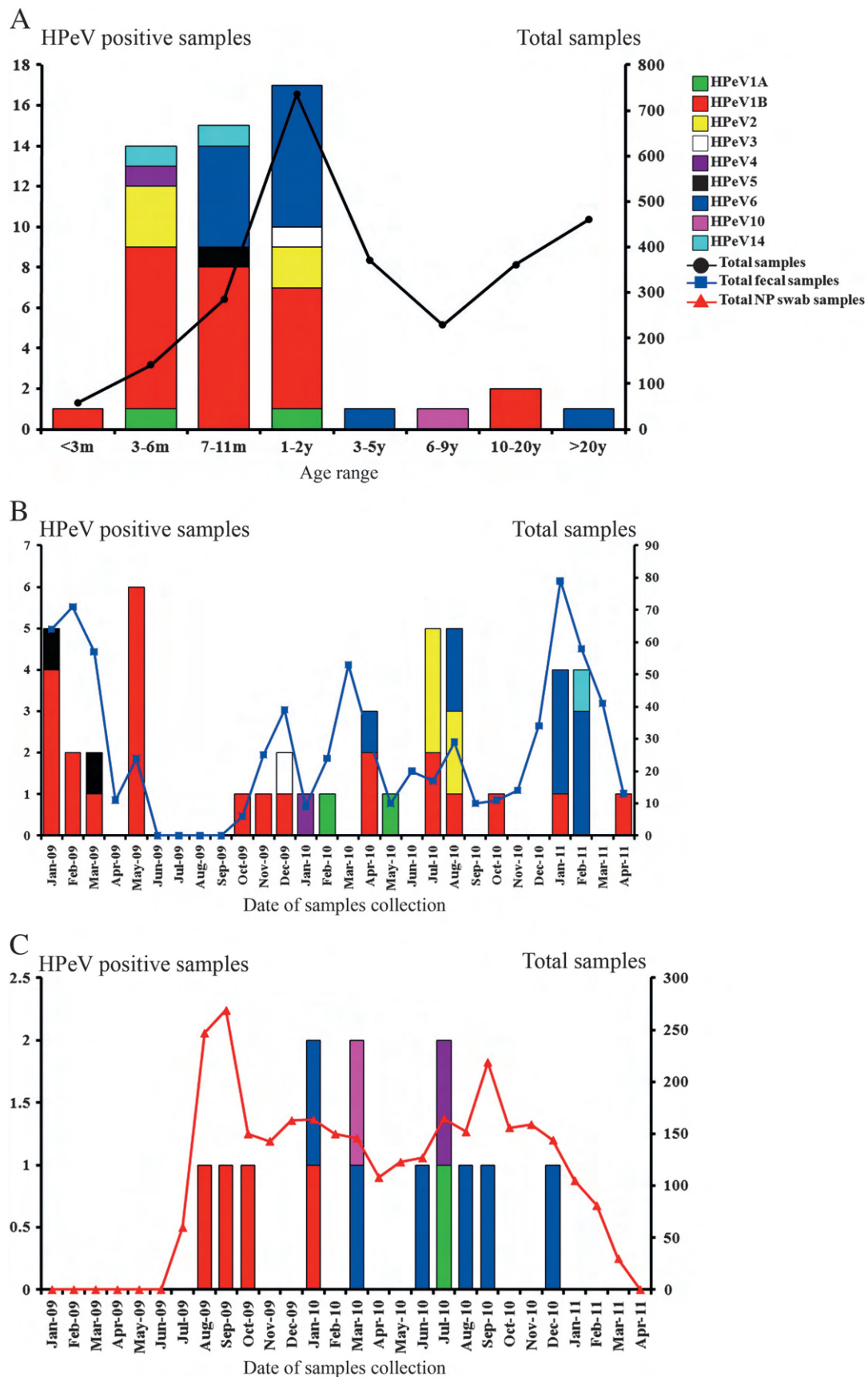


Fig. 1. Age distribution (A) and collection period of fecal (B) and NP swab (C) samples. The positive HPeV samples are shown as relative percentage of all samples collected.

In this study, we investigated the molecular epidemiology of HPeV in respiratory and fecal samples collected in different parts of Thailand from Jan 2009–Jan 2011 by using RT-PCR to amplify the highly conserved region of the 5'UTR. Subsequently, the positive samples were further characterized and the phylogenetic tree of the structural genes (VP3/VP1) was constructed. Moreover, the recombination event of HPeV has also been detected upon combined analysis of the phylogenetic trees of both structural and non-structural genes.

Result

Study group and epidemiology of HPeV

A total of 3716 samples were sent for influenza virus (nasopharyngeal swab) and Rota virus (stool specimens) detection (1868 females, 1833 males, and 15 with incomplete data as to their gender). All samples had been collected during the period from 2009 to 2011. Of those, 2957 NP were from 2822 individual patients whose age ranged 1 day to 90 years. All NP swabs were taken from patients who presented with influenza like-illness in the out-patient departments of two different rural hospitals. An additional 759 fecal samples were taken from 715 different individuals aged between 1 day and 24 years, who presented with acute diarrhea and sent for Rota virus detection.

Routine screening for influenza and Rota virus was accomplished by the in-house developed multiplex one-step real-time RT-PCR using TaqMan probes (Suwannakarn et al., 2008) and one-step RT-PCR (Theamboonlers et al., 2002), respectively. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH), the human housekeeping gene, served as an indicator for successful RNA extraction and subsequently, as an RT reaction control. This gene could be amplified in all samples (data not shown). Screening NP samples for influenza virus showed 25(0.9%) samples positive for influenza B virus, 343 samples (11.6%) positive for influenza A virus 2009 pandemic strain subtype H1, 115 samples (3.9%) were positive for influenza A virus subtype H3, and 32 samples were positive for influenza A virus whose subtype could not be classified (1.1%). Rota virus was detected in 348 fecal samples (45.9%).

Screening for HPeV was performed by using a very sensitive nested RT-PCR with the primer pair sequences retrieved from the highly conserved region of the 5'UTR for all HPeV types (Harvala et al., 2008). HPeV was thus detected in 58 out of altogether 3716 samples (1.6%) of which 46 samples were fecal samples (6.1% of fecal samples) and 12 samples were NP swab samples (0.4% of NP swab samples). The details of these 58 samples are shown in Table 1. The rate of HPeV detection did not differ between males and females. Moreover, simultaneous infection with Rota virus was detected in 16 fecal samples accounting for 34.8% of the positive stools (Table 1). One NP swab sample showed simultaneous infection with influenza A virus subtype H3 and HPeV (Table 1). The age of patients diagnosed with HPeV infection in this study ranged from 2 months to 49 years (Table 1.) however, infection was most prevalent among infants between 3 months and 1 year of age (Fig. 1A).

Typing of HPeV

For typing, all samples positive for the 5'UTR of HPeV were subjected to partial amplification of VP3/VP1 by using a highly sensitive one-step nested RT-PCR method which had proven successful for typing as described previously (Calvert et al., 2010). All 58 samples positive for the 5'UTR were subsequently subjected to direct sequencing.

The phylogenetic tree shown in Fig. 2A demonstrates that the strains detected could be identified as HPeV 1A in three samples and as HPeV1B in 27 samples. Of those 27, one sample (CU-B628) was highly divergent from the rest of the group and clustered in its own clade (Fig. 2A). The divergence of CU-B628 amounted to 24% upon comparison with the Harris strain and to 18% when compared with the remaining HPeV1B clade. Furthermore, 5 samples could be identified as HPeV2; 1 sample as HPeV3; 2 samples as HPeV4; 2 samples as HPeV5; 15 samples as HPeV6; 1 sample as HPeV10 and 2 samples as HPeV14 (Table 1). All strains investigated in this study showed the majority clustered with the previously published sequences from Thailand (Fig. 2A).

The virus types identified from fecal samples were highly diverse and included HPeV1A, HPeV1B, HPeV2, HPeV3, HPeV4, HPeV5, HPeV6, and HPeV14 (Table 1 and Fig. 1B). In contrast, virus genotypes isolated from NP swab samples showed less diversity. The five genotypes identified were HPeV1A, HPeV1B, HPeV4, HPeV6 and HPeV10 (Table 1 and Fig. 1C).

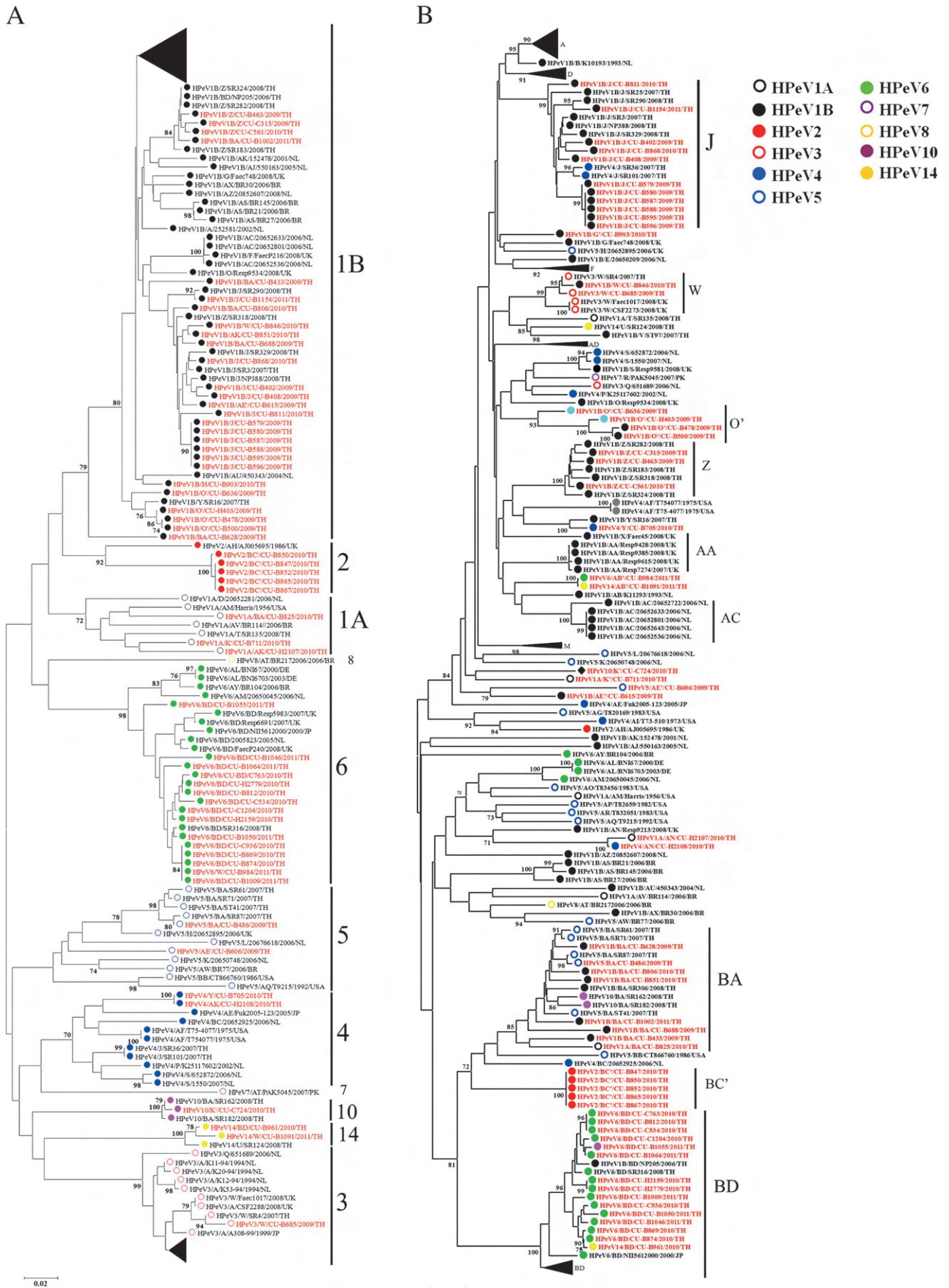
In this study, the majority of patients infected with HPeV were under 2 years of age. The most predominant genotype identified from this study, HPeV1B, was detected in patients below the age of 2 years except for one sample obtained from a 16-year-old girl (Table 1 and Fig. 1A). In contrast, HPeV6 was detected in a slightly higher age group when compared with HPeV1B. However, this difference between age groups was not statistically significant (p value = 0.302 with α level = 0.05). HPeV6 was predominantly detected in children between 7 months and 5 years of age (Table 1 and Fig. 1A). Interestingly, one fecal sample collected from a 49-year-old patient was positive for HPeV6 (Table 1 and Fig. 1A). The new types, HPeV10 and HPeV14, were identified in one NP swab sample taken from a 7-year-old girl and two fecal samples taken from two boys aged 6 months and 8 months, respectively (Fig. 1A and Table 1). HPeV1A and HPeV2 could be identified in two patient age groups, which were 3–6 months and 1–2 years (Fig. 1A). HPeV3, HPeV4 and HPeV5, had been isolated from patients of 1–2 years, 3–6 months, and 7–12 months of age, respectively (Fig. 1A and Table 1).

HPeV monthly distribution in fecal samples and NP swab is shown in Fig. 1B and C, respectively. HPeV1A could be isolated in February and May 2010 from fecal samples and July 2010 from NP swab samples (Fig. 1B and C). HPeV1B distribution in fecal samples does not seem restricted to a specific timeframe because it could be detected throughout the study period (Fig. 1B). On the other hand, in NP swab samples, HPeV1B could be detected during the first half of the study period and was then substituted by HPeV6 (Fig. 1C). HPeV2 could only be detected in stool and for a short time during the study period (July–August 2010). One strain identified as HPeV3 was isolated from a fecal sample collected in December 2009 (Fig. 1B). HPeV4 was detected in a fecal sample collected in January 2010 and an NP swab sample collected in July 2010 (Fig. 1B and C). Interestingly, HPeV5 was only detected at the very beginning of the study (January and March 2009) and subsequently disappeared (Fig. 1B). The new types, HPeV10 and HPeV14, were detected in March 2010 (Fig. 1C) and February 2011 (Fig. 1B), respectively.

VP1 divergence

The substitution rate in the partial VP3/VP1 gene of all HPeV genotypes was 3.02×10^{-3} nucleotides per site per year (with 2.29×10^{-3} – 3.83×10^{-3} as highest posterior density; HPD, interval). Information on virus sequences of genotypes 1A, 2, 4, 5, and 7–16 is limited. Therefore, the nucleotide change rate could only be

Fig. 2. Phylogenetic tree of partial VP3/VP1 (A) and 3Dpol gene (B). Each branch was labeled as genotype/3D clade/strain name/year of collection/origin country. The different colors represent the different HPeV genotypes which were classified based on the cluster on the phylogenetic tree of the VP3/VP1 gene (A). The samples from this study are indicated as red letters on each branch of the tree. Only the bootstrap with over 70 were shown in phylogenetic tree and the large clades that the study samples did not appeared were collapsed and shown as the black triangle in the tree.



investigated in the three genotypes of HPeV1B, HPeV3 and HPeV6. The result shown in Table 2 indicates that these three genotypes were in a neutral selection condition based on the ratio of non-synonymous change per site to synonymous change per site (d_N/d_S). In this study, the substitution rate of HPeV1B amounted to 9.11×10^{-3} substitutions per site per year exceeding by more than 3 times that of HPeV3 and by nearly 2 times that of HPeV6 with 3.03×10^{-3} and 5.10×10^{-3} , respectively (Table 2).

Recombination event of HPeV

Together with the structural gene, the non-structural 3D gene at the 3' end of the virus genome responsible for RdRp activity was used to investigate the recombination event (Calvert et al., 2010). The specific 3D gene primer sets were incorporated into a one-step nested RT-PCR method described elsewhere (Calvert et al., 2010). All HPeV positive samples with successful amplification of the 5'UTR and VP3/VP1 were also subjected to this 3D amplification and direct sequencing. The phylogenetic tree of the 3D gene is shown in Fig. 2B and the specific clade assigned for each HPeV positive sample is shown in Table 1. Interestingly, the high divergence rate ranged from 6.2% to 16.1% when compared with the nearest clade on the phylogenetic tree of 3Dpol gene was shown in sixteen strains of viruses identified in this study (Supplement Table S2). As defined in a previous study, the 5.5% divergence from each other was shown as the cut off for a different 3Dpol gene clade assignment (Calvert et al., 2010). Therefore, based on this demarcation, we could identify 6 additional 3Dpol clades. The samples identified in newly assigned clades of 3Dpol are shown in Table 1 and Fig. 2B. For recombination analysis, the discordant grouping based on the 3Dpol gene of the genotype characterized by the VP3/VP1 gene phylogeny is indicative of recombination (Calvert et al., 2010). Therefore, in this study recombination was detected in 16 samples including 3 strains of HPeV1A (CU-B711, CU-B825 and CU-H2107); 7 of HPeV1B (CU-B433, CU-B615, CU-B688, CU-B806, CU-B846, CU-B851, and CU-B1002); 2 of HPeV4 (CU-B705 and CU-H2018); 1 of HPeV5 (CU-B606); 1 of HPeV6 (CU-B984) and 2 of HPeV14 (CU-B961 and CU-B1091). The most frequently recombination event was shown in HPeV1B in which could be classified into 3 clades of 3Dpol including BA, AE' and W (Table 1). The 3Dpol clades that were assigned to the remaining recombination strains are shown in Table 1. The recombination detection rate is 27.6%, this may be underlining the detection rates which based on samples and children.

Discussion

Molecular epidemiology

Until recently, based on their genomic sequences, 16 genotypes of virus have been discovered and subsequent studies have shown that the different genotypes of virus cloud provide the different diseases, for example, HPeV1 is associated with diseases of the GI tract and HPeV3 is closely related with sepsis and encephalitis in neonates (Abed and Boivin, 2006; Boivin et al., 2005; Harvala et al., 2009). Epidemiology of HPeV is required to further our understanding of disease causation and possibly, geographic distribution of the virus.

Recently, molecular techniques were used for detection and genotype classification. For screening, nested RT-PCR with a primer pair

specific for the conserved region of the 5'UTR was applied. The result showed that 1.6% of samples (58 of 3716 samples) were positive for HPeV with more than one third originating from the GI tract (feces = 46; 6.1%, NP swab = 12; 0.4%) (Table 1). The percentage of positive samples in this study was lower than in the previous report, 1.2% of respiratory samples (Harvala et al., 2008) and 16.3% of fecal samples (Benschop et al., 2008b). However, the molecular epidemiology data presented in this study was based on the number of samples rather than the number of patients which might account for the lower detection rate. The difference in virus detection rate may well be due to the specific year of sample collection and geographic location. Interestingly, the study of Pham et al. conducted in 2010 which included stool samples negative for human rotavirus from the northern part of Thailand showed 14.6% positive for HPeV. In another way, if the positive samples of human rotavirus were excluded in this study, the percentage of HPeV positive (11.2%) stool samples has shown a similar range as the study of Pham et al. in 2010.

As reported by previous studies, the majority of HPeV positive samples originated from patients below the age of 2 years with the highest rate shown among 3 month-to-1-year olds (Fig. 1A). HPeV1B is the most prevalent genotype in samples collected from children, whereas HPeV6 seems to infect older patients (Fig. 1A). However, a larger number of samples positive for other genotypes should be considered for future analysis to further our understanding of age distribution for this virus. Interestingly, in this study, HPeV was detected in three patients above 10 years of age. It is unusual to detect HPeV in adults but a few studies have reported HPeV detection in over 10-year-olds (Abed and Boivin, 2006; Figueroa et al., 1989; Li et al., 2009; Tapia et al., 2008). Therefore, this provides additional evidence of HPeV infection in patients above the age of 10 years. Unfortunately, since the samples included in this study were anonymous, further information on these three patients as for example, any underlying disease could not be obtained. (Table 1).

The cycle of HPeV infection, occurring twice per year, in summer (April to June) and winter (December to February), has been shown in this study (Fig. 1B and C). The same seasonal occurrence of HPeV infection has been reported by Harvala et al. (2008) in Scotland. In our study had identified the only one sample that defined as HPeV3 during the winter season. As same as previously reported, HPeV3 could be identified in the winter season (Abed and Boivin, 2006; Harvala et al., 2009). However, the HPeV3 was detected during the summer season had also been reported (Benschop et al., 2006b). In this study, two types of HPeV, HPeV1 and HPeV6, were predominant in respiratory samples. This is in agreement with the data presented by Havala et al. in 2008 (Fig. 1C). In contrast, in fecal samples, only HPeV1B was predominant and spread throughout the study period (Fig. 1B). In addition, HPeV2 was frequently identified in our study, while this type of virus has not been detected in any other recent study (Benschop et al., 2008b; Harvala et al., 2008). Additional epidemiology studies might provide further understanding of unusual or new types of HPeV.

Typing, recombination and evolution of HPeV

Based on the phylogeny of the VP3/VP1 gene, a profound diversity of HPeV genotypes was found in this study with the eight genotypes 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6 and two newly recently identified genotypes, 10 and 14, classified (Fig. 2A). Genotype 1B was predominant and upon comparison between the 6 different lineages as showed multiple variations in Fig. 2A. Interestingly, CU-B628 was separate in its own clade on the phylogenetic tree of the VP3/VP1 gene and the divergence was equal to 24% when compared with the Harris strain. Since the divergence for new genotype assignment has to exceed 25%, unfortunately, this CU-B628 had still been assigned to genotype 1B. Although these characteristics are insufficient to assign a new genotype to this strain, its variety should be addressed. The viruses identified from this study

Table 2
Estimate of sequence rate change of HPeV1B, 3, and 6.

HPeV type	Distance*	d_N/d_S *	Substitution rate ($\times 10^{-3}$)	MRCA
1B	0.1000	0.0099	9.11 (5.14–13.36)	1985 (1978–1991)
3	0.0346	0.0181	3.03 (1.57–4.49)	1990 (1985–1995)
6	0.0607	0.0334	5.10 (2.32–8.24)	1994 (1987–1999)

* Calculated by using maximum composite likelihood as the substitution model.

were grouped together on the phylogenetic tree of VP3/VP1 gene and also clustered with viruses previously reported from Thailand (Fig. 2A). This indicates a geographically specific common determinant that appears to be found on this VP3/VP1 phylogenetic tree of HPeV. Moreover, difference of the HPeV genotype could be detected in children below 2 years of age.

Altogether, the genotypes have not evolved quite as rapidly as the substitution rate calculated by BEAST suggested (3.02×10^{-3} substitutions per site per year) which was slightly higher than that previously proposed for the VP1 gene (Faria et al., 2009). However, along with phylogenetic analysis, a vast difference in substitution rate was shown among different genotypes of virus (Table 2). Incorporation of much more samples used for the calculation may be the reason why the evolution rate in this study appeared slightly higher than that previously estimated (Calvert et al., 2010). Similarly, the d_N/d_S calculated from this study also were slightly higher than previously mentioned by Calvert et al. (2010). In contrast, the MRCA shown in our study (Table 2.) did not show any difference to the previous report (Calvert et al., 2010). Further studies on larger sample sizes will provide further understanding of virus evolution.

Interestingly, as defined in the previous study, more than 5.5% divergence was shown as the cut off for a different 3Dpol gene clade assignment (Calvert et al., 2010). Hence 6 additional new 3Dpol clades could be defined based on our study samples (Table 1.).

Recombination of HPeV had previously been addressed with the recombination breaking points established at the junction between 5'UTR and P1 and the P1 and P2 polyprotein (Benschop et al., 2008a, 2010; Drexler et al., 2011; Williams et al., 2009; Zoll et al., 2009). Despite the phylogenetic analysis comparison between structural and non-structural genes such as the 3Dpol gene was successfully used to investigate recombination (Calvert et al., 2010). The discordance cluster in the 3Dpol gene when compared with the VP3/VP1 gene phylogenetic tree proves that recombination in the virus genome has occurred (Calvert et al., 2010). Most of the samples from our study were classified as the same clade for 3Dpol phylogenetic tree as the reported in Thai samples that reported by Calvert et al. (2010) (Table 1). Sixteen samples (27.6%) showed discordance between two genetic regions on the phylogenetic tree (Fig. 2) serving as evidence for recombination from this study. HPeV1B was the predominant genotype with a recombination frequency of 27%. This study was in agreement with previous research emphasizing the high recombination frequency of HPeV type 1B (Calvert et al., 2010). In contrast, HPeV6 exhibited less recombination frequency (6%) with only one sample identified (CU-B984, Fig. 2.). Other genotypes including HPeV1A, HPeV4, HPeV5, and HPeV14 had also undergone recombination (Fig. 2.), however, the frequency of recombination had not been done due to the small identification numbers from the study. HPeV3 isolated from this study clustered in the correlated phylogenetic tree clade with both VP3/VP1 and 3Dpol genes when compared to the previous report (Fig. 2.) (Calvert et al., 2010). Therefore, the recombination might not have been detectable in this study. The underlying factors or mechanisms for the recombination event are still unclear and should be addressed by further investigation.

In conclusion, although HPeV has been discovered a long time ago, its biology, epidemiology, evolution and pathogenicity are still unclear. Therefore, ongoing molecular research will further our understanding of this virus which can also be applied to other related viruses.

Method

Clinical samples

The nasopharyngeal (NP) swabs were collected from patients presenting with influenza-like illness. A total of 2957 of NP swab samples were collected between July 14, 2009 and March 9, 2011. All samples were sent from local hospitals including; 1703 samples from Chumphae

hospital, Chumphae district, Khonkaen province, 1254 samples from Thungsong hospital, Thungsong district, Nakorn Sri Thammarat province. Samples were kept in transport media which contain phosphate-buffered saline (PBS) with antibiotics (2×10^6 U/l of penicillin G and 200 mg/l of streptomycin). All were kept on ice then sent to Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the routine screening. Samples were processed immediately upon arrival, the remaining were kept at -70°C for further use.

Fecal samples were sent to our center for Human Rota virus routine screening. A total of 715 fecal samples had been collected in the 2-year period of January 7, 2009 to April 18, 2011. Of those, 12 samples were sent from Umphang hospital, Umphang district, Tak province; 597 samples from Chumphae hospital, Chumphae district, Khonkaen province and 150 samples from King Chulalongkorn Memorial hospital, Bangkok. Upon arrival, fecal samples were diluted 1:10 with PBS, thoroughly mixed on a vortex and centrifuged at 8000 rpm. Supernatants were collected and stored at -70°C until further use.

RNA extraction and HPeV detection

All samples were subjected to RNA extraction by conventional GTC-phenol-chloroform method performed on 200 μl each of clinical samples. The extracted RNA was stored at -70°C until used.

All extracted RNA was subjected to reverse transcription into cDNA using the ImProm-II™ Reverse Transcription system (Promega, Madison, WI). Reverse transcription (RT) was performed by following the manufacturer's specifications and a random hexamer primer was used for the RT step. cDNA was stored at -20°C until used.

Nested-PCR for HPeV detection was modified from a previous study (Harvala et al., 2010). The PerfectTaq Plus MasterMix (5 PRIME, Darmstadt, Germany) was used as the amplification mixture. The predicted positive result was shown as a single band of 243 bp when visualized under UV light after 2% agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromine.

Partial VP3/VP1 and 3Dpol gene amplification

For HPeV characterization, the samples positive for the 5'UTR were subjected to nested PCR to amplify the VP3/VP1 junction for HPeV typing as previously described (Harvala et al., 2010). The expected PCR product was 304 bp when virtualized under UV light after 2% agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromine.

The partial 3Dpol gene was amplified by nested PCR modified from a previous report (Calvert et al., 2010). The expected second round PCR product of 700 bp was virtualized under UV light after 2% agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromine.

All VP3/VP1 and 3Dpol positive amplicons were purified by using Agarose GelExtract Mini Kit (5 PRIME, Darmstadt, Germany). Direct sequencing was performed under 1st BASE DNA Sequencing Services (1st BASE Laboratories, Malaysia). Sequencing results were annotated, aligned, and managed by using combination of software including Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Simmonics version 1.7 (www.virus-evolution.org), Chromas Lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), and BioEdit version 7.0.4.1 (Hall, 1999).

Molecular and evolution analysis

All study sequences had been submitted to GenBank data base. The accession number that included in this study was show in Supplement Table (S1). Phylogenetic trees were constructed by using MEGA 4 software (Tamura et al., 2007) in which neighbor-joining method with 1000 replication for bootstrapping was implemented. Trees contracted under maximum-composite-likelihood (MCL) as

distances model and using pairwise deletion as gap/missing data processing. The nucleotide substitution rate and most recently common ancestor (MRCA) were achieved by using Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST) software version 1.6 (Drummond and Rambaut, 2007). The relaxed clock-uncorrelated exponential with 10 million chains was run under GTR with gamma distribution substitution model. The data from BEAST were analyzed by TACER program (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tacer>).

Ethical consideration

All samples that were included in this study were sent for routine diagnosis in our center. The personal data such as name and HN did not appear in any part of the document in this study. All samples were taken with permission from the Director of Chulalongkorn King Memorial hospital. Moreover, the study was conducted after the approval of the Ethics Committee of the Faculty of Medicines, Chulalongkorn University (IRB No.086/53).

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.virol.2011.09.021](https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.021).

Acknowledgment

We would like to express our gratitude for the support from the Grant for New Researcher, Thailand Research Fund (TRG5380019); Post-doctoral of Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University; Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (HR1155A); Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University; King Chulalongkorn Memorial Hospital Fund, King Chulalongkorn Memorial Hospital and the Outstanding Professor Research Fund, Thailand Research Fund. We also would like to thank Ms.Ornwanal Maiklang for providing human rotavirus detection result in fecal achieves and Ms. Petra Hirsch for reviewing the manuscript.

References

Abed, Y., Boivin, G., 2006. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 969–975.

Benschop, K.S., Schinkel, J., Luken, M.E., van den Broek, P.J., Beersma, M.F., Menelik, N., van Eijk, H.W., Zaaijer, H.L., VandenBroucke-Grauls, C.M., Beld, M.G., Wolthers, K.C., 2006a. Fourth human parechovirus serotype. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1572–1575.

Benschop, K.S., Schinkel, J., Minnaar, R.P., Pajkrt, D., Spanjerberg, L., Kraakman, H.C., Berkhout, B., Zaaijer, H.L., Beld, M.G., Wolthers, K.C., 2006b. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin. Infect. Dis.* 42, 204–210.

Benschop, K., Thomas, X., Serpenti, C., Molenkamp, R., Wolthers, K., 2008a. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3965–3970.

Benschop, K.S., Williams, C.H., Wolthers, K.C., Stanway, G., Simmonds, P., 2008b. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *J. Gen. Virol.* 89, 1030–1035.

Benschop, K.S., de Vries, M., Minnaar, R.P., Stanway, G., van der Hoek, L., Wolthers, K.C., Simmonds, P., 2010. Comprehensive full-length sequence analyses of human parechoviruses: diversity and recombination. *J. Gen. Virol.* 91, 145–154.

Boivin, G., Abed, Y., Boucher, F.D., 2005. Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 103–105.

Calvert, J., Chieochansin, T., Benschop, K.S., McWilliam, Leitch, E.C., Drexler, J.F., Grywna, K., da Costa, Ribeiro, H. Jr., Drosten, C., Harvala, H., Poovorawan, Y., Wolthers, K.C., Simmonds, P., 2010. Recombination dynamics of human parechoviruses: investigation of type-specific differences in frequency and epidemiological correlates. *J. Gen. Virol.* 91, 1229–1238.

Drexler, J.F., Grywna, K., Stöcker, A., Almeida, P.S., Medrado-Ribeiro, T.C., Eschbach-Bludau, M., Petersen, N., da Costa-Ribeiro-Jr, H., Drosten, C., 2009. Novel human parechovirus from Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 310–313.

Drexler, J.F., Grywna, K., Lukashev, A., Stöcker, A., Almeida, P.S., Wiese, J., Ribeiro, T.C., Petersen, N., Ribeiro, H., Belakov, I., Kümmerer, B.M., Drosten, C., 2011. Full genome sequence analysis of parechoviruses from Brazil reveals geographical patterns in the evolution of non-structural genes and intratypic recombination in the capsid region. *J. Gen. Virol.* 92, 564–571.

Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.

Faria, N.R., de Vries, M., van Hemert, F.J., Benschop, K., van der Hoek, L., 2009. Rooting human parechovirus evolution in time. *BMC Evol. Biol.* 9, 164.

Figueroa, J.P., Ashley, D., King, D., Hull, B., 1989. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J. Med. Virol.* 29, 315–319.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.

Harvala, H., Simmonds, P., 2009. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J. Clin. Virol.* 45, 1–9.

Harvala, H., Robertson, I., McWilliam, Leitch, E.C., Benschop, K., Wolthers, K.C., Templeton, K., Simmonds, P., 2008. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3446–3453.

Harvala, H., Robertson, I., Chieochansin, T., McWilliam, Leitch, E.C., Templeton, K., Simmonds, P., 2009. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. *J. Infect. Dis.* 199, 1753–1760.

Harvala, H., Wolthers, K.C., Simmonds, P., 2010. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23, 224–230.

Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Takeda, N., Sakae, K., 2004. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J. Gen. Virol.* 85, 391–398.

Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Kabashima, Y., Hasegawa, A., Nagaya, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, S., Fujiura, A., Sakae, K., Minagawa, H., 2010. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2683–2688.

Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A., 2006. Enterovirus surveillance : United States. *MMWR Surveill. Summ.* 55, 1–20.

Li, L., Victoria, J., Kapoor, A., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M.M., Angez, M., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2009. Genomic characterization of novel human parechovirus type. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 288–291.

Oberste, M.S., Maher, K., Pallansch, M.A., 1998. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res.* 56, 217–223.

Pham, N.T., Trinh, Q.D., Khamrin, P., Maneekarn, N., Shimizu, H., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H., 2010. Diversity of human parechoviruses isolated from stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 48, 115–119.

Stanway, G., Hyypia, T., 1999. Parechoviruses. *J. Virol.* 73, 5249–5254.

Stanway, G., Kalkkinen, N., Roivainen, M., Ghazi, F., Khan, M., Smyth, M., Meurman, O., Hyypia, T., 1994. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J. Virol.* 68, 8232–8238.

Suwannakarn, K., Payungporn, S., Chieochansin, T., Samransamruajkit, R., Amonsin, A., Songserm, T., Chaisingh, A., Chamnanpood, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., 2008. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *J. Virol. Methods* 152, 25–31.

Tapia, G., Cinek, O., Witsø, E., Kulich, M., Rasmussen, T., Grinde, B., Rønningen, K.S., 2008. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *J. Med. Virol.* 80, 1835–1842.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596–1599.

Tauriainen, S., Martiskainen, M., Oikarinen, S., Lönnrot, M., Viskari, H., Ilonen, J., Simell, O., Knap, M., Hyöty, H., 2007. Human parechovirus 1 infections in young children – no association with type 1 diabetes. *J. Med. Virol.* 79, 457–462.

Theamboonlers, A., Veravigrom, M., Yambangyang, O., Trairatvorakul, P., Chongsrisawat, V., Poovorawan, Y., 2002. The incidence of rotavirus A isolates of G genotype in Thailand in 2002–2004. *Acta Virol.* 49, 111–115.

Verboon-Macielek, M.A., Krediet, T.G., Gerards, L.J., Fleer, A., van Loon, T.M., 2005. Clinical and epidemiologic characteristics of viral infections in a neonatal intensive care unit during a 12-year period. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 901–904.

Watanabe, K., Oie, M., Higuchi, M., Nishikawa, M., Fujii, M., 2007. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis.* 13, 889–895.

Wigand, R., Sabin, A.B., 1961. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 11, 224–247.

Williams, C.H., Panayiotou, M., Girling, G.D., Peard, C.I., Oikarinen, S., Hyöty, H., Stanway, G., 2009. Evolution and conservation in human parechovirus genomes. *J. Gen. Virol.* 90, 1702–1712.

Zhang, D.L., Jin, Y., Li, D.D., Cheng, W.X., Xu, Z.Q., Yu, J.M., Jin, M., Yang, S.H., Zhang, Q., Cui, S.X., Liu, N., Duan, Z.J., 2010. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1563–1569.

Zhong, H., Lin, Y., Sun, J., Su, L., Cao, L., Yang, Y., Xu, J., 2011. Prevalence and genotypes of human parechovirus in stool samples from hospitalized children in Shanghai, China, 2008 and 2009. *J. Med. Virol.* 83, 1428–1434.

Zoll, J., Galama, J.M., van Kuppeveld, F.J., 2009. Identification of potential recombination breakpoints in human parechoviruses. *J. Virol.* 83, 3379–3383.