การตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุลของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ วิธีอีไลซ่า และเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์

นางสาว แพรวพิไล ตัณฑุลาวัฒน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS BY RAPID TEST, ELISA AND RT – PCR

Miss Praewpilai Tontulawat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุลของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ วิธีอีไลซ่า และเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์
โดย	นางสาว แพรวพิไล ตัณฑุลาวัฒน์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สัญชัย พยุงกร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.ณัฐนันท์ ปัญจวรญาณ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แพรวพิไล ตัณฑุลาวัฒน์ : การตรวจวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุลของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ วิธีอีไลซ่า และเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์.

(Molecular characterization and Diagnosis of Dengue virus by Rapid test, ELISA and RT – PCR) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, 70 หน้า.

ไวรัสเดงกี่ (Dengue virus; DENV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก โดยมียุงเป็นพาหะ ผู้ป่วยจะมีอาการทางคลินิกที่หลากหลายตั้งแต่ไม่แสดงอาการไปจนถึงขั้นช็อกและเสียชีวิต ซึ่งความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปขึ้นกับระยะเวลาของการติดเชื้อ ดังนั้น หากมีการตรวจวินิจฉัยแล้วทราบว่า ผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ตั้งแต่ระยะแรก ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาและช่วยป้องกันไม่ให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี Rapid Test เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยทั้งหมด 329 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Single specimen 237 ตัวอย่างและ Paired specimen 92 ตัวอย่าง จากผลการตรวจสอบพบว่า วิธี NS1 Rapid Test และเทคนิค RT-PCR จะตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกมากในระยะ Acute febrile phase ส่วนวิธี IgM/IgG Rapid Test และวิธี IgM/IgG ELISA จะตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกมากในระยะ Convalescence phase เมื่อนำไปตรวจสอบประสิทธิภาพและความแม่นยำของชุดทดสอบ NS1 และ IgM Rapid Test พบว่า มีความไว 70.6% และ 75.6% ส่วนความจำเพาะมีค่าสูงถึง 73.4% และ 97.1% ตามลำดับ แต่เมื่อนำผลของวิธี NS1 และ IgM Rapid Test มาวิเคราะห์ร่วมกัน จะได้ผลของการตรวจวินิจฉัยเพิ่มสูงขึ้น จึงทำให้ทราบว่าวิธี NS1 และ IgM Rapid Test เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ให้ผลเร็ว สามารถตรวจสอบได้ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง นอกจากนี้ ในงานวิจัยยังมีการศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค semi-nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 ผลที่ได้ คือ สามารถจำแนกเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ 4 สายพันธุ์ (DENV 1 – 4) ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1 (31.5%), สายพันธุ์ที่ 2 (12%), สายพันธุ์ที่ 3 (26.9%) และสายพันธุ์ที่ 4 (29.6%) ดังนั้น ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงสามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการวางแผนและติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ในปีต่อๆ ไปได้

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต....แพรวพิไล ตัณฑุลาวัฒน์.....

สาขาวิชา....ชีวเคมีทางการแพทย์.... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..2553..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5174803330 : MAJOR MIDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: Dengue virus / Diagnosis / Rapid test / ELISA / RT - PCR

PRAEWPILAI TONTULAWAT : MOLECULAR CHARACTERIZATION AND DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS BY RAPID TEST, ELISA AND RT – PCR. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. NUANTIP KAMOLVARIN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, Ph.D., 70 pp.

Dengue virus (DENV) infection is one of the most important arthropod-borne viral diseases which differing severity based on time of contraction. DENV causes various clinical symptoms ranging from asymptomatic or undifferentiated fever, known as dengue fever (DF), to fever with plasma leakage called dengue hemorrhagic fever (DHF). Some cases present as an even more serious form called dengue shock syndrome (DSS), leading to death. The objective of this study was to evaluate the commercially available rapid dengue NS1 antigen and IgM/IgG antibody immunochromatography test in comparison with the existing laboratory methods such as RT-PCR and Dengue IgM/IgG ELISA for confirmation of DENV infection based on 237 single acute specimens and 92 paired sera. The result of NS1 Rapid Test and RT-PCR showed the highest percentage of detectable NS1 antigen during the acute phase. On the other hand, the result of IgM Rapid Test and IgM ELISA showed the highest percentage of detectable IgM antibody during the convalescence phase. The NS1 and IgM rapid test showed sensitivities of 70.6% and 75.6% respectively, and specificities of 73.4% and 97.1%. Additionally, the combination of NS1 and IgM tests can be utilized to enhance diagnosis. Thus, they are highly appropriate for diagnosis of dengue infection because it is rapid, easily applicable, sensitive and highly specific. Furthermore, this study described the molecular characterization of DENV by semi-nested PCR using designed specific primer on NS5 gene. This specific primer may be used to classify 4 DENV serotypes (DENV 1 - 4) that are 31.5% of DENV 1, 12% of DENV 2, 26.9% of DENV 3 and 29.6% of DENV 4. Therefore, this study can be useful for further study on planning and following DENV serotypes in the following year.

Department :.....Biochemistry..... Student's Signature..Praewpilai Tontulawat

Field of Study :.....Medical Biochemisty..... Advisor's Signature..N. Kamolvarin

Academic Year :.....2010..... Co-Advisor's Signature.....Yong Poo.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลทิพย์ กมลวารินทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ โอกาสในการทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม รวมทั้งได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และ คำแนะนำสำหรับ แก้ไขเนื้อหาใ นโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ และอาจารย์ ดร.สัญชัย พยุงภร รวมถึงคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาทางคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบคุณ กลุ่มนวัตกรรมวิชาการเชิงบูรณาการ โครงการในแผนพัฒนาวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และฝ่ายพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา คลัสเตอร์ สุขภาพ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณบริษัท Standard Diagnostics ในประเทศไทย ที่เอื้อเฟื้อชุดทดสอบ Rapid Test และ ELISA เพื่อใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้งหมดที่ได้ทำการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดาเป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท รวมทั้งให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……. ง

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)…… จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง……..... ฌ

สารบัญภาพ……..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ……..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย……..... 1

คำถามของการวิจัย……..…… 2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..…….. 2

สมมติฐานของการวิจัย……..….. 3

ขอบเขตของการวิจัย……...….. 3

ข้อจำกัดของการวิจัย……..….. 4

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย……..…… 4

คำสำคัญ……..…… 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..…… 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

ประวัติความเป็นมาของเชื้อไวรัสเดงกี่……..…… 6

ไวรัสวิทยาของเชื้อไวรัสเดงกี่……..…... 7

วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสเดงกี่……..…… 10

ลักษณะทางคลินิกของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่……...…… 11

การดำเนินโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่……..... 12

สาเหตุความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่……..……..... 13

เกณฑ์การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก……...…… 13

ความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก……..…….. 14

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ……...…….. 15

หลักการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่…...……...…… 17

การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่…… 20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…… 22
รูปแบบการวิจัย…… 22
ประชากรศึกษา…… 22
วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย…… 22
การเก็บตัวอย่างซีรั่ม…… 25
การตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบ Dengue Duo Rapid Test…… 25
การตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบ Dengue IgA Rapid Test…… 27
การตรวจหา IgM/IgG ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี ELISA …… 28
การสกัด RNA (RNA extraction)…… 29
การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription…… 29
การออกแบบไพรเมอร์ (Primers)…… 30
การตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี RT-PCR…… 31
การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)…… 34
การทำ phylogenetic analysis ในบริเวณยีน NS5 ของสายพันธุ์ไวรัสเดงกี่ที่ตรวจพบ… 36
การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะในบริเวณยีน NS5…… 36
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)…… 39
บทที่ 4 ผลการทดลอง…… 41
ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Single specimens…… 41
ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Paired specimens…… 43
ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบตามวันหลังจากมีไข้…… 47
ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของวิธี Rapid Test…… 48
ผลการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5….. 49
ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree บริเวณยีน NS5 ของเชื้อไวรัสเดงกี่ที่ตรวจพบ……. 50
ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะในบริเวณยีน NS5…… 52
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง…… 55
รายการอ้างอิง…… 59
ภาคผนวก…… 65
ภาคผนวก ก…… 66
ภาคผนวก ข…… 68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…… 70

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	เกณฑ์การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกขององค์การอนามัยโลก……	14
2	แสดงลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ทำ semi-nested PCR บริเวณ 3′UTR ….....	32
3	แสดงลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ทำ nested PCR บริเวณยีน NS1……..……	32
4	แสดงส่วนผสมสารเคมีของการทำ RT-PCR ในบริเวณ 3′UTR และยีน NS1.....	32
5	แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ RT - PCR ในบริเวณ 3′UTR และยีน NS1……	33
6	แสดงลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5…….....	33
7	แสดงส่วนผสมสารเคมีสำหรับการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5……...	34
8	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5……...	34
9	แสดงค่าต่างๆ เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าทาง Diagnostic Test……...	40
10	แสดงค่า Diagnostic Test ของชุดทดสอบ NS1, IgM และ IgG Rapid Test…….	49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พาหะของเชื้อไวรัสเดงกี่……	5
2	การแพร่กระจายทั่วโลกของเชื้อไวรัสเดงกี่……..……....	6
3	ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสเดงกี่…….……	7
4	ลักษณะการเรียงตัวของยีนต่างๆในจีโนมของเชื้อไวรัสเดงกี่…….	8
5	วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสเดงกี่…….	10
6	ลักษณะอาการของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่…….……...	12
7	หลักการ ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดี IgM/IgG……	17
8	ตัวอย่างชุดทดสอบ Rapid Test…….…….	19
9	ตัวอย่างชุดทดสอบ Rapid Test และการแปลผล NS1 Ag…….……....	26
10	ตัวอย่างชุดทดสอบ Rapid Test และการแปลผล IgM/IgG…….……...	27
11	ตัวอย่างชุดทดสอบ Rapid Test และการแปลผล IgA…….……...	27
12	ตัวอย่างชุดทดสอบ SD Dengue IgM/IgG Capture ELISA……..…….	28
13	การเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ของบริเวณยีน NS5…….	31
14	การทำ 10 fold-Serial dilution จากความเข้มข้น $10^{10} – 10^{-1}$ copies/µl……..	38
15	ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Single specimens ทั้งหมด…….....	41
16	ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Single specimens ตามวันหลังจากมีไข้……..	42
17	ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Paired specimens จำนวน 92 ตัวอย่าง…….	44
18	ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Paired specimens จำนวน 50 ตัวอย่าง…….	46
19	การเปรียบเทียบแต่ละวิธีที่ใช้ตรวจสอบตามวันหลังจากมีไข้…….....	47
20	ผลการตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5….	49
21	ตัวอย่างยืนยันการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสเดงกี่……	50
22	ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree บริเวณยีน NS5 ของเชื้อไวรัสเดงกี่…….	51
23	ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 1……....	52
24	ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 2……....	52
25	ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 3……....	53
26	ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 4……....	53
27	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในบริเวณยีน NS5……	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
3′UTR	3′untranslated region
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DENV	Dengue Virus
DF	Dengue fever
DHF	Dengue hemorrhagic fever
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DSS	Dengue shock syndrome
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
EtOH	Ethanol
HRP	Horseradish peroxidase
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
$MgCl_2$	Magnesium dichloride
µl	Microliter
ml	Mililiter
µM	Micromolar
mM	Milimolar
nm	Nanometer
NS1	Nonstructural protein 1
NS5	Nonstructural protein 5
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
TMB	Tetramethylbenzidine
Tm	Melting temperature

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อที่มีแมลงเป็นพาหะ (Arthropod-borne viral diseases หรือ Arboviruses) ได้ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสุขอนามัยในหลายพื้นที่ทั่วโลก เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่ง คือ ไวรัสเดงกี่ (Dengue virus; DENV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก โดยมียุงเป็นพาหะ (Mosquito-borne viral disease) และจากผลการสำรวจอุบัติการณ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่โดยองค์กรอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) พบว่าเชื้อไวรัสเดงกี่มีการระบาดมากกว่า 100 ประเทศในเขตร้อนชื้นและเขตร้อนกึ่งอบอุ่น โดยเฉพาะทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งทำให้ประมาณ 2.5 พันล้านคน มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ โดยในทุกปีจะพบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ประมาณ 50 – 100 ล้านคนจากทั่วโลก และอยู่ในภาวะ DHF/DSS ถึง 250,000 – 500,000 คน จึงทำให้ในแต่ละปีมีจำนวนผู้เสียชีวิตอย่างน้อย 22,000 คน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเด็ก [1, 2] เมื่อผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ 1 ใน 4 สายพันธุ์ (DENV1, 2, 3 หรือ 4) จะมีอาการทางคลินิกที่หลากหลาย ตั้งแต่อาการเป็นไข้ชนิดไม่รุนแรง เรียกระยะ Dengue Fever (DF) ไปจนถึงอาการเลือดออกอย่างรุนแรง ร่วมกับมีเกล็ดเลือดต่ำ และมีการรั่วไหลของพลาสมาออกมามาก จึงเรียกว่าระยะ Dengue hemorrhagic fever (DHF) ซึ่งอาจถึงขั้นเสียชีวิต เนื่องจาก Dengue shock syndrome (DSS) ได้ [3] นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ซ้ำด้วยสายพันธุ์ที่แตกต่างกับการติดเชื้อครั้งแรก ก็เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้อาการของโรคมีความรุนแรงมากขึ้น คือ ทำให้เกิดภาวะ DHF/DSS ดังกล่าวข้างต้น [4] ในปัจจุบันยังไม่มีทั้งวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกี่และยารักษาที่จำเพาะต่อผู้ป่วย แต่จะเป็นการรักษาตามอาการเพื่อบรรเทาความรุนแรงของโรคเท่านั้น [5] ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็วและแม่นยำ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความสำคัญ เพื่อวางแนวทางการรักษาและดูแลผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม รวมทั้งช่วยลดความรุนแรงของโรคที่อาจจะเกิดขึ้นในผู้ป่วย และยังส่งผลต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกี่ทางอ้อมด้วย

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในอดีตจะใช้วิธีการแยกเชื้อไวรัสจากซีรั่มผู้ป่วย แม้ว่าจะเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ก็มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ในปัจจุบันจึงนิยมใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้วิธี Serologic assays เช่น วิธี Hemagglutination inhibition (HI) tests หรือ Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) สำหรับการตรวจหา Immunoglobulin M หรือ G (IgM/IgG) ที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่ และสามารถนำไปใช้วิเคราะห์การติดเชื้อซ้ำได้ด้วย แต่วิธี

ดังกล่าวก็ยังมีข้อจำกัดอยู่ คือ ผู้ป่วยต้องติดเชื้อแล้วอย่างน้อย 7 - 14 วัน จึงจะวัดปริมาณแอนติบอดีที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคชนิดรุนแรงและอาจถึงขั้นเสียชีวิต [6] จึงมีการพัฒนามาใช้ชุดตรวจที่ผลิตเชิงพาณิชย์ หรือ Rapid Test ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อตั้งแต่ระยะแรกได้ โดยจะใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของยีน Non-structural protein 1 (NS1 Antigen) รวมทั้งสามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดี IgM, IgG และ IgA ได้อีกด้วย แต่วิธีนี้ก็ยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิค Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เพื่อการตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุล โดยสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้อย่างจำเพาะ จึงเป็นประโยชน์ทั้งการวินิจฉัยการติดเชื้อตั้งแต่ระยะแรกและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วย [7] โดยจะทำการตรวจหาบริเวณ 3′ untranslated regions (3′UTR), ยีน Non-structural proteins 1 (NS1) และยีน Non-structural protein 5 (NS5) ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจำลอง RNA ของไวรัส แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ เพื่อที่จะได้นำมาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี Rapid Test เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) โดยจะทำการหาความถูกต้องและความแม่นยำ รวมทั้งคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย ดังกล่าวด้วย นอกจากนี้ยังศึกษา พัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วย เทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5 เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการจำลอง RNA ของไวรัส โดยจะทำการออกแบบให้ครอบคลุมทั้ง 4 สายพันธุ์ของไวรัสเดงกี่

คำถามของการวิจัย

1. การใช้เทคนิค RT–PCR และวิธี ELISA เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่เปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธี Rapid Test เป็นอย่างไร
2. เมื่อนำวิธี Rapid Test ไปเปรียบเทียบ กับวิธีมาตรฐาน แล้ว ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่เป็นอย่างไร
3. การออกแบบการตรวจจำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5 มีประสิทธิภาพเป็นอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. การใช้เทคนิค RT–PCR และวิธี ELISA เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่เปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธี Rapid Test

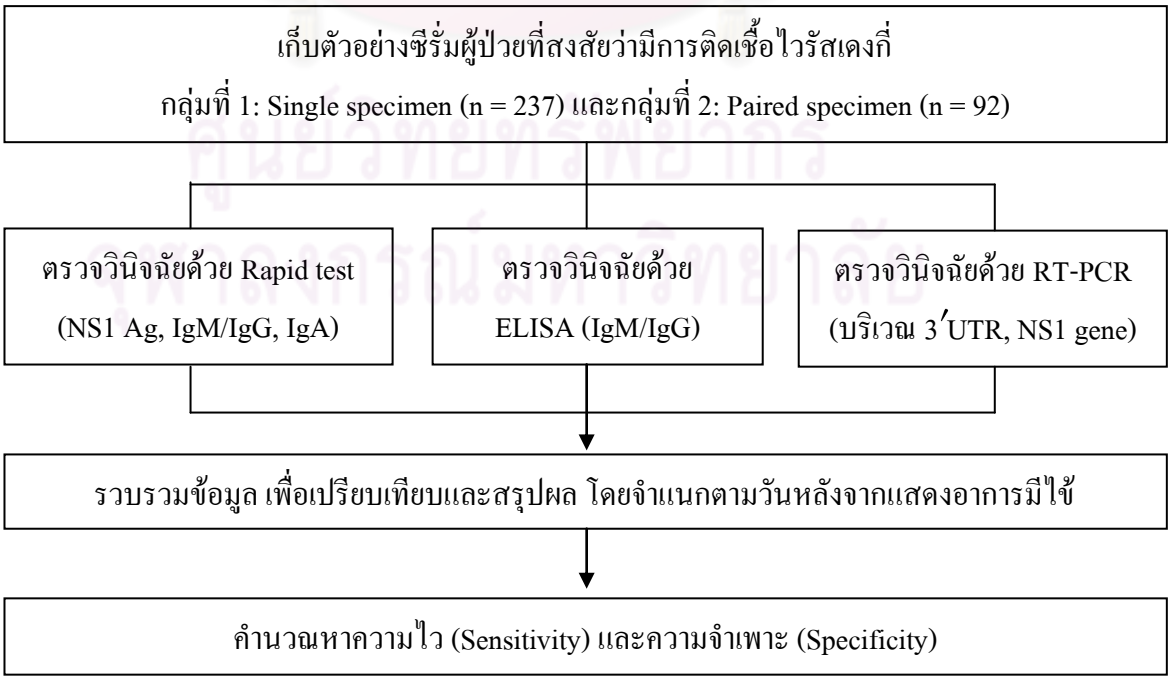
2. เพื่อศึกษาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของวิธี Rapid Test เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่
3. เพื่อพัฒนาการตรวจจำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5

สมมติฐานของการวิจัย

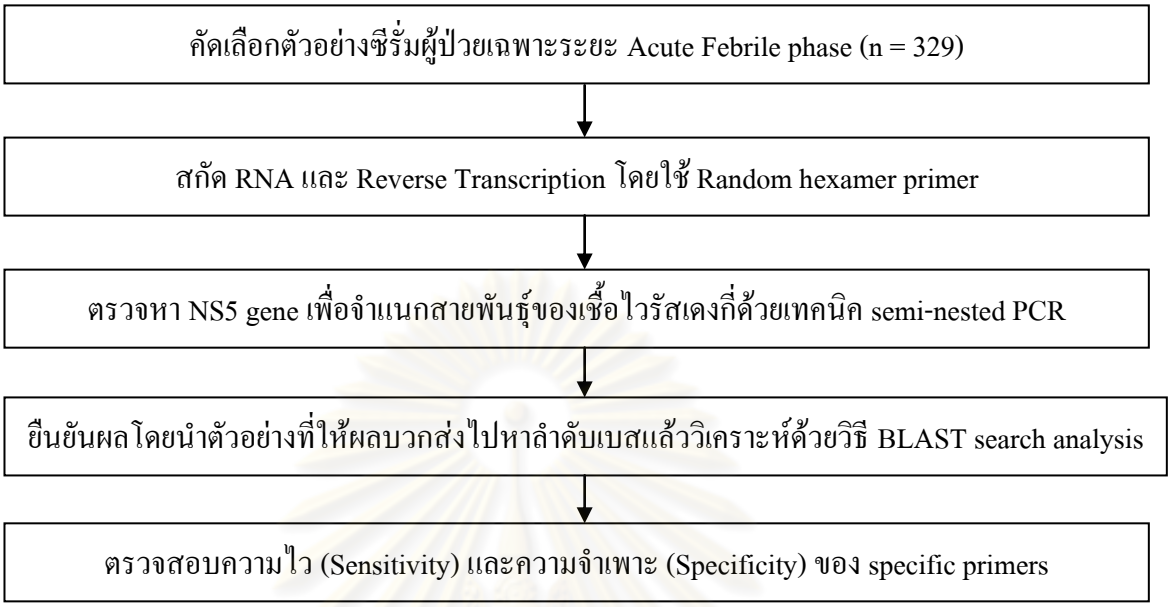
1. ถ้าสามารถคำนวณความถูกต้องและ ความแม่นยำของวิธี Rapid Test ก็จะสามารถเปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ได้
2. ถ้าสามารถคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบต่อวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่นั้น ก็จะสามารถหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีนั้นได้
3. ถ้าสามารถตรวจสอบความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของการตรวจจำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ ก็จะทราบประสิทธิภาพของเทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5 ได้

ขอบเขตของการวิจัย

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่



การตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ในบริเวณ NS5 gene



ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากตัวอย่างซีรั่มที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นตัวอย่างที่เหลือจากงานตรวจบริการของโรงพยาบาล ดังนั้น ตัวอย่างซีรั่มจึงมีปริมาณน้อย และไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบหลายวิธี หรือการทดสอบซ้ำมากกว่า 2 ครั้ง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Serotype คือ การแบ่งกลุ่มของไวรัสเดงกี่ตามคุณสมบัติความจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี

คำสำคัญ

Dengue virus, Diagnosis, Rapid test, ELISA และ RT-PCR

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการพิจารณาวิธีการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสม
2. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้ตรวจหาการติดเชื้อได้ตั้งแต่ระยะแรก ซึ่งจะช่วยลดความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยที่อาจจะเกิดขึ้น หากไม่ได้รับการรักษาทันเวลา
3. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ในปีต่อๆ ไป พร้อมทั้งเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสเดงกี่ (Dengue virus) เป็นไวรัสชนิด single-stranded RNA สายบวก จัดอยู่ใน Family *Flaviviridae* มี 4 ซีโรไทป์ (serotypes) ได้แก่ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคไข้เดงกี่ (Dengue Fever) และโรคไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever) เนื่องจากมีการถ่ายทอดเชื้อจากผู้ป่วยไปสู่ผู้อื่นโดยอาศัยพาหะนำโรคที่สำคัญ คือ ยุงลายอียิปต์ (Yellow fever หรือ Egyptian tiger mosquito) สายพันธุ์ *Aedes aegypti* ดังภาพที่ 1(A) เป็นส่วนใหญ่ และยุงลายเอเชีย (Asian tiger mosquito) สายพันธุ์ *Aedes albopictus* ดังภาพที่ 1(B) ด้วย [8, 9]

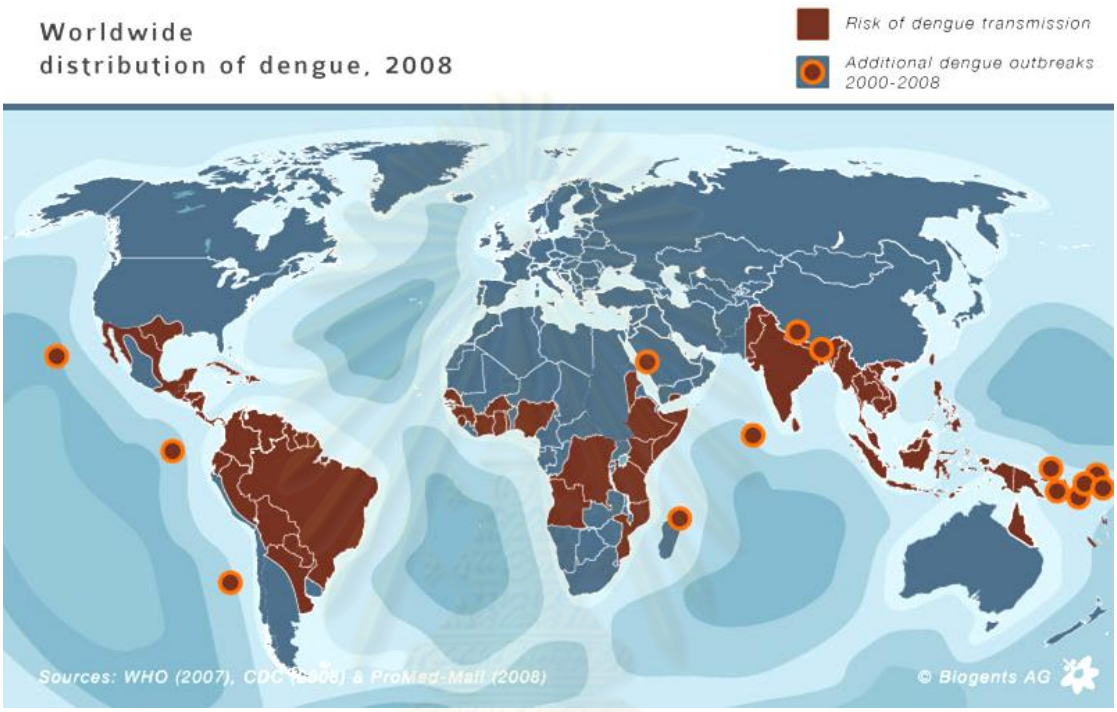
(A)

(B)

ภาพที่ 1 พาหะของเชื้อไวรัสเดงกี่ (A) ยุงลายสายพันธุ์ *Aedes aegypti*
(B) ยุงลายสายพันธุ์ *Aedes albopictus*
[ภาพ 1(A) จาก http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/fiebre_amarilla.htm
สืบค้น ณ วันที่ 20 ธันวาคม 2553]
[ภาพ 1(B) จาก http://charmcitycurrent.com/bmorescientific/
สืบค้น ณ วันที่ 21 ธันวาคม 2553]

ปัจจุบันโรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่พบการระบาดมาก โดยเฉพาะในประเทศแถบร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้น เช่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศในแถบมหาสมุทรแปซิฟิก และประเทศในทวีปอเมริกาตอนกลางและตอนใต้ (ดังภาพที่ 2) โดยพบผู้ติดเชื้อจากทั่วโลกประมาณ 50-100 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออกมากกว่า 20,000 รายต่อปี ซึ่งประเทศไทยก็จัดว่าเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดสูง (Hyperendemic area) ประเทศหนึ่ง เนื่องจากการระบาดของการติดเชื้อแต่ละครั้งพบเชื้อไวรัสเดงกี่ครบทั้ง 4 ซีโรไทป์ แต่ที่พบบ่อยมักจะเป็นการติดเชื้อจาก DENV-2 หรือ DENV-3 มากกว่าสายพันธุ์อื่น [8, 10, 11]

โรคไข้เลือดออกมักพบในเด็กเล็กเป็นส่วนใหญ่ แต่ระยะหลังพบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในเด็กโตและวัยรุ่นจำนวนมากขึ้น ดังนั้นถ้าผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในวัยรุ่นหรือผู้ใหญ่ที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่เริ่มแรก อาจทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างไม่ถูกต้อง ส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อกหรือมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ จนเป็นอันตรายถึงขั้นเสียชีวิตได้ [8, 12, 13]



ภาพที่ 2 การแพร่กระจายทั่วโลกของเชื้อไวรัสเดงกี่

[ภาพจาก http://www.mosquitaire.com/cms/website.php?id=/en/tigermosquitos/dengue.htm สืบค้น ณ วันที่ 3 มิถุนายน 2553]

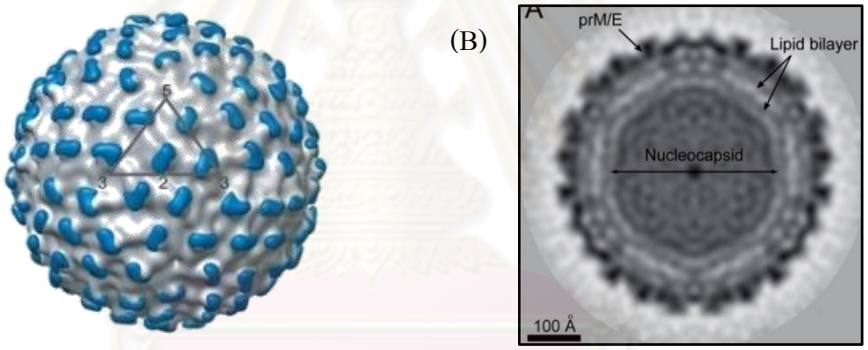
ประวัติความเป็นมาของเชื้อไวรัสเดงกี่

จากประวัติความเป็นมาของเชื้อไวรัสเดงกี่พบว่า มีรายงานการค้นพบอาการเป็นไข้ที่คล้ายกับโรคไข้เดงกี่ (DEN-like illness) ประมาณศตวรรษที่ 3 ในราชวงศ์ฉิน โดยจะเรียกโรคดังกล่าวว่า “water poison” เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับแมลงที่เกี่ยวข้องกับน้ำและมีลักษณะอาการของโรค คือ มีไข้สูง ผื่นแดง ปวดข้อต่อ ปวดกล้ามเนื้อ และมีเลือดออก [14] ต่อมาในปี 1896 โรคไข้เดงกี่ได้รับการยอมรับโดย Leichtenstern [15] หลังจากนั้นเมื่อมีการติดต่อสื่อสารทางการค้าและขนส่งสินค้าระหว่างประเทศมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อไวรัสเดงกี่มีการระบาดและการกระจายเพิ่มขึ้นในหลายพื้นที่ จนมาถึงศตวรรษที่ 20 ดังจะเห็นได้ว่า เชื้อไวรัสเดงกี่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับมนุษย์เป็นเวลาประมาณ 2,000 ปีมาแล้ว

ไวรัสวิทยาของเชื้อไวรัสเดงกี่

ไวรัสเดงกี่ (Dengue virus) จัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* สกุล *Flavivirus* มีลักษณะรูปร่างกลม ขนาด 40 – 60 นาโนเมตรและความหนาแน่นประมาณ 1.23 g/cm^3 บริเวณด้านนอกมี lipid envelope ที่มีความหนาประมาณ 10 นาโนเมตร ล้อมรอบ icosahedral capsid หรือ isometric nucleocapsid ขนาดประมาณ 30 นาโนเมตร (ดังภาพที่ 3) ส่วนภายในประกอบด้วยจีโนมที่เป็น RNA สายเดี่ยวที่เป็นสายบวก (+ssRNA) ขนาดประมาณ 11 kb โดยที่ปลาย 5′ มี Cap แต่ที่ปลาย 3′ ไม่มี poly-adenylate tail นอกจากนี้ที่ปลาย 5′ และ 3′ ยังประกอบด้วยบริเวณ untranslated regions (5′UTR และ 3′UTR) และมี open reading frame (ORF) เดียว จึงแปลรหัสได้โปรตีนสายยาวเส้นเดียว จากนั้นเมื่อมีเอนไซม์ protease มาตัด จึงสามารถแบ่งได้เป็น Structural proteins 3 ชนิด ได้แก่ Capsid (C), preM (pre-Membrane) และ Envelope (E) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของไวรัส และ Non-structural proteins อีก 7 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนไวรัส [16] ดังภาพที่ 4

(A) (B)



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสเดงกี่ (A) ลักษณะภายนอก (B) ลักษณะภายใน (I-Mei Yu, *et al.*, 2008) [17]

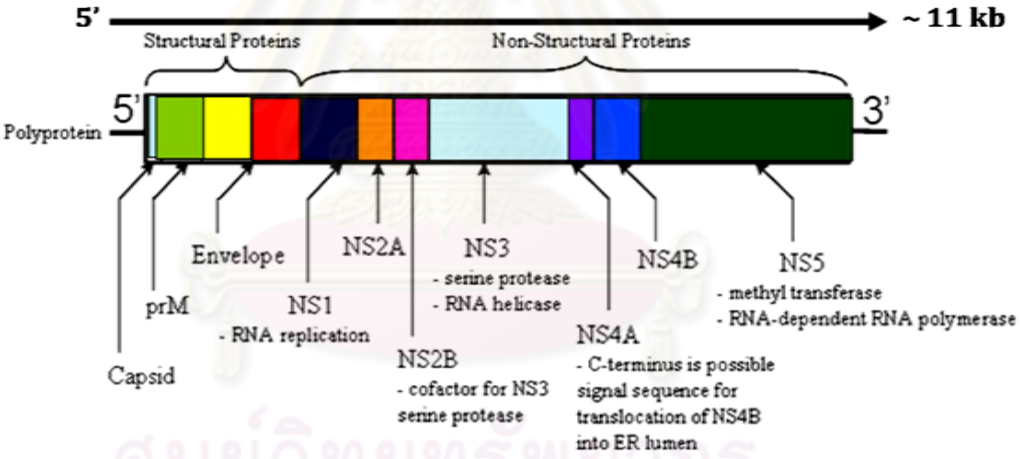
- 3′untranslated regions (3′UTR) เป็นบริเวณที่มีความยาวประมาณ 400 – 800 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับเบสที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) ของแต่ละสายพันธุ์จำนวนมาก และมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนไวรัส ควบคุมการแปลรหัสเป็นโปรตีน และสังเคราะห์ RNA โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 90 – 120 จะประกอบรูปร่างเป็น stem-loop (3′-SL) นอกจากนี้ในบริเวณ 3′UTR ยังเป็นส่วนที่มีความคล้ายคลึงกับไวรัสชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Flavivirus* เดียวกันอีกด้วย [18]

- 5′untranslated regions (5′UTR) มีความยาวประมาณ 100 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งบริเวณที่มีลำดับเบสที่ มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) ของแต่ละสายพันธุ์ และมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนไวรัส รวมทั้งการแปลรหัสเป็นโปรตีนด้วย [19]

- Capsid หรือ Core protein (C) เป็นโปรตีนชนิด homodimer มีขนาด 11 kDa (kilodalton) บริเวณนี้เป็นลำดับเบสชนิด hydrophobic ที่มี lysine และ arginine residues จำนวนมาก จะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ไปจับกับ RNA ของไวรัส รวมทั้งมีบทบาทสำคัญในการเกิด RNA genome encapsidation ด้วย [20]

- Membrane protein (preM/M) เป็นโปรตีนชนิด N-glycosylated ขนาด 27 – 31 kDa และเป็นชนิด hydrophobic ซึ่งจะเกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ protease ใน trans-Golgi network (TGN) ระหว่างระยะสุดท้ายของการรวมตัวเป็นไวรัส (virus assembly) ก่อนจะปล่อยออกเป็น mature virion [21]

- Envelope (E) เป็นโปรตีนชนิด class II N-glycosylated dimeric membrane fusion protein ที่มีขนาด 53 kDa ซึ่งจะปรากฏอยู่ในรูป homotrimer บนพื้นผิวของไวรัสหรืออาจจะพบในรูป E-preM heterodimers อยู่ภายในเซลล์ หน้าที่สำคัญของ Envelope จะเกี่ยวกับการจับและการรวมตัวของไวรัสเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์ของเจ้าบ้าน [22]



ภาพที่ 4 ลักษณะการเรียงตัวของยีนต่างๆในจีโนมของเชื้อไวรัสเดงกี่

[ภาพจาก http://carnot.utmb.edu/flavitrack/images/flavivirus_genome.png สืบค้น ณ วันที่ 18 เมษายน 2553]

- Non-structural proteins 1 (NS1) เป็นไกลโคโปรตีนขนาด 46 kDa ชนิด dimeric N-glycosylated glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) ที่จะเป็นองค์ประกอบทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โปรตีน NS1 ประกอบด้วย signals 2 ชนิด คือ Asn-X-Ser และ Asn-X-Thr ซึ่งจะใช้ในการเติมคาร์โบไฮเดรตที่ปลาย N-linked นอกจากนี้บริเวณ NS1 ยังเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) กับไวรัสชนิดอื่นๆ ในสกุล *Flaviviruses* อีกด้วย การสังเคราะห์

NS1 เกิดขึ้นใน rough endoplasmic reticulum (RER) เป็นไกลโคโปรตีนชนิด monomeric มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic สามารถละลายในน้ำได้ แต่ NS1 จะไปรวมองค์ประกอบแบบ noncovalent ทำให้กลายเป็นสารที่มีคุณสมบัติ hydrophobic เพิ่มขึ้น แล้วจึงถูกส่งไปยัง Golgi apparatus ซึ่งจะมีการดัดแปลง N-linked glycan จาก mannose ให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ส่วนโปรตีน NS1 ที่ยังเหลืออยู่ในเซลล์ ก็จะถูกส่งออกมาที่ plasma membrane หรือถูกปล่อยออกนอกเซลล์ ซึ่งการปล่อย NS1 ในปริมาณที่มาก อาจจะเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีน NS1 นี้มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการจำลอง RNA ของไวรัสและการเปลี่ยนรูปร่างของไวรัส นอกจากนี้อาจจะมีความสำคัญในทางภูมิคุ้มกันวิทยาด้วย กล่าวคือ เซลล์ที่มีการติดเชื้อจะมีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ ซึ่งจะกลายเป็นเป้าหมายของ immune cytolysis [23, 24]

- Non-structural proteins 2A (NS2A) เป็นโปรตีนชนิด hydrophobic ขนาด 22 kDa จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรวมองค์ประกอบและการเพิ่มจำนวน RNA ของไวรัส รวมทั้งมีบทบาทในการต่อต้าน interferon (IFN) ด้วย [25]

- Non-structural proteins 2B (NS2B) เป็นโปรตีนชนิด hydrophobic ขนาด 14 kDa จะทำงานร่วมกับ NS3 gene เพื่อสร้างเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ protease โดยโปรตีน NS2B นี้ จะทำหน้าที่เป็น cofactor ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ serine protease ใน NS3 [26]

- Non-structural proteins 3 (NS3) เป็นโปรตีนขนาด 70 kDa ที่มีหลายหน้าที่ คือ เป็นเอนไซม์ serine protease ที่ทำหน้าที่เหมือน trypsin, เอนไซม์ helicase และเอนไซม์ RNA triphosphatase (RTPase) นอกจากนี้ ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโปรตีนหลายชนิดและการจำลอง RNA ของไวรัสอีกด้วย [16]

- Non-structural proteins 4A (NS4A) เป็นโปรตีนประเภท hydrophobic ขนาดเล็ก 16 kDa จะทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเพื่อไปยับยั้ง interferon (IFN) และที่บริเวณปลาย C-terminus ยังเป็นตัวสัญญาณของการเปลี่ยนตำแหน่งของ NS4B ใน ER lumen อีกด้วย [27] รวมทั้งอาจจะเกี่ยวข้อง กับการเป็นสารประกอบ cofactor ของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ของโปรตีน NS5 ในการจำลอง RNA ของไวรัส

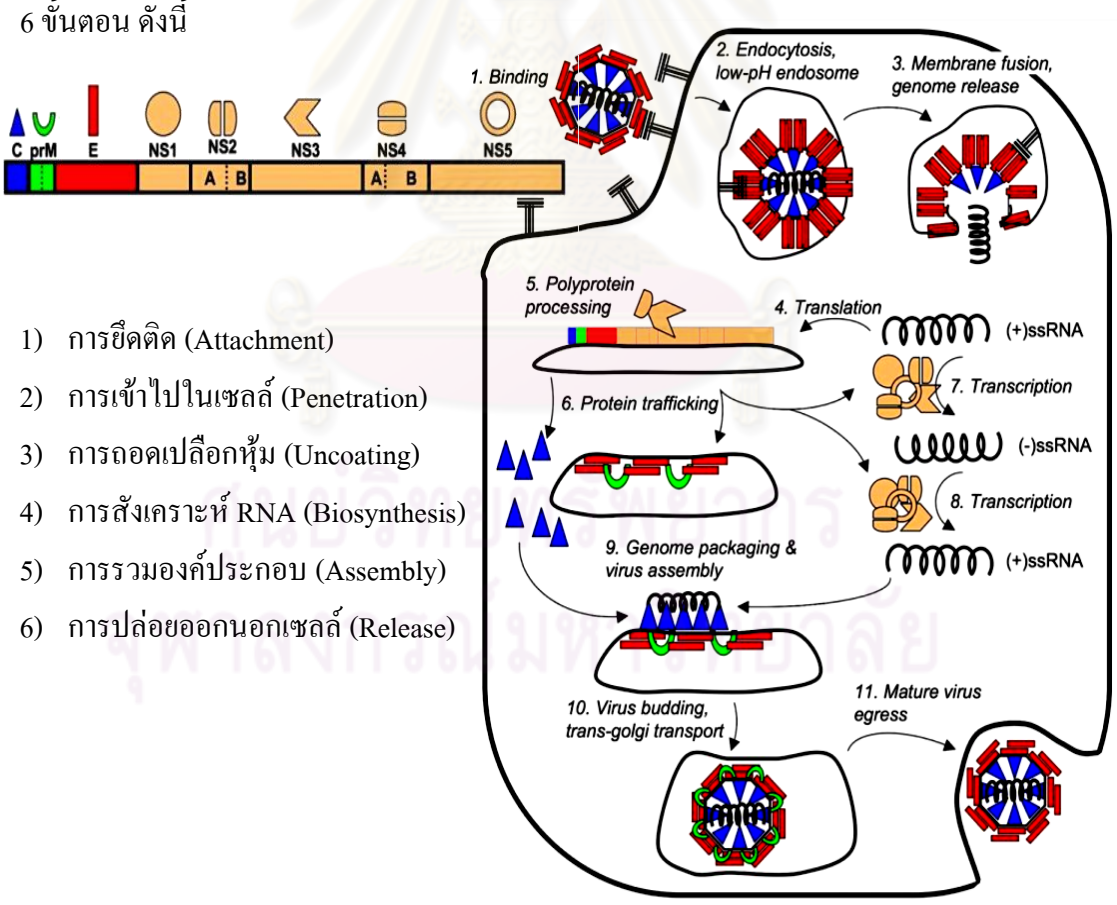
- Non-structural proteins 4B (NS4B) มีขนาด 27 kDa เป็นโปรตีนประเภท hydrophobic ขนาดเล็ก ที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเพื่อไปยับยั้ง interferon (IFN) และอาจจะเกี่ยวข้อง

กับการเป็นสารประกอบ cofactor เช่นเดียวกับ NS4A รวมทั้งช่วยทำให้แต่ละสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่มีความแตกต่างกันไปอีกด้วย [27, 28]

- Non-structural proteins 5 (NS5) เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ 103 kDa ที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) ของแต่ละสายพันธุ์ และยัง มีหน้าที่หลากหลาย ได้แก่ กระบวนการเติม RNA cap, การสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการจำลอง RNA ของไวรัส คือ เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)และเอนไซม์ methyltransferase อีกทั้งบริเวณนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิด interleukin-8 (IL-8) และกระบวนการ nuclear localization อีกด้วย [29]

วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสเดงกี่

การติดเชื้อไวรัสเดงกี่สามารถแพร่กระจายจากผู้ที่ติดเชื้อไปยังคนอื่นๆได้ โดยมียุงลายเป็นพาหะ เมื่อเชื้อไวรัสเดงกี่เข้าไปในกระแสเลือดจะเกิดการเพิ่มจำนวน ซึ่งสามารถแบ่งเป็นขั้นตอนได้ 6 ขั้นตอน ดังนี้



1) การยึดติด (Attachment)
2) การเข้าไปในเซลล์ (Penetration)
3) การถอดเปลือกหุ้ม (Uncoating)
4) การสังเคราะห์ RNA (Biosynthesis)
5) การรวมองค์ประกอบ (Assembly)
6) การปล่อยออกนอกเซลล์ (Release)

ภาพที่ 5 วัฏจักรการจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสเดงกี่ (Tomlinson SM, *et al.*, 2009) [30]

หลังจากเชื้อไวรัสเดงกี่เข้าไปในกระแสเลือดจะใช้ไกลโคโปรตีนที่หุ้มอนุภาคไวรัส หรือ Envelope (E) ไปเกาะจับอย่างจำเพาะกับตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเข้าสู่เซลล์เป้าหมายผ่านกลไก Endocytosis แล้วเกิดการถอดเปลือกหุ้ม (Uncoating) เพื่อปล่อยจีโนม (+)ssRNA ออกมาในไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นส่วนหนึ่งของจีโนมจะถูกสังเคราะห์เป็นสายคู่สม (Complementary strand) ที่เป็น (-)ssRNA เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นต้นแบบจีโนมของอนุภาคไวรัสใหม่ต่อไป อีกส่วนหนึ่งของจีโนมจะใช้สังเคราะห์เป็นโปรตีนที่สำคัญต่างๆ ของไวรัส โดยจะใช้โปรตีน NS1 ในการจำลอง RNA จากนั้นแปลรหัสด้วยเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ที่อยู่ในยีน NS5 ได้โปรตีนสายยาวขนาดประมาณ 370 kDa แล้วตัดด้วยเอนไซม์ protease ในยีน NS3 โดยมียีน NS2b เป็น cofactor ก็จะได้ Structural proteins 3 ชนิด และ Non-structural proteins 7 ชนิด หลังจากนั้นโปรตีน NS2a จะเข้ามาเกี่ยวข้องกับการรวมองค์ประกอบทั้งหมดที่สร้างขึ้น ได้เป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่ สุดท้ายจะมีการสร้าง Capsid (C) และ pre-Membrane (preM) ล้อมรอบอนุภาคไวรัสก่อนจะปล่อยออกจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยการ Budding โดยมีการนำเอา plasma membrane ของเจ้าบ้านออกไปด้วย อนุภาคไวรัสเดงกี่จึงมี Envelope ล้อมรอบภายนอกอีกชั้นหนึ่ง [31, 32] ดังภาพที่ 5

ลักษณะทางคลินิกของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่

ส่วนใหญ่ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่จะไม่มีอาการ แต่สำหรับผู้ที่ติดเชื้อแล้วแสดงอาการ จะสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ตามความรุนแรงของโรค ดังนี้

1) **Undifferentiated fever หรือ viral syndrome** ส่วนใหญ่พบในเด็กเล็ก โดยมีอาการ เป็นไข้เพียงอย่างเดียว หรือมีผื่นชนิด maculopapular ร่วมด้วย

2) **โรคไข้เดงกี่** (Dengue Fever หรือ DF) ส่วนใหญ่พบในเด็กโตหรือผู้ใหญ่ ระยะแรกผู้ป่วยมักมีไข้สูง ปวดศีรษะ และหลังกระบอกตา ร่วมกับปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อและกระดูก บริเวณผิวหนังจะมีผื่นขึ้น ซึ่งมีลักษณะเฉพาะ ได้แก่ erythematous หรือ maculopapular หรือ พบจุดเลือดออกได้ พบว่าร้อยละ 25 มีจุดเลือดออกที่ผิวหนัง และมีเพียงร้อยละ 5 ที่มีเลือดกำเดาไหล โดยไม่พบว่ามีเลือดออกจากทางเดินอาหาร ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำลง ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือดเริ่มลดต่ำลงไม่มาก ประมาณ 100,000-150,000 /มม.^{3} โรคไข้เดงกี่นี้อาการไม่รุนแรงและหายได้เองภายในเวลา 2-7 วัน

3) **โรคไข้เลือดออก** (Dengue Hemorrhagic Fever หรือ DHF) มีลักษณะเฉพาะของโรค คือ มีการรั่วของพลาสมาออกจากหลอดเลือดมาอยู่ใน third space มีผลทำให้เกิดความเข้มข้นเลือดสูงขึ้น

หรือ มีน้ำในช่องท้องหรือเยื่อหุ้มปอด และหากมิได้รับการรักษาที่เหมาะสม ผู้ป่วยจะเกิดภาวะ hypovolumic shock ได้ ซึ่งเรียกว่า Dengue shock syndrome (DSS) ระยะเวลาที่มีการรั่วของพลาสมา มักเกิดในช่วงเวลาสั้นๆ ประมาณ 1-2 วัน ร่วมกับจำนวนเกล็ดเลือดเริ่มลดต่ำลงมาก ส่งผลให้มีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ ได้ (ดังภาพที่ 6) นอกจากนี้พบว่าหลอดเลือดฝอยมีความเปราะบางเพิ่มขึ้น (capillary fragility) ทำให้การทดสอบทูนิเกต์ (tourniquet test) ได้ผลบวก ภาวะเลือดออกในไข้เลือดออกมีความรุนแรงตั้งแต่น้อยจนถึงรุนแรงมาก ส่วนใหญ่พบร้อยละ 73 ของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก จะมีเลือดออกที่ผิวหนัง ส่วนน้อยร้อยละ 18 พบว่ามีเลือดกำเดาไหลและร้อยละ 9 พบว่ามีเลือดออกในทางเดินอาหาร [8, 33]

(A) (B)

ภาพที่ 6 ลักษณะอาการของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ (A) อาการเลือดออกบริเวณตา
(B) อาการเลือดออกบริเวณแขนและลำตัว
[ภาพ 6(A) จาก http://www.sos-arsenic.net/english/environment/dengu.html
สืบค้น ณ วันที่ 20 เมษายน 2553]
[ภาพ 6(B) จาก http://www.beanspout.blogspot.com/2007/08/beware-of-dengue-fever.html
สืบค้น ณ วันที่ 20 เมษายน 2553]

การดำเนินโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่

หลังจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่มีระยะฟักตัว (Incubation period) 3 – 15 วัน จะมีอาการแสดงออกมา โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะเป็นไข้ (Acute หรือ Febrile phase) ผู้ป่วยจะมีไข้สูงลอยประมาณ 39.4 – 41.1°C เป็นระยะเวลา 2-7 วัน อาการไข้มักไม่ตอบสนองต่อยาลดไข้มากนัก เนื่องจากเป็นระยะที่มีไวรัสในกระแสเลือด ผู้ป่วยจะหน้าแดง มีอาการคลื่นไส้ อาเจียนมาก ตับโต ปวดศีรษะ ปวดหลัง ปวดกล้ามเนื้อ และมีภาวะเลือดออกง่าย โดยมีจุดเลือดออกที่ผิวหนังหรือมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ

2) ระยะวิกฤตหรือระยะไข้ลด (Toxic หรือ Defervescence phase) ผู้ป่วยเริ่มมี vascular permeability เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการรั่วของพลาสมาอย่างมาก จนอาจจะเกิดภาวะช็อกได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดพร้อมกับอาการไข้ลดลงอย่างรวดเร็ว ผู้ป่วยมือเท้าเย็น กระสับกระส่าย มีอาการปวดท้องหรือท้องแน่นตึง ปัสสาวะออกน้อยลง ชีพจรเต้นเร็วและเบาลง มีความดันโลหิตต่ำ หรือ pulse pressure แคบ ในผู้ป่วยที่มีภาวะช็อกนาน ก่อให้เกิดภาวะความเป็นกรดในเลือด ร่วมกับมีการถูกทำลายและการใช้ไปของเกล็ดเลือด และ coagulation factors ต่างๆ ทำให้มีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำ แล้วนำไปสู่การเกิดภาวะ disseminated intravascular coagulation (DIC) และอาจทำให้เลือดออกมามากขึ้นตามอวัยวะต่างๆ เช่น ผิวหนัง เหงือก จมูก กระเพาะอาหาร เป็นต้น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดอาการช็อก และเสี่ยงต่อการเสียชีวิตได้

3) ระยะฟื้นตัว (Convalescence phase) เป็นระยะที่มีการย้ายกลับของพลาสมาเข้าสู่กระแสเลือด ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการทั่วไปดีขึ้น เช่น มีความอยากอาหาร ปัสสาวะบ่อยขึ้น อัตราการเต้นของหัวใจและชีพจรช้าลง (sinus bradycardia) มีความดันโลหิตปกติ หรือ มีผื่นที่มีลักษณะเป็นวงขาวกระจายอยู่ในพื้นที่สีแดง (convalescent rash) ร่วมกับมีอาการคันตามร่างกาย [8, 32]

สาเหตุความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่

ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่มีความรุนแรงมากขึ้น กล่าวคือ ทำให้เกิดภาวะ DHF หรือ DSS มาจาก 2 สมมติฐาน ได้แก่

1) ทฤษฎีการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ซ้ำด้วยสายพันธุ์ที่แตกต่างกับการติดเชื้อครั้งแรก (Heterologous infection) ส่งผลทำให้ผู้ป่วยมีเลือดออก เนื่องจากการตอบสนองของเซลล์จดจำชนิดที (Memory T cell) ที่อาจจะไปยับยั้งหรือทำให้การกำจัดไวรัสช้าลง จึงส่งผลให้มีปริมาณไวรัสสูงขึ้นและทำให้เกิดความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น [34]

2) ทฤษฎีความรุนแรงของไวรัสเดงกี่บางสายพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้มีปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดสูง ส่งผลให้เกิดโรครุนแรงมากขึ้น [35] ดังเช่น ถ้าเป็นการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 2 (DENV-2) อาจจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเลือดออกและภาวะช็อกเพิ่มขึ้น [36]

เกณฑ์การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก

สำหรับเกณฑ์การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกขององค์การอนามัยโลก เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 ใช้ในการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก โดยใช้ลักษณะทางคลินิกร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางห้องปฏิบัติการ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 [8, 37]

ตารางที่ 1 เกณฑ์การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization)

การวินิจฉัย	ไข้สูงลอย 2-7 วัน	การรั่วของพลาสมา**	จำนวนเกล็ดเลือด (/μl)	Circulatory collapse	Tourniquet test	Frank bleeding
DF	มี*	ไม่มี	Variable	ไม่มี	Variable	บางครั้ง
DHF เกรด 1	มี	มี	< 100,000	ไม่มี	Positive¶¶	ไม่มี
DHF เกรด 2	มี	มี	< 100,000	ไม่มี	Positive	มี
DHF เกรด 3	มี	มี	< 100,000	PP < 20 mmHg¶	Variable	บางครั้ง
DHF เกรด 4	มี	มี	< 100,000	วัด BP ไม่ได้	Variable	บางครั้ง

* มีอาการอื่นร่วมด้วย อย่างน้อย 2 อาการ ได้แก่ ปวดศีรษะ ปวดหลังกระบอกตา ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อหรือกระดูก มีผื่นขึ้น และมีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำ

** ค่าฮีมาโตคริตเพิ่มสูงขึ้น มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับค่าฮีมาโตคริตเดิม

¶ Pulse pressure แคบน้อยกว่า 20 มม.ปรอท

¶¶ โดยพบจุดเลือดออก มากกว่าหรือเท่ากับ 20 จุด ในพื้นที่ 2.5 x 2.5 เซนติเมตร

- **ลักษณะทางคลินิก**
  - ไข้สูงลอยนาน 2-7 วัน
  - อาการเลือดออก ส่วนใหญ่จะพบจุดเลือดออกที่ผิวหนัง หรือมีการทดสอบทูนิเกต์ได้ผลบวก ส่วนน้อยพบว่า มีเลือดออกตามเยื่อบุ หรือเลือดออกในทางเดินอาหาร
  - ตับโต
  - ภาวะช็อก หรือมีการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนเลือด
- **การเปลี่ยนแปลงทางห้องปฏิบัติการ**
  - จำนวนเกล็ดเลือดต่ำลง น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100,000/มม.^{3}
  - ค่าฮีมาโตคริต (Hematocrit, Hct) เพิ่มสูงขึ้น มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับค่าฮีมาโตคริตเดิม

ความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก

จะสามารถแบ่งความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกได้เป็น 4 เกรด ตามความรุนแรงการรั่วของพลาสมาและอาการเลือดออก ดังนี้ [8, 37]

- **เกรด 1** มีการรั่วของพลาสมา แต่ไม่มีภาวะช็อก ไม่พบอาการเลือดออก มีเพียงการทดสอบทูนิเกต์ได้ผลบวก

- **เกรด 2** มีการรั่วของพลาสมา แต่ไม่มีภาวะช็อก พบอาการเลือดออกที่ผิวหนัง หรือมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ
- **เกรด 3** มีการรั่วของพลาสมาอย่างมาก จนเริ่มเกิดมีภาวะช็อก พบชีพจรเต้นเบาและเร็ว ความดันโลหิตต่ำ หรือมี pulse pressure แคบ
- **เกรด 4** มีภาวะช็อกอย่างรุนแรงจนวัดความดันโลหิตหรือคลำชีพจรไม่ได้

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. **การตรวจนับเม็ดเลือด (CBC)** ช่วยในการวินิจฉัยโรคไข้เดงกี่และโรคไข้เลือดออกได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะร่วมกับการทดสอบทูนิเกต์ได้ผลบวก การเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำลงชัดเจนในช่วงวันที่ 3 ของโรค โดยมีจำนวนนิวโตรฟิลลดลงอย่างรวดเร็ว และตรวจพบ atypical lymphocyte สูงขึ้นในเลือดชัดเจนในวันที่ 4-5 ของโรค และจำนวนเกล็ดเลือดเริ่มลดต่ำลงน้อยกว่า 100,000/มม.^{3} ในช่วงวันที่ 3-4 ของโรค และลดลงต่ำสุด (น้อยกว่า 50,000/มม.^{3}) ช่วงระยะวิกฤต นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮีมาโตคริต (Hct) ในช่วงระยะท้ายของไข้ โดยตรวจพบระดับฮีมาโตคริตเริ่มสูงขึ้นช้าๆ จนเข้าสู่ระยะวิกฤต ระดับฮีมาโตคริตจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าร้อยละ 20 ของค่าปกติ ซึ่งแสดงว่ามีการรั่วของพลาสมา ผล CBC จะกลับเป็นปกติหลังจากระยะฟื้นตัว [8, 38]

2. **การตรวจทางระบบการแข็งตัวของเลือด (Coagulogram)** พบว่ามี partial prolonged thromboplastin time (PTT) และ prothrombin time (PT) ร้อยละ 60 และ 30 ของผู้ป่วยตามลำดับ [8, 39] และพบมีการลดลงของ coagulation factors ต่างๆ เช่น factor II, V, VII, VIII, IX, X และ XII ซึ่งเกิดจากการถูกกระตุ้นและการถูกใช้ไปของการแข็งตัวของเลือด [8, 40] ร่วมกับมีการเพิ่มขึ้นของ fibrin degradation products (FDPs) หรือ D-dimer จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้นเชื่อว่า ความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือดและการสลายลิ่มเลือดในโรคนี้เกิดจากภาวะ DIC

3. **การตรวจการทำงานของตับ (Liver function test)** พบการทำงานของตับผิดปกติ ได้แก่ มีระดับ aspartate transaminase (AST/SGPT) และ alanine transaminase (ALT/SGOT) สูงกว่าปกติ ร่วมกับมีระดับอัลบูมินในเลือดต่ำลง

4. **การตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ** เพื่อช่วยให้ได้การวินิจฉัยที่แน่นอน โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ (Serologic test) ได้แก่ การตรวจโดยวิธี Hemagglutination test (HI), วิธี Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) และการตรวจหาแอนติเจน

ของเชื้อไวรัสเดงกี่ ได้แก่ การตรวจ dengue nonstructural 1 (NS1) antigen รวมทั้งการตรวจเชื้อไวรัสจากเลือด ได้แก่ การตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี Reverse transcription - Polymerase chain reaction (RT-PCR)

การตรวจด้วยวิธี HI จำเป็นต้องเจาะเลือดเปรียบเทียบอย่างน้อย 2 ครั้ง โดยเจาะเลือดครั้งแรกเมื่อเริ่มมีอาการไข้ทันที และเจาะครั้งที่ 2 ห่างกัน 4 สัปดาห์ โดยถือว่าเป็นผลบวกเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีอย่างน้อย 4 เท่า (four-fold rising titer) และค่า titer ที่น้อยกว่า 1 : 2,560 ในช่วงเวลาที่เจาะเลือดระยะมากกว่าหรือเท่ากับ 1 สัปดาห์ ถือว่าการติดเชื้อนี้เป็นแบบปฐมภูมิ (Primary infection) แต่ถ้าค่า titer มากกว่า 1 : 2,560 ถือว่าการติดเชื้อนี้เป็นแบบทุติยภูมิ (Secondary infection) วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรกที่มีไข้ได้

การตรวจด้วยวิธี ELISA ทั้งชนิด IgM และ IgG การแปลผลว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ก็ต่อเมื่อพบว่า IgM ≥ 40 units โดยมีความไวร้อยละ 78 และหากใช้ paired serum จะสามารถเพิ่มความไวเป็นร้อยละ 97 นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ว่า การติดเชื้อนี้เป็นแบบปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ โดยผล IgM/IgG > 1.8 แสดงถึงการติดเชื้อแบบปฐมภูมิ ดังนั้นถือเป็นวิธีที่เหมาะสมในปัจจุบัน [8, 41]

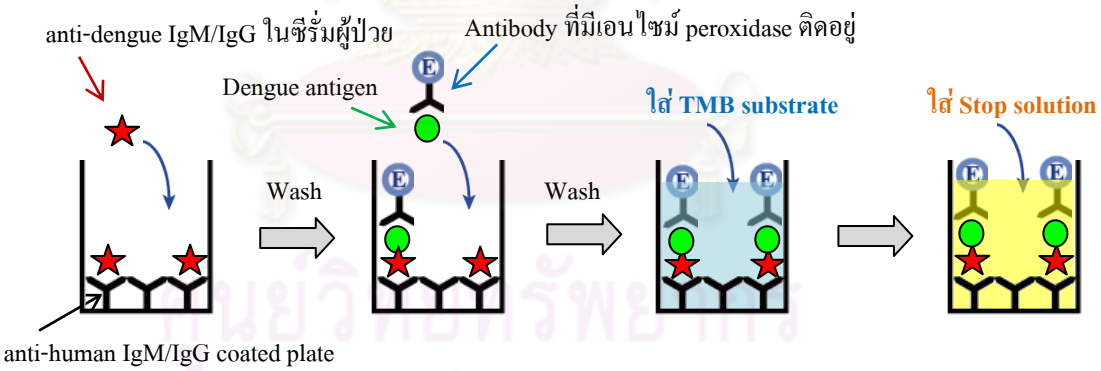
การตรวจ Dengue NS1 antigen เนื่องจาก Dengue NS1 เป็นโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อไวรัสเดงกี่ ซึ่งจะสามารถตรวจพบในเลือดของผู้ป่วยตั้งแต่วันแรกของไข้จนถึงวันที่ 9 ของไข้ [8, 42] โดยจะสามารถตรวจพบทั้งในการติดเชื้อแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ ระดับ Dengue NS1 ในเลือดสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ดังนั้น การตรวจ Dengue NS1 antigen จึงเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ โดยเฉพาะในระยะแรกของโรค ซึ่งมีอาการไม่จำเพาะ เพื่อช่วยให้แพทย์สามารถวางแผนการรักษาได้อย่างรวดเร็ว

การตรวจด้วยวิธี RT-PCR สามารถให้ผลบวกตั้งแต่ระยะมีไข้ 2-3 วันแรก ทำให้สามารถวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง รวมทั้งสามารถ จำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ของเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ [8, 43] นอกจากนี้ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ หรือ Dengue Rapid test ที่สามารถตรวจวัดได้ทั้ง NS1 antigen และ IgM/IgG/IgA antibody ซึ่งทำให้การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

หลักการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่จะอาศัยการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี กล่าวคือ แม้ว่าผู้ป่วยจะติดเชื้อไวรัสเดงกี่ครั้งแรกหรือติดเชื้อซ้ำ ก็จะสามารถตรวจพบ NS1 Antigen ได้ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 9 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ แต่ถ้าเป็นการตรวจหาแอนติบอดี IgM จะตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 5 – 10 ของการติดเชื้อครั้งแรกและวันที่ 4 – 5 ของการติดเชื้อซ้ำ โดยจะคงอยู่เป็นเวลา 30 – 60 วัน ส่วนการตรวจหาแอนติบอดี IgG ของการติดเชื้อครั้งแรก จะสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 14 และคงอยู่ตลอดชีวิต แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อซ้ำ จะสามารถตรวจพบ IgG ได้ตั้งแต่วันที่ 1 – 2 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ แล้วจะเหนี่ยวนำให้มีการตอบสนองของ IgM ที่จำเพาะหลังจาก 20 วันของการติดเชื้อครั้งนั้น [44] นอกจากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่โดยอาศัยการตรวจหา NS1 Antigen, IgM และ IgG แล้ว ยังมีรายงานการศึกษาพบว่า การตรวจหาแอนติบอดี IgA เพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ตั้งแต่ระยะแรกมีความไวมากกว่า IgM หรือ NS1 Antigen โดยเฉพาะในช่วงวันที่ 6 – 25 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ แม้ว่าการคงอยู่ของ IgA จะเป็นช่วงระยะเวลาที่สั้นกว่า แต่ก็สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ซ้ำในผู้ป่วยได้มากกว่า ดังนั้น IgA จึงเป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ที่ดีอีกชนิดหนึ่ง [45, 46]

- **หลักการของวิธี ELISA**



ภาพที่ 7 หลักการ ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดี IgM/IgG

วิธี ELISA เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดแอนติบอดี IgM/IgG ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ โดยใส่ซีรั่มผู้ป่วยที่ต้องการทดสอบลงไปใน Microplate ที่เคลือบแต่ละหลุมด้วย anti-human IgM/IgG antibodies ถ้าในซีรั่มผู้ป่วยมี anti-dengue IgM/IgG antibody ที่จำเพาะ ก็จะเกิดการจับกัน จากนั้นตรวจดู Antibody - Antibody complex โดยเติม Dengue antigen ซึ่งจับอยู่กับแอนติบอดีอีกตัวที่ปิดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase (anti-dengue HRP conjugate) แล้วจึงเติม TMB substrate ลงไป เมื่อ TMB substrate ถูกย่อย ก็จะเกิดสารมีสีซึ่งละลายน้ำได้ขึ้นมา หรือ เกิดการ

เปลี่ยนสี เช่น จากสารละลายไม่มีสี (ใส) เปลี่ยนเป็นสีฟ้า จากนั้นใส่ Stop solution สารละลายจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง (ดังภาพที่ 7) แต่ถ้าในซีรั่มผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะ ก็จะไม่เกิดการเปลี่ยนสีขึ้น

- **หลักการของชุดทดสอบ NS1 Ag และ IgM/IgG Rapid Test**

อาศัยหลัก *in-vitro* colloidal gold - based immunochromatography เพื่อใช้ในการตรวจวัด NS1 Antigen (NS1 Ag), IgM และ IgG Antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ ซึ่งจะสามารถตรวจได้ทั้ง 4 สายพันธุ์เพราะใช้สารผสม recombinant Dengue envelope proteins โดยชุดทดสอบ NS1 Ag จะอยู่แถบด้านซ้ายมือของภาพที่ 8(A) จะมีการเคลือบผิว membrane เป็น 2 เส้น ได้แก่ " C " หมายถึง Control line เส้นนี้ควรจะปรากฏทุกครั้งเมื่อมีการใส่ซีรั่มลงไป เพื่อเป็นตัวควบคุมในการทดสอบว่า มีการไหลผ่านของซีรั่มในชุดทดสอบจริง ส่วนอีกเส้น " T " หมายถึง NS1 Ag test line ถ้าผู้ป่วยอยู่ในระยะแรกของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ จะสามารถตรวจพบ NS1 Ag ในซีรั่มได้ จึงเห็นเส้นนี้ปรากฏขึ้นมา นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัด IgM และ IgG ได้ ซึ่งจะอยู่แถบด้านขวามือของภาพที่ 8(A) ที่มีการเคลือบผิว membrane เป็น 3 เส้น ได้แก่ " C " หมายถึง Control line เพื่อเป็นตัวควบคุมในการทดสอบเช่นเดียวกับแถบด้านซ้ายมือ " M " หมายถึง Dengue IgM test line และ " G " หมายถึง Dengue IgG test line ถ้าในซีรั่มผู้ป่วยมีแอนติบอดี IgM และ/หรือ IgG ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่จะมีเส้นปรากฏขึ้นมา แต่ถ้าในซีรั่มผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดี IgM และ/หรือ IgG ก็จะไม่มีเส้นปรากฏขึ้น

- **หลักการของชุดทดสอบ IgA Rapid Test**

อาศัยหลัก colloidal gold - based immunochromatography เพื่อใช้ในการตรวจวัดแอนติบอดี IgA ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ โดยชุดทดสอบนี้จะมีการเคลือบผิว membrane เป็น 2 เส้น ดังภาพที่ 8(B) ได้แก่ " C " หมายถึง Control line เพื่อเป็นตัวควบคุมในการทดสอบว่ามีการไหลผ่านของซีรั่มในชุดทดสอบจริง เนื่องจากบริเวณนี้มี anti-human IgA antibodies เคลือบอยู่ เมื่อ colloidal gold complexes ที่มี Dengue antigen เคลือบอยู่บนผิวเคลื่อนผ่านจะเกิดการจับกัน จึงเห็นเป็นเส้นปรากฏขึ้นมา ส่วนอีกเส้น " A " หมายถึง Dengue IgA test line ถ้าในซีรั่มผู้ป่วยมีแอนติบอดี IgA ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ เส้นนี้จะปรากฏขึ้นเนื่องจาก IgA ไปจับกับ Dengue antigen ที่เคลือบอยู่บนผิว colloidal gold complexes ได้เป็น Ag - Ab complex แล้วไหลผ่านไปบนผิว membrane ซึ่งมี Dengue antigen เคลือบอยู่บน " A " ทำให้ IgA ในซีรั่มผู้ป่วยไปจับ จึงเห็นเป็นเส้นปรากฏขึ้นมา แต่ถ้าในซีรั่มผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดี IgA ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ ก็จะไม่มีเส้น " A " ปรากฏขึ้น

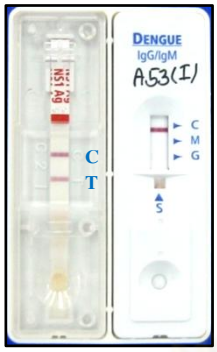
(A)

C = Control

T = NS1 Ag

M = IgM

G = IgG



(B)

C = Control line

A = Dengue IgA test

ภาพที่ 8 ตัวอย่างชุดทดสอบ Rapid Test (A) ตรวจหา NS1 Ag และ IgM/IgG (B) ตรวจหา IgA

- **หลักการของวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)**

เป็นการจำลองหลักการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (Replication) โดยที่มี cDNA เป็นแม่แบบ (template), เอนไซม์ Taq DNA polymerase, ไพรเมอร์ (primer) อย่างน้อย 1 คู่, dNTP ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP รวมถึงสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อทำหน้าที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่เราต้องการจะศึกษา เทคนิคนี้มีความจำเพาะเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการจับกับแม่แบบนั้น ต้องจับเฉพาะกับแม่แบบ (template) ที่เราต้องการศึกษาเท่านั้น ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การแยกสาย DNA จากสายคู่เป็นสายเดี่ยว (Denaturation) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 90-95^{o}C

2. การจับระหว่างไพรเมอร์กับแม่แบบ (annealing) ใช้อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 45-60^{o}C ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ถ้าอุณหภูมิในการจับของไพรเมอร์กับแม่แบบสูงเกินไป จะส่งผลให้การจับระหว่างไพรเมอร์กับแม่แบบเกิดได้ยาก แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปส่งผลให้ความจำเพาะต่อการจับลดลง

3. การเพิ่มความยาวของสายพันธุกรรม (extension) เมื่อไพรเมอร์จับกับแม่แบบได้อย่างคู่สม (complement) แล้ว dNTP ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) จะเข้ามาจับคู่กับสายแม่แบบ ส่งผลให้สายพันธุกรรมใหม่ยาวขึ้นในทิศทาง 5′ไปทาง 3′ของสายพันธุกรรมใหม่ ในขั้นนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 70-75^{o}C

โดยแต่ละขั้นตอนจะเกิดขึ้นซ้ำประมาณ 40 รอบ โดยแต่ละรอบจะเกิดการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมใหม่เป็น 2 เท่า ดังนั้นปริมาณของสารพันธุกรรมใหม่หลังจากสิ้นสุดเท่ากับ 2 ยกกำลังด้วยจำนวนรอบของการทำ PCR

การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่

การรักษาโรคไข้เลือดออก จะเป็นการรักษาตามอาการแบบประคับประคองเป็นสำคัญ ทั้งนี้แพทย์ต้องให้การวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็วและติดตามดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะการให้สารน้ำแก่ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในระยะที่มีการรั่วของพลาสมา ซึ่งมีหลักการสำคัญ คือ ให้สารน้ำในปริมาณที่เพียงพอสำหรับรักษาระดับการไหลเวียนเลือดในช่วงที่มีการรั่วของพลาสมาเท่านั้น โดยแบ่งการรักษาออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้ [8, 47, 48]

1. **การให้การรักษาในระยะเป็นไข้** โดยการให้ยาลดไข้ร่วมกับการเช็ดตัวลดไข้ โดยเฉพาะในเด็กเล็กหรือผู้ป่วยที่มีประวัติชักมาก่อน รวมทั้งมีการให้สารน้ำอย่างเพียงพอ ส่วนยาลดไข้ที่ควรใช้ คือ ยาพาราเซตามอล (acetaminophen) และไม่ควรให้บ่อยเพราะอาจเกิดผลแทรกซ้อนต่อตับ และควรคำนึงไว้ด้วยว่า ยาลดไข้ไม่อาจทำให้ระยะเวลาของไข้สั้นลงหรือไข้ลดลงได้ง่าย เนื่องจากเป็นระยะที่มีไวรัสในกระแสเลือด และไม่ควรใช้ยาในกลุ่มแอสไพริน หรือ non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) เนื่องจากจะทำให้เลือดออกในกระเพาะอาหารและทำให้เกล็ดเลือดของผู้ป่วยทำงานผิดปกติเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การให้สารน้ำชดเชยอย่างเพียงพอ ในกรณีที่ผู้ป่วยดื่มน้ำได้ ควรให้ดื่มน้ำเกลือแร่หรือน้ำผลไม้ เนื่องจากอาจมีอาการอาเจียนร่วมด้วย ส่วนในกรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถดื่มน้ำได้ และมีอาการขาดน้ำ ควรพาผู้ป่วยไปโรงพยาบาล เพื่อให้รับสารน้ำในรูป hypotonic solution ในปริมาณที่ใช้แก้ภาวะขาดน้ำหรือให้สารน้ำชดเชยในปริมาณที่เพียงพอที่จะให้ระบบไหลเวียนเลือดสู่อวัยวะต่างๆ เป็นปกติ และควรให้มีการติดตามอาการของผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด ตรวจดูปริมาณเกล็ดเลือดและค่าฮีมาโตคริตเป็นระยะๆ เพื่อประเมินว่าเข้าสู่ระยะวิกฤตที่มีการรั่วของพลาสมาหรือไม่

2. **การให้การรักษาในระยะวิกฤตที่มีการรั่วของพลาสมา** โดยการให้สารน้ำในรูป Isotonic solution ที่มีน้ำตาลในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ทำให้การไหลเวียนของเลือดเป็นปกติ และให้มีการติดตามอาการอย่างใกล้ชิด หากมีการรั่วของพลาสมามาก ผู้ป่วยจะมีอาการช็อก ต้องรีบให้ออกซิเจน ร่วมกับการให้สารน้ำในรูปคริสตัลลอยด์ เช่น Normal saline, Ringer's lactate หรือ 5% D/NSS ในปริมาณ 10-20 มล./กก. ของน้ำหนักตัว/ชั่วโมง เป็นเวลานาน 1-2 ชั่วโมง แต่ถ้ากรณีที่อาการช็อกไม่ดีขึ้น และอาจมีเลือดออกในอวัยวะภายในหรือมีการรั่วของพลาสมาอย่างมาก ให้ทำการตรวจค่าฮีมาโตคริตเพื่อประเมินอาการ กล่าวคือ เมื่อตรวจพบว่าค่าฮีมาโตคริตต่ำลงมาก แสดงว่าอาจมีเลือดออกในอวัยวะภายใน ควรให้ packed red cells 10 มล./กก. นาน 3-4 ชั่วโมง แต่ถ้าในกรณีค่าฮีมาโตคริตไม่ลดลงหรือสูงขึ้น แสดงว่ามีการรั่วของพลาสมาอย่างมาก ควรเปลี่ยนสารน้ำเป็น colloid เช่น Fresh Frozen Plasma (FFP), 5% albumin (อัลบูมิน) หรือสารแทนพลาสมา เช่น 10% Dextran-40 ขนาด 10-20 มล./กก.ของน้ำหนักตัว/ชั่วโมง แต่ถ้าในกรณีที่ผู้ป่วยมีเลือดออก

มากตามอวัยวะต่างๆ และมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ควรมีการให้ platelet concentration 0.2 ยูนิต/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว ส่วนกรณีที่ผู้ป่วยมีเลือดกำเดาไหลออกมาก ให้ทำการห้ามเลือดด้วยวิธี anterior nasal packing ร่วมกับการให้ยา Tranexamic acid ขนาด 10-25 มก./กก.ของน้ำหนักตัว ทุก 6 ชั่วโมง และในกรณีที่ผู้ป่วยมีเลือดประจำเดือนออกมาก ให้ใช้ยาฮอร์โมนเพื่อหยุดประจำเดือน ซึ่งควรให้นานอย่างน้อย 7-10 วันจนกว่าระดับเกล็ดเลือดจะกลับมาเป็นปกติ

3. **การให้การรักษาในระยะฟื้นตัว** ซึ่งเป็นระยะที่มีการย้ายกลับของพลาสมาเข้าสู่กระแสเลือด ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการทั่วไปดีขึ้น ควรหยุดการให้สารน้ำทางหลอดเลือดดำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันภาวะน้ำเกิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research) โดยการวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

ประชากรศึกษา

เป็นตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยที่เหลือจากการเข้ารับการตรวจในโรงพยาบาลทั้งหมด 3 แห่ง คือ โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น โรงพยาบาลในจังหวัดอยุธยา และโรงพยาบาลในจังหวัดบุรีรัมย์ รวมทั้งสิ้น 329 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 : Single specimen เป็นการเก็บตัวอย่างซีรั่มเฉพาะระยะที่ผู้ป่วยแสดงอาการ (Pre) หรือ ระยะ Acute febrile phase เช่น มีไข้สูง ปวดศีรษะ เป็นต้น มีจำนวน 237 ตัวอย่าง
- กลุ่มที่ 2 : Paired sera เป็นการเก็บตัวอย่างซีรั่ม 2 ระยะ คือ ระยะที่ผู้ป่วยแสดงอาการ (Pre) หรือ ระยะ Acute febrile phase และระยะหลังจากที่ผู้ป่วยอาการดีขึ้น (Post) หรือ ระยะ Convalescence phase มีจำนวน 92 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างซีรั่มที่เหลือจากงานตรวจบริการของโรงพยาบาลจะมีการเก็บไว้เป็นนิรนาม ซึ่งมีข้อมูลเฉพาะอายุ เพศ และผลการวินิจฉัยเบื้องต้นเท่านั้น

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. **วัสดุและสารเคมีสำหรับการตรวจสอบ NS1 Ag, IgM/IgG และ IgA ด้วยวิธี Rapid test**
   - SD BIOLINE Dengue Duo (NS1 Ag and IgM/IgG) Rapid Test (Standard Diagnostics, Inc., Korea)
   - SD BIOLINE Dengue IgA Test (Standard Diagnostics, Inc., Korea)
2. **วัสดุและสารเคมีสำหรับการตรวจสอบ Dengue IgM/IgG ด้วยวิธี ELISA**
   - SD Dengue IgM/IgG Capture ELISA (Standard Diagnostics Inc., Korea)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัด RNA (RNA extraction)

- Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)

4. สารเคมีสำหรับการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription

- Improm-II™ Reverse transcriptase (Promega, USA)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, USA)
- Random Primers (Promega, USA)
- dNTP ; set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, USA)

5. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR

- Eppendorf Mastermix (2.5x) (Eppendorf, Germany)
- Boric acid (USB, Hongkong)
- Tris base Biotechnology Grade (USB, Hongkong)
- EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
- Agarose molecular grade (Promega, USA)
- 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)
- Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

6. วัสดุและสารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

- HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)

7. วัสดุและสารเคมีสำหรับ Cloning

- Competent *E.Coli* cells
- pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)
- X-Gal (Promega, USA)
- IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendorf, Germany)
- Tryptone powder (Bio Basic Inc.)
- Yeast Extract (GIBCO)
- Agar Bacteriological (GIBCO)
- FastPlasmid Mini kit (Eppendorf, Germany)

8. สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma, Singapore)

- Absolute ethanol (Sigma, Singapore)
- Phosphate buffered saline (PBS Tablets) (Bio Basic Inc.)

9. วัสดุทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Pipette tip: 10 µl, 200 µl และ 1,000 µl (Elkay, Ireland)
- Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, (AxyGEN, USA)
- Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay,Ireland)
- Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)
- Flask: 250ml, 500ml, 1000 ml (Pyrex, USA)
- Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)
- cylinder: 25 ml,50 ml, 100 ml, 250 ml,500 ml, 1000ml (Pyrex, USA)
- Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- Parafilm (American Nation Can, USA)
- Plastic wrap
- Stirring-magnetic bar
- Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

10. อุปกรณ์ทั่วไปที่ใช้ในการวิจัย

- Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (5-20 µl), P100 (20-100 µl), P1000 (100-1000 µl) (Eppendorf, Germany)
- Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
- Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)
- Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- Eppendorf Mastercycle personal (Humburg, Germany)
- Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)

- Thermal paper (Bio-RAD, USA)
- Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)
- Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
- Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)
- PCR Cabinet (Augusta)
- Microwave oven (Sanyo)
- Water Purification equipment (Water pro PS, USA)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
- Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

11. โปรแกรมสำหรับ Bioinformatic และการวิเคราะห์ข้อมูล

- Clustal X program (version 1.8)
- Oligos primer design software (version 9.1)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1)
- Chromas Lite (version 2.01)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 5.0)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยทั้งหมด 329 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่ม Single specimen ที่เก็บเฉพาะระยะ Acute febrile phase จำนวน 237 ตัวอย่าง และกลุ่ม Paired specimen ที่เก็บทั้งระยะ Acute febrile phase และ Convalescence phase จำนวน 92 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไป Centrifuge 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด supernatant เก็บใส่ใน microtube 1.5 ml และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C

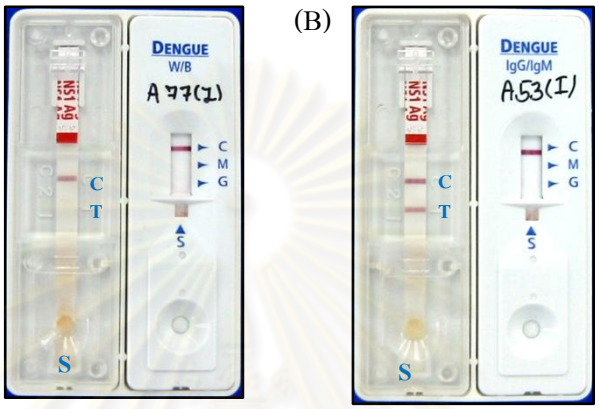
2. การตรวจหา NS1 Ag และ IgM/IgG ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบ Dengue Duo Rapid Test

- **SD BIOLINE Dengue NS1 Ag**

  นำสารเคมี ชุดทดสอบและตัวอย่างซีรั่มออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ dropper ดูดตัวอย่างซีรั่มประมาณ 100 µl หยด 3 หยดลงในช่อง " S " ที่แถบด้านซ้ายมือของชุดทดสอบ (ดังภาพที่ 9) จากนั้นทิ้งเอาไว้ประมาณ 15 – 20 นาที แล้วจึงแปลผล

การแปลผล ถ้าที่แถบด้านซ้ายมือของชุดทดสอบ มีเส้นสีม่วงปรากฏเพียงเส้นเดียว ในตำแหน่ง “ C ” หมายถึง ผลการตรวจหา NS1 Ag เป็นลบ (Negative result) ดังภาพที่ 9(A) แต่ถ้าเส้นสีม่วงปรากฏทั้งตำแหน่ง “ C ” และ “ T ” หมายถึง ผลการตรวจหา NS1 Ag เป็นบวก (Positive result) ดังภาพที่ 9(B)

(A) (B)



C = Control

T = NS1 Ag

M = IgM

G = IgG

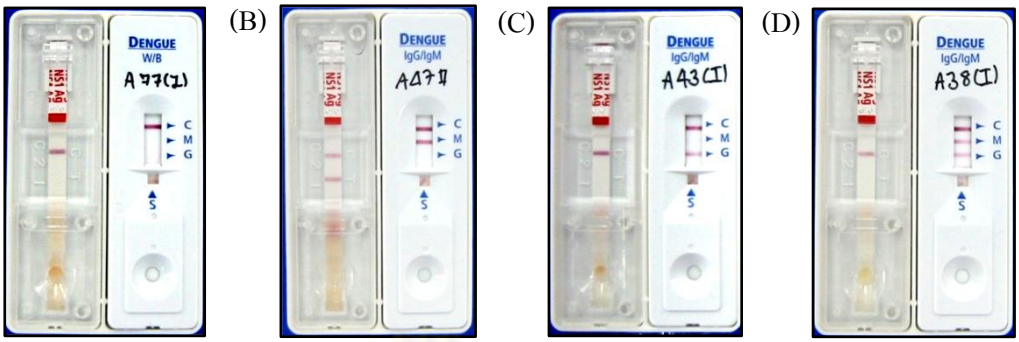
ภาพที่ 9 ตัวอย่างชุดทดสอบ SD BIOLINE Dengue Duo Rapid Test และการแปลผล NS1 Ag ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ (A) ผลการตรวจหา NS1 Ag เป็นลบ (B) ผลการตรวจหา NS1 Ag เป็นบวก

- **SD BIOLINE Dengue IgM/IgG**

นำสารเคมี ชุดทดสอบและตัวอย่างซีรั่มออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้หลอด capillary ดูดตัวอย่างซีรั่มประมาณ 10 µl หยอดลงในช่อง “ S ” ที่แถบด้านขวามือของชุดทดสอบ (ดังภาพที่ 10) จากนั้นหยดสารละลาย diluent ลงในช่องรูปวงกลม 4 หยด (ประมาณ 90 – 120 µl) ทิ้งเอาไว้ประมาณ 15 – 20 นาที แล้วจึงแปลผล

การแปลผล ถ้าที่แถบด้านขวามือของชุดทดสอบ มีเส้นสีม่วงปรากฏเพียงเส้นเดียวที่ตำแหน่ง “ C ” หมายถึง ผลการตรวจหา IgM และ IgG เป็นลบ (Negative result) ดังภาพที่ 10(A) แต่ถ้าเส้นสีม่วงปรากฏที่ตำแหน่ง “ C ” และ “ M ” หมายถึง ผลการตรวจหา IgM เป็นบวก (Positive result) ดังภาพที่ 10(B) ในกรณีเดียวกัน ถ้าเส้นสีม่วงปรากฏที่ตำแหน่ง “ C ” และ “ G ” ก็จะหมายถึง ผลการตรวจหา IgG เป็นบวก ดังภาพที่ 10(C) แต่ถ้าเส้นสีม่วงปรากฏทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ “ C ”, “ M ” และ “ G ” จะหมายถึง ผลการตรวจหาทั้ง IgM และ IgG เป็นบวก ดังภาพที่ 10(D)

(A) (B) (C) (D)



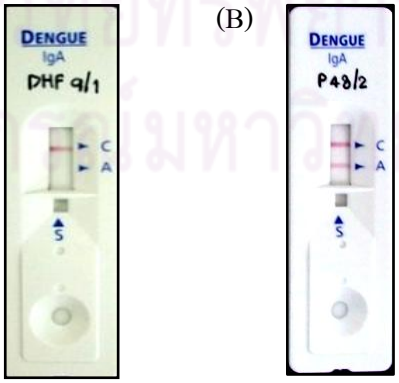
ภาพที่ 10 ตัวอย่างชุดทดสอบ SD BIOLINE Dengue Duo Rapid Test และการแปลผล IgM/IgG ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ (A) ผลการตรวจหา IgM และ IgG เป็นลบ (B) ผลการตรวจหา IgM เป็นบวก (C) ผลการตรวจหา IgG เป็นบวก (D) ผลการตรวจหา IgM และ IgG เป็นบวก

3. การตรวจหา IgA ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบ Dengue IgA Rapid Test

นำสารเคมี ชุดทดสอบและตัวอย่างซีรั่มออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้หลอด capillary ดูดตัวอย่างซีรั่มประมาณ 5 µl หยอดลงในช่อง " S " ของชุดทดสอบ (ดังภาพที่ 11) จากนั้นหยดสารละลาย diluent ลงในช่องรูปวงกลม 3 - 4 หยด (ประมาณ 90 – 120 µl) ทิ้งเอาไว้ประมาณ 15 – 20 นาที แล้วจึงแปลผล

การแปลผล ถ้ามีเส้นสีม่วงปรากฏเพียงเส้นเดียวที่ตำแหน่ง " C " หมายถึง ผลการตรวจหา IgA เป็นลบ (Negative result) ดังภาพที่ 11(A) แต่ถ้าเส้นสีม่วงปรากฏทั้งตำแหน่ง " C " และ " A " หมายถึง ผลการตรวจหา IgA เป็นบวก (Positive result) ดังภาพที่ 11(B)

(A) (B)

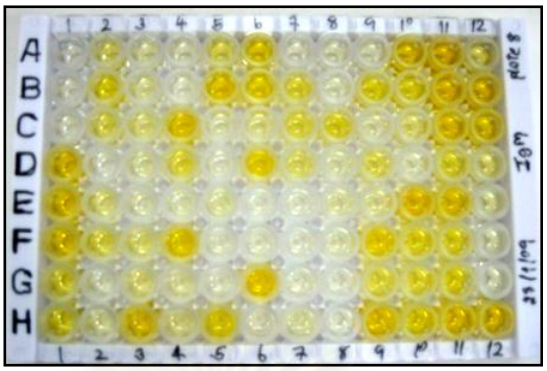


C = Control line

A = Dengue IgA test

ภาพที่ 11 ตัวอย่างชุดทดสอบ SD BIOLINE Dengue IgA Test และการแปลผล IgA ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ (A) ผลการตรวจหา IgA เป็นลบ (B) ผลการตรวจหา IgA เป็นบวก

4. การตรวจหา IgM/IgG ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี ELISA



ภาพที่ 12 ตัวอย่างชุดทดสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ SD Dengue IgM/IgG Capture ELISA

1) นำตัวอย่างซีรั่มที่ต้องการตรวจสอบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด
2) ผสม Negative control หรือ Positive control หรือ ตัวอย่างซีรั่ม 5 µl กับ Diluent 495 µl ในอัตราส่วน 1:100 ให้เข้ากัน
3) ใส่ Diluted samples 100 µl ในแต่ละ well (ดังภาพที่ 12) ภายใน 10 นาที จากนั้นปิดฝาครอบ แล้วผสมให้เข้ากัน จึงนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที
4) ในระหว่างที่ incubate จะทำการเตรียมสารต่างๆ ดังนี้
   - ละลายผง Dengue Antigen 60 µg ด้วย Conjugate diluent 1.5 ml
   - ผสม Anti-Dengue HRP conjugate กับ diluted Dengue Antigen ในอัตราส่วน 1:1 (6 ml : 6 ml สำหรับ 96 wells) ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที
   - ผสม Washing solution กับ DW ในอัตราส่วน 1 : 20 (50 ml : 950 ml) ให้เข้ากัน
5) Wash 350 µl ในแต่ละ well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย Washing solution จากนั้นเท Washing solution ใน well plate ทิ้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู่
6) ใส่ Anti-Dengue HRP conjugate solution 100 µl ในแต่ละ well ปิดฝาครอบ และผสมให้เข้ากัน จากนั้น incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที
7) Wash 350 µl ในแต่ละ well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย Washing solution จากนั้นเท Washing solution ใน well plate ทิ้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู่
8) ทำการผสม TMB Substrate A กับ B ในอัตราส่วน 1 : 1 (5 ml : 5 ml สำหรับ 96 wells) ให้เข้ากัน ก่อนจะใส่ TMB solution 100 µl ในแต่ละ well
9) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ในที่มืด
10) ใส่ Stopping solution 100 µl ในแต่ละ well
11) วัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายใน 30 นาที

5. การสกัด RNA (RNA extraction)

1) แบ่งตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยมา 200 µl แต่ถ้ามีปริมาณตัวอย่างซีรั่มน้อยกว่า 200 µl ให้ปรับด้วย Phosphate buffered saline (PBS)
2) ใส่ Lysis buffer 400 µl นำไป vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3) ใส่ 95% EtOH 500 µl แล้วนำไป vortex
4) แบ่ง mixture ใส่ VB column ครั้งละ 550 µl แล้วจึงนำไป Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำเช่นนี้ 2 รอบ
5) เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้วใส่ Isopropanol buffer 400 µl ใน VB column ก่อนนำไป Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 1 นาที
6) เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้วใส่ Wash buffer 600 µl ใน VB column ก่อนนำไป Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 1 นาที
7) เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้ filter membrane แห้ง
8) เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้วเปลี่ยน VB column ใส่ Microtube ใหม่
9) ใส่ free RNase water หรือ DepC water 50 µl ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที
10) จะได้ RNA ของไวรัสเดงกี่อยู่ใน elution buffer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

6. การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription โดยใช้ Random hexamer

1) ผสม RNA Template 5 µl, 0.5 µg/µl Random Primer 1 µl และ DepC water 5 µl ให้เข้ากัน
2) Heat ที่ 70°C เป็นเวลา 5 นาที
3) แช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที
4) ใส่ mixture 12.5 µl สำหรับทำให้เป็น cDNA โดย mixture นี้ จะเตรียมมาจาก
   - DW 2.5 µl
   - Reverse transcription buffer 3.5 µl
   - 3 mM $MgCl_2$ 2.5 µl
   - 0.5 mM dNTP 2.5 µl
   - 1 µg/µl RNase inhibitor 0.5 µl
   - Reverse transcriptase 1 µl
5) ตั้งทิ้งไว้ที่ 25°C เป็นเวลา 5 นาที (ขั้น **Annealing**)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6) Heat ที่ 42°C เป็นเวลา 60 นาที (ขั้น **Extension**)

7) Heat ที่ 70°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อ inactivate เอนไซม์ ก็จะได้ cDNA ของไวรัสเดงกี่

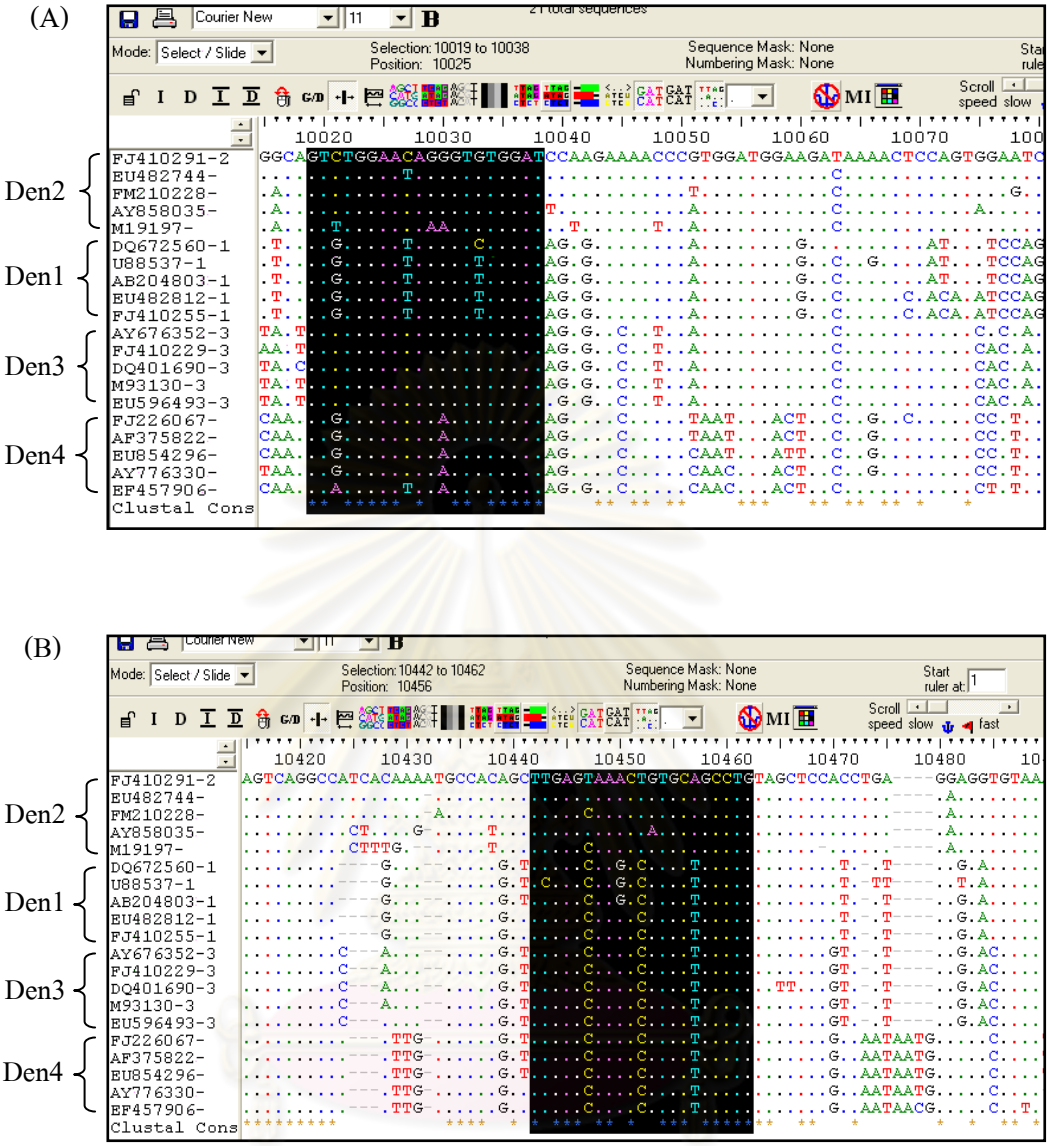
7. การออกแบบไพรเมอร์ (Primers)

การศึกษาครั้งนี้จะทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยพร้อมกับจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี semi-nested PCR โดยจะเลือกออกแบบที่บริเวณยีน Nonstructural protein 5 (NS5) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีเอนไซม์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน RNA ของไวรัส

ขั้นแรกจะทำการสุ่มเลือกลำดับเบสของเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ละ 5 ตัวอย่าง) จากฐานข้อมูล Genbank มาทำการ alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit sequence alignment editor จากนั้นเลือกบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดหรือมีบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) กันในแต่ละสายพันธุ์มากที่สุด ซึ่งจะมีความยาวประมาณ 17 - 28 bases โดยจะต้องมีค่า GC content ประมาณ 50-60% และที่บริเวณปลาย 3′ ควรจะมี G, C หรือ GC เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับ รวมทั้งควรมีค่า melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 55-75 °C ด้วย โดยที่ไพรเมอร์คู่เดียวกันนั้นควรจะมีค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งการคำนวณค่า Tm สามารถคำนวณตามสูตรได้ดังนี้

$$Tm = 2^{o}C \times (A+T) + 4^{o}C \times (G+C)$$

จากการออกแบบไพรเมอร์ บริเวณยีน NS5 ทำให้ได้ Forward primer ที่ตำแหน่ง 10019-10038 มีลำดับเบส คือ 5′-GTSTGGAAYAGRGTKTGGAT-3′ ดังภาพที่ 13(A) และ Reverse primer ที่ตำแหน่ง 10442-10462 มีลำดับเบส คือ 5′-CAGGCWGCACRGY TTRCTCAA-3′ ดังภาพที่ 13(B) ซึ่งทำให้สามารถจำแนกไวรัสเดงกี่ได้ 4 สายพันธุ์ โดยมีขนาด product ที่ต่างกัน คือ สายพันธุ์ที่ 1: 434 bp, สายพันธุ์ที่ 2: 420 bp, สายพันธุ์ที่ 3: 417 bp และสายพันธุ์ที่ 4: 358 bp นอกจากการตรวจหาด้วยวิธี semi-nested PCR ที่บริเวณยีน NS5 ดังกล่าวข้างต้น ยังมีการตรวจหาโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่มีการออกแบบในการศึกษาก่อนหน้านี้ที่บริเวณอื่นๆ คือ บริเวณ 3′UTR (Chutinimitkul S, *et al.*, 2005) [49] และยีน NS1 (Yenchitsomanus P, *et al.*, 1996) [50] ด้วย



ภาพที่ 13 การเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ของบริเวณยีน NS5

(A) ตำแหน่งของ Forward primer (B) ตำแหน่งของ Reverse primer

8. การตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี RT-PCR

8.1 บริเวณ 3′UTR และ NS1 gene

การตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะของเชื้อไวรัสเดงกี่ในบริเวณ 3′UTR ด้วยวิธี semi-nested PCR และในบริเวณยีน NS1 ด้วยวิธี nested PCR ดังรายละเอียดของ Primers ที่แสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR บริเวณ 3′UTR [49]

Primer Name	Sequence (5′ --> 3′)	Type	base	PCR	
Den3_UTRF (DenF)	TTAGAGGAGACCCCTCCC	Forward	18	1st	2nd
Den3_UTRR$_2$ (DenR$_2$)	GAGACAGCAGGATCTCTGG	Reverse	19	1st	-
Den3_UTRR (DenR)	TCTCCTCTAACCTCTAGTCC	Reverse	20	-	2nd

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ในการทำ nested PCR บริเวณยีน NS1 [50]

Primer Name	Sequence (5′ --> 3′)	Type	base
DNS1_UF (3004-3029)	CATGCTGATATGGGTTATTGGATAGA	Forward	26
DNS1_UR (3406-3430)	GTCTGATTTCCATCCCGTACCAGCA	Reverse	25
DNS1_NF (3099-3124)	AAAGTCACACACTCTATGGAGCAATG	Forward	26
DNS1_NR (3302-3326)	GTGGTTGTTCTTAAAGAGGGTCCTC	Reverse	25

โดย Primers; DNS1_UF และ DNS1_UR ใช้สำหรับ 1st PCR (outer) ส่วน Primers; DNS1_NF และ DNS1_NR ใช้สำหรับ 2nd PCR (inner)

จากนั้นนำ PCR tube ใส่ส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงส่วนผสมสารเคมีสำหรับการทำ RT-PCR ของบริเวณ 3′UTR และยีน NS1

สารเคมี (ใช้ทั้ง 1st และ 2nd PCR)	3′UTR (µl/tube)	NS1 (µl/tube)
Distilled water	6	6
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	5	5
10 µM Forward primer*	0.25	0.25
10 µM Reverse primer**	0.25	0.25
25 mM $MgCl_2$	0.5	1
cDNA template	1	1

* Forward primer สำหรับการทำ RT-PCR บริเวณ 3′UTR จะใช้ Den3_UTRF ทั้ง 1st และ 2nd PCR ส่วนบริเวณยีน NS1 จะใช้ DNS1_UF ใน 1st PCR และ DNS1_NF ใน 2nd PCR

** Reverse primer สำหรับการทำ RT-PCR บริเวณ 3′UTR จะใช้ Den3_UTRR$_2$ ใน 1st PCR และ Den3_UTRR ใน 2nd PCR ส่วนบริเวณยีน NS1 จะใช้ DNS1_UR ใน 1st PCR และ DNS1_NR ใน 2nd PCR

จากนั้นนำ PCR tube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดแล้ว ใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ RT-PCR ในบริเวณ 3′UTR และยีน NS1

PCR cycle (ใช้ทั้ง 1st และ 2nd PCR)	**3′UTR**		**NS1 gene**		
	อุณหภูมิ	**เวลา**	**อุณหภูมิ**	**เวลา**	
Initial-denaturation	94°C	5 นาที	94°C	5 นาที	
Denaturation	94°C	30 วินาที	94°C	1 นาที	ทำซ้ำ 40 รอบ
Annealing	53°C	30 วินาที	45°C	1 นาที	
Extension	72°C	30 วินาที	72°C	1 นาที	
Final-extension	72°C	10 นาที	72°C	7 นาที	
Cool down	25°C	5 นาที	25°C	5 นาที	

8.2 บริเวณ NS5 gene

การตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะของเชื้อไวรัสเดงกี่ในบริเวณยีน NS5 ด้วยวิธี semi-nested PCR เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี่ ดังจะแสดงรายละเอียดของ Primers ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5

Primer Name	**Sequence (5′ --> 3′)**	**Type**	**base**	**PCR**	
DenF10019 (10019-10038)	GTSTGGAAYAGRGTKTGGAT	Forward	20	1st	2nd
Den3_UTRR$_2$ (10620-10638)	GAGACAGCAGGATCTCTGG	Reverse	19	1st	-
DenR10442 (10442-10462)	CAGGCWGCACRGYTTRCTCAA	Reverse	21	-	2nd

จากนั้นนำ PCR tube ใส่ส่วนผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมสารเคมีสำหรับการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5

สารเคมี (ใช้ทั้ง 1st และ 2nd PCR)	ปริมาตร (µl/tube)
Distilled water	6
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	5
10 µM Forward primer*	0.3
10 µM Reverse primer**	0.3
25 mM $MgCl_2$	0.5
cDNA template	0.5

* Forward primer สำหรับการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5 จะใช้ DenF10019 ทั้ง 1st และ 2nd PCR

** Reverse primer สำหรับการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5 จะใช้ $Den3_UTRR_2$ ใน 1st PCR ส่วน DenR10442 ใน 2nd PCR

จากนั้นนำ PCR tube ที่ใส่ส่วนผสมสารเคมีทั้งหมดแล้ว ใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ semi-nested PCR บริเวณยีน NS5

PCR cycle (ใช้ทั้ง 1st และ 2nd PCR)	NS5 gene		
	อุณหภูมิ	เวลา	
Initial-denaturation	95°C	5 นาที	
Denaturation	95°C	30 วินาที	ทำซ้ำ 40 รอบ
Annealing	50°C	30 วินาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final-extension	72°C	7 นาที	
Cool down	25°C	5 นาที	

9. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

1) นำ PCR product ที่ได้มาทำการแยกด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker แล้วย้อมดูแถบ DNA ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เพื่อตรวจสอบขนาดของ DNA ที่ต้องการ

2) นำ gel ไปส่องดูภายใต้ UV แล้วทำการตัด gel บริเวณที่มีแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการ
   - 3′UTR ได้ DNA ขนาดประมาณ 100 bp
   - ยีน NS1 ได้ DNA ขนาด 228 bp
   - ยีน NS5 ได้ DNA 4 ขนาด ซึ่งจำแนกตามสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ คือ DENV1: 434 bp, DENV2: 420 bp, DENV3: 417 bp และ DENV4: 358 bp
3) DNA จาก gel ที่ตัดออกมา ทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit จากบริษัท RBC Bioscience Corp.
   - ละลาย gel ที่ตัดออกมาด้วย gel lysis buffer 500 µl โดยแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที
   - หลังจาก gel ละลายหมดแล้ว ดูดสารใส่ DF column แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 1 นาที
   - เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้วเติม Wash buffer 600 µl ก่อนนำไป Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำเช่นนี้ 2 รอบ)
   - เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้ filter membrane แห้ง
   - เปลี่ยน DF column ใส่ Microtube ใหม่ แล้วเติม Elution buffer 38 µl
   - ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที ก็จะได้ DNA ที่บริสุทธิ์
4) นำ DNA ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Cycle Sequencing) โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD จากนั้นใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.01) ในการแปลผล Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วจึงทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

โปรแกรมสำหรับ Bioinformatic และการวิเคราะห์ข้อมูล

1. Clustal X (version 1.8) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากการทำ DNA sequencing กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวอ้างอิง (References)
2. Oligos primer design software (version 9.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์
3. BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (Primers)

4. Chromas Lite (version 2.01) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการแปล ผล Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากการทำ DNA sequencing

10. การทำ phylogenetic analysis ในบริเวณยีน NS5 ของสายพันธุ์ไวรัสเดงกี่ที่ตรวจพบ

การวิเคราะห์นี้ใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor และ Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 5.0 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเดงกี่จากตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของเชื้อไวรัสเดงกี่ทุกสายพันธุ์ (DENV 1 - 4) ในฐานข้อมูล GenBank database เพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่จากตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย โดยการศึกษานี้กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ Neighbor-joining method, Model แบบ Nucleotide: Kimura-2 และค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

11. การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5

11.1 ความไว (Sensitivity)

1) คัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในแต่ละสายพันธุ์ (DENV1, 2, 3 และ 4) สายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง โดยดูจากผลการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 และที่ส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเป็นการยืนยันเรียบร้อยแล้ว
2) นำ cDNA ของตัวอย่างทุกสายพันธุ์มาทำ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ DenF10019 และ Den3_UTRR$_2$ (1st PCR) ดังตารางที่ 6 โดยใส่ส่วนผสมสารเคมี ดังตารางที่ 7 และนำลงเครื่อง Thermal cycler ซึ่งจะใช้อุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 8 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการแยกด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker แล้วย้อมดูแถบ DNA ด้วยสารละลาย Ethidium bromide ขนาดของ 1st PCR product ที่ได้ของ 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 1 = 667 bp, สายพันธุ์ที่ 2 = 658 bp, สายพันธุ์ที่ 3 = 647 bp และสายพันธุ์ที่ 4 = 604 bp
3) นำ 1st PCR product ที่เหลือของทั้ง 4 สายพันธุ์จากข้อ 2) มาทำ Cloning โดยใช้ pGEM-T Easy เป็น Vector
   - เตรียมส่วนผสมสารเคมี สำหรับ Ligation ระหว่าง PCR product กับ Plasmid (pGEM-T Easy) ดังนี้

- PCR product 5 µl
- 2x Rapid ligation Buffer 5 µl
- pGEM-T Easy vector 1 µl
- T4 DNA ligase 1 µl

- บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน
- Transformation โดยใส่ Vector ligation 5 µl ลงใน Competent cells ที่อยู่ในสารละลาย $CaCl_2$ 50 µl ก่อนนำไป chill ice เป็นเวลา 20 นาที แล้ว heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที จึงนำกลับมา chill ice อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที
- เติม SOC medium ปริมาตร 950 µl แล้วนำไป shaking ที่ประมาณ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 – 2 ชั่วโมง
- แล้วนำไป Centrifuge ที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท Supernatant ทิ้ง เหลือเฉพาะ pellet ประมาณ 100 µl
- เตรียม LB agar ที่ผสม Amplicilin, เติม IPTG 4 µl และ X-Gal 10 µl ให้เรียบร้อยก่อนนำ pellet มา spread plate จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- ทำการคัดเลือก colony โดยสังเกตดู colony ที่ขึ้นบน plate แล้วเลือกเฉพาะ colony ที่ใส pick colony นั้น ลงใน LB broth 2 ml
- นำไป shaking ที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4) ทำการสกัด plasmid (Plasmid Extraction) โดยใช้ FastPlasmid Mini kit

- นำ Bacterial culture 1.5 ml ไป Centrifuge ที่ 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที
- เท Supernatant ทิ้ง เหลือเฉพาะ pellet เติม lysis solution ที่แช่เย็น ปริมาตร 400 µl แล้วนำไป Vortex ประมาณ 30 วินาที
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ก่อนปิเปตสารละลาย lysate ลงใน spin column แล้ว Centrifuge ที่ 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที
- เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้วเติม diluted wash buffer ปริมาตร 400 µl จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที
- เท filtrate ใน Collect column ทิ้ง แล้วนำไป Centrifuge ที่ 13,000xg เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ Filter membrane แห้ง
- ย้าย Spin Column ไปยัง Microtube ใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 50 µl แล้วนำไป Centrifuge ที่ 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที
- จะได้ Plasmid DNA ที่บริสุทธิ์ ปริมาตร 50 µl

5) การวัดค่า OD และการคำนวณหาค่า Copies number

นำ Plasmid DNA บริสุทธิ์ มาวัดค่า OD (Optical Density) หรือค่าความเข้มข้นของ DNA ซึ่งจะมีการวัดค่า Absorbance ที่ 260 nm (A_{260}) ด้วย โดยค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 0.2 – 0.8 เนื่องจากเป็นช่วงที่ใช้สำหรับตรวจวัด DNA โดยเฉพาะ จากนั้นนำค่า OD มาคำนวณหาค่า Copies number โดยจะคำนวณตามสูตร

$$\text{Copies number} = \frac{\text{ค่า OD (g/µl) x } (6.02 \times 10^{23})}{(\text{Insert size} + \text{Vector size}) \times 660}$$

* ขนาด Insert ของสายพันธุ์ที่ 1 = 434 bp, สายพันธุ์ที่ 2 = 420 bp, สายพันธุ์ที่ 3 = 417 bp และสายพันธุ์ที่ 4 = 358 bp

* กำหนดให้ ค่าคงที่โมเลกุล = 6.02×10^{23}, ค่ามวลโมเลกุล DNA = 660 และขนาด Vector (pGEM-T Easy) = 3,015 bp

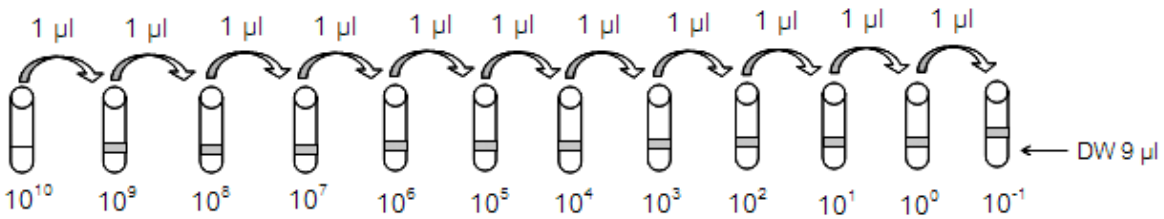
6) การคำนวณหาปริมาณและการทำ 10 fold-Serial dilution

นำค่า Copies number ที่คำนวณได้ของแต่ละสายพันธุ์มาคำนวณหาปริมาณสารตัวอย่าง เพื่อที่จะใช้ทำ 10 fold-Serial dilution จากความเข้มข้น 10^{10} copies/µl ซึ่งจะคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

* กำหนดให้ C_1 = ค่า Copies number ของแต่ละสายพันธุ์,
V_1 = ปริมาณสารตัวอย่างที่ต้องการหาเพื่อนำมาทำ 10 fold-Serial dilution,
C_2 = ความเข้มข้น 10^{10} copies/µl และ V_2 = ปริมาตรสุทธิ 20 µl

หลังจากนั้น ปรับปริมาตรสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{10} copies/µl ของแต่ละสายพันธุ์ให้มีปริมาตรสุทธิ 20 µl แล้วจึงนำมาทำ 10 fold-Serial dilution จากความเข้มข้น $10^{10} – 10^{-1}$ copies/µl โดยปิเปตสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{10} copies/µl มา 1 µl ใส่ลงใน tube ใหม่ที่มี distilled water 9 µl ก็จะได้ความเข้มข้น 10^{9} copies/µl ทำเช่นนี้ต่อไปจนถึงความเข้มข้น 10^{-1} copies/µl ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การทำ 10 fold-Serial dilution จากความเข้มข้น $10^{10} – 10^{-1}$ copies/µl

7) ตรวจสอบความไว (Sensitivity) ของไพรเมอร์จำเพาะด้วยวิธี semi-nested PCR

นำสารตัวอย่างของแต่ละสายพันธุ์จากความเข้มข้น 10^9 – 1 copies/µl มาทำ semi-nested PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 ดังตารางที่ 6 โดยใส่ส่วนผสมสารเคมี ดังตารางที่ 7 และนำลงเครื่อง Thermal cycler ซึ่งจะใช้อุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 8 แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้มาทำการแยกด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker และทำการย้อมดูแถบ DNA ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เพื่อตรวจสอบความไว (Sensitivity) ของไพรเมอร์จำเพาะนี้

11.2 ความจำเพาะ (Specificity)

คัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus) มาทำการสกัด RNA ด้วย Viral Nucleic Acid Extraction kit จากบริษัท RBC Bioscience Corp. แล้วทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription โดยใช้ Random hexamer เช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัด และ Reverse Transcription ของเชื้อไวรัสเดงกี่ที่ได้กล่าวข้างต้น จากนั้นนำ cDNA มาทำ semi-nested PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 ดังตารางที่ 6 โดยใส่ส่วนผสมสารเคมี ดังตารางที่ 7 และนำลงเครื่อง Thermal cycler ซึ่งจะใช้อุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 8 แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้มาทำการแยกด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker และทำการย้อมดูแถบ DNA ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เพื่อตรวจสอบความจำเพาะ (Specificity) ของไพรเมอร์นี้

12. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

จะวิเคราะห์ การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ จากตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย ด้วยชุดทดสอบ Rapid Test เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน โดยใช้ผลการตรวจหาแอนติบอดี IgM, IgG, IgA และ NS1 Antigen อ้างอิงกับช่วงระยะเวลาหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ ซึ่งจะทำให้ทราบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกกี่เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าทางสถิติที่เกี่ยวข้องกับ Diagnostic Test ได้แก่ ความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ค่าพยากรณ์บวก (Positive predictive value หรือ PPV) หมายถึง ค่าร้อยละของการทดสอบที่ได้ผลบวกแล้วมีโอกาสเป็นโรค, ค่าพยากรณ์ลบ (Negative predictive value หรือ NPV) หมายถึง ค่าร้อยละของ

การทดสอบที่ได้ผล ลบแล้วมีโอกาส ไม่เป็นโรค และความแม่นยำ (Accuracy) เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์ประสิทธิภาพและความถูกต้องของชุดทดสอบได้ ดังตารางที่ 9

		ผลการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน		
		Positive	Negative	Total
ผลการตรวจด้วยวิธีที่จะทำการทดสอบ	Positive	a	b	a + b
	Negative	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	a + b + c + d

ตารางที่ 9 แสดงค่าต่างๆ เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าทาง Diagnostic Test

จากนั้น นำค่าจากตารางที่ 9 มาแทนลงในสูตรเพื่อหา

ความไว (Sensitivity) = a / (a + c)

ความจำเพาะ (Specificity) = d / (b + d)

Positive predictive value (PPV) = a / (a + b)

Negative predictive value (NPV) = d / (c + d)

ความแม่นยำ (Accuracy) = (a + d) / (a + b + c + d)

โดย a หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค และให้ผลบวกในการตรวจ (True positive)

b หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรค แต่ให้ผลบวกในการตรวจ (False positive)

c หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค แต่ให้ผลลบในการตรวจ (False negative)

d หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรค และให้ผลลบในการตรวจ (True negative)

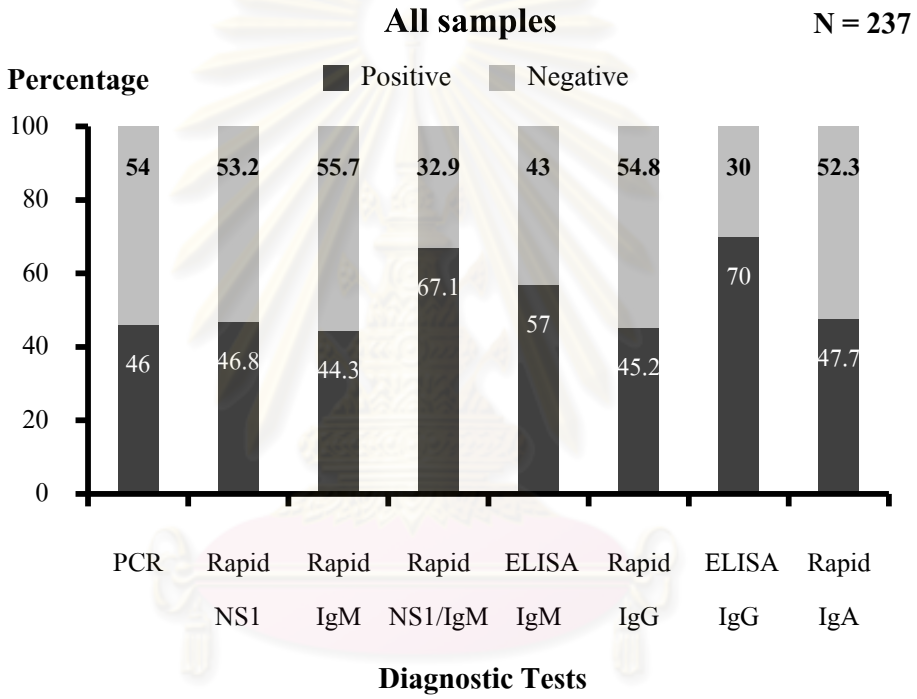
นอกจากนี้ การที่จะทราบประสิทธิภาพของ วิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วย เทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5 ได้ จำเป็นที่จะต้องวิเคราะห์จาก การตรวจสอบ หาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ตรวจสอบในบริเวณดังกล่าว

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Single specimens

จากการนำตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยแบบ Single specimens ที่มีการเก็บเฉพาะระยะ Acute febrile phase จำนวน 237 ตัวอย่าง มาตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี Rapid Test, เทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในภาพที่ 15

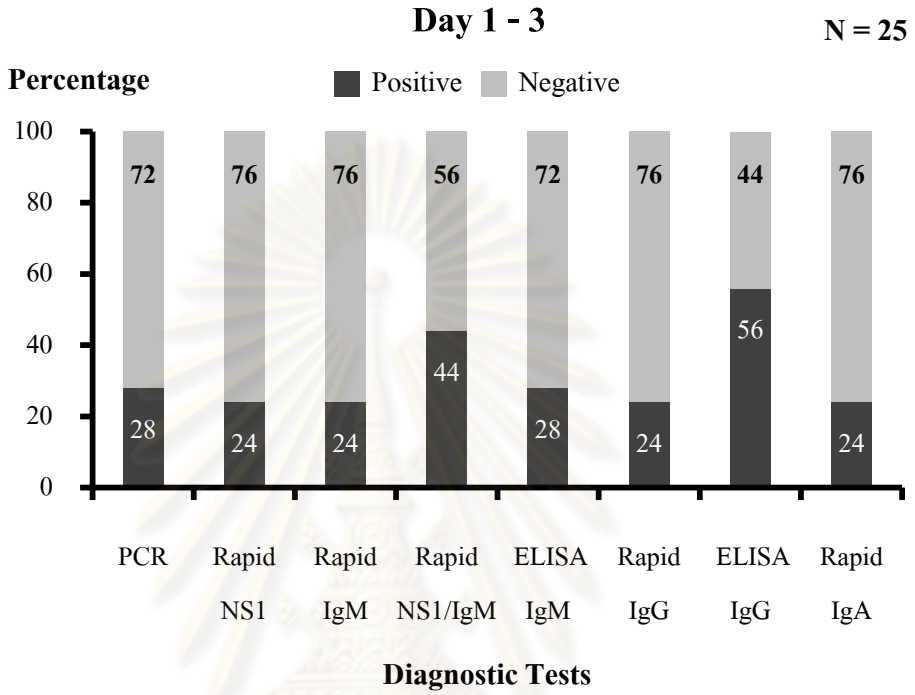


ภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Single specimens ทั้งหมด (n = 237)

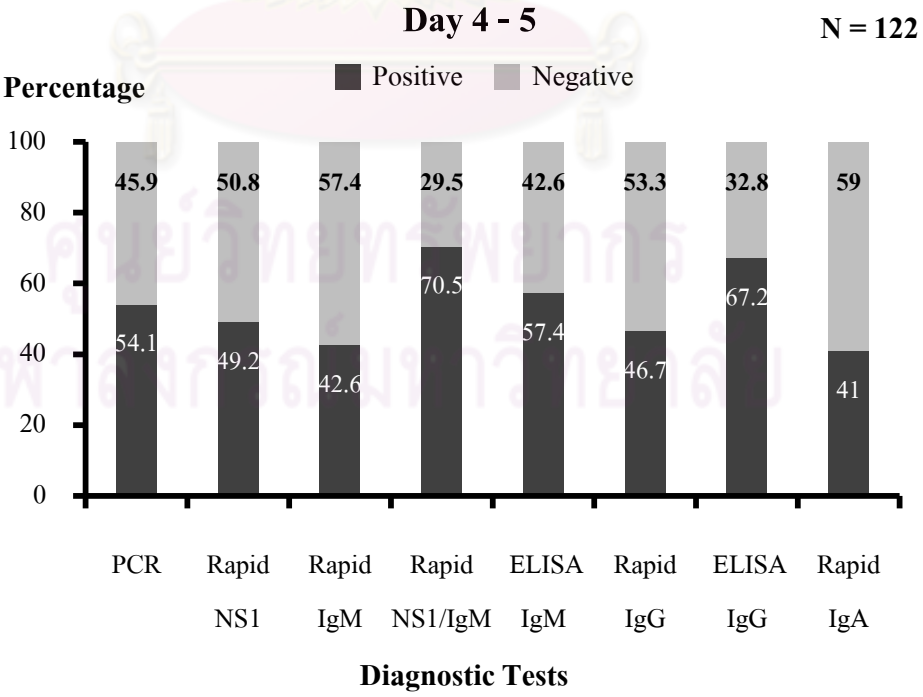
จากผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยจำนวน 237 ตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าให้ผลเป็นบวก 46% (109/237) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid Test ที่ให้ผลบวก 46.8% (111/237) ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test และ IgM ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวก 44.3% (105/237) และ 57% (135/237) ตามลำดับ แต่เมื่อนำผลการตรวจสอบที่เป็นบวกของทั้ง NS1 และ/หรือ IgM Rapid Test มาเปรียบเทียบ จะพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นถึง 67.1% (159/237) อีกทั้งมีการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบด้วยวิธี IgG Rapid Test และ IgG ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวกค่อนข้างแตกต่างกันมาก คือ 45.2% (107/237) และ 70% (166/237) ตามลำดับ นอกจากนี้ การตรวจสอบด้วยวิธี IgA Rapid Test พบว่าให้ผลเป็นบวก 47.7% (113/237)

หลังจากนั้น นำผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย ซึ่งจำแนกเป็น 3 กลุ่มตามวันหลังจากแสดงอาการมีไข้ คือ วันที่ 1 – 3, 4 – 5 และ 6 – 7 มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในภาพที่ 16(A - C)

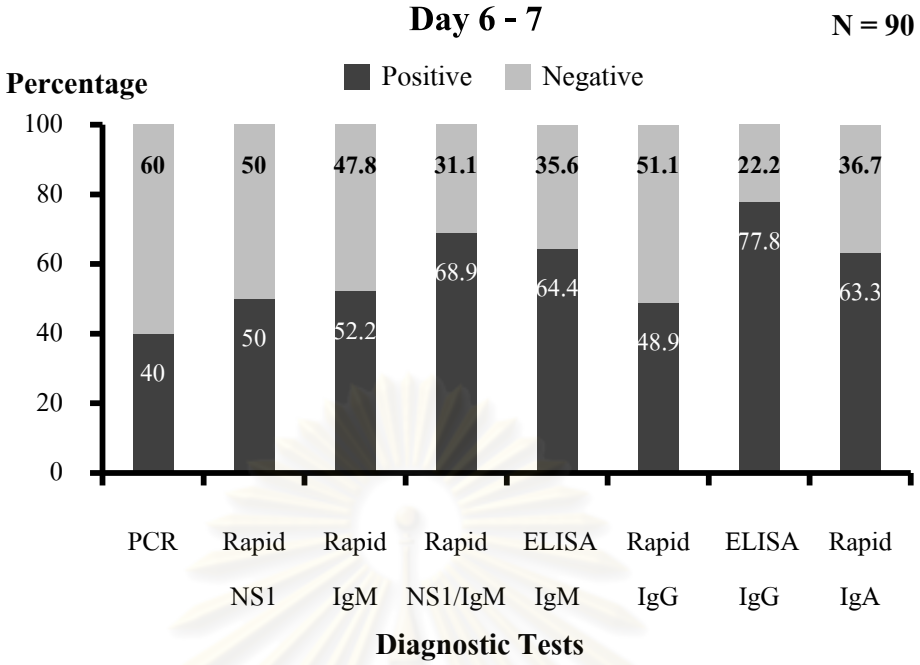
(A)



(B)



(C)



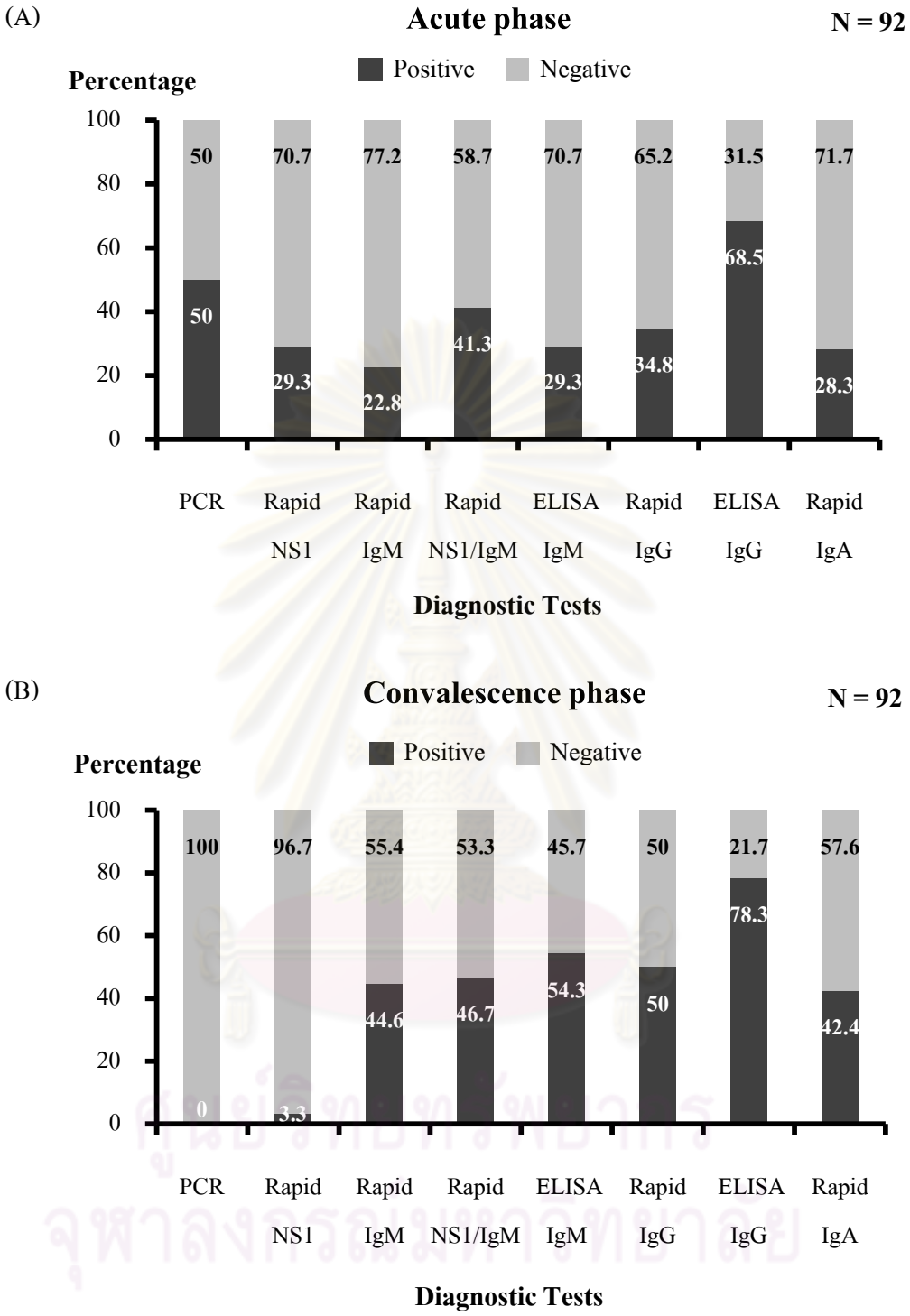
ภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Single specimens ตามวันหลังจากแสดงอาการมีไข้ (A) วันที่ 1 – 3; n = 25 (B) วันที่ 4 – 5; n = 122 (C) วันที่ 6 – 7; n = 90

จากผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ให้ผลเป็นบวกเพิ่มขึ้นจาก 28% ในวันที่ 1 – 3 เป็น 54.1% ในวันที่ 4 – 5 แล้วลดลงเหลือ 40% ในวันที่ 6 – 7 หลังจากแสดงอาการมีไข้ ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ ได้แก่ NS1 Rapid Test, IgM Rapid Test, IgM ELISA, IgG Rapid Test, IgG ELISA และ IgA Rapid Test ให้ผลเป็นบวกเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับวันหลังจากแสดงอาการมีไข้ กล่าวคือ การตรวจสอบด้วยวิธี IgM ELISA ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นจาก 28% ในวันที่ 1 – 3 เป็น 57.4% ในวันที่ 4 – 5 และ 64.4% ในวันที่ 6 – 7 หลังจากแสดงอาการมีไข้

นอกจากนี้ ผลการตรวจสอบของ NS1 และ/หรือ IgM Rapid Test ที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังจากแสดงอาการมีไข้ พบว่า ให้ผลเป็นบวกสูงกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid Test หรือ IgM Rapid Test เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

2. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Paired specimens

จากการนำตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยแบบ Paired specimens ที่แบ่งการเก็บเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ Acute febrile phase และระยะ Convalescence phase ทั้งหมดจำนวน 92 ตัวอย่าง มาตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี Rapid Test, เทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในภาพที่ 17(A - B)



<u>ภาพที่ 17</u> ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Paired specimens จำนวน 92 ตัวอย่าง (A) ระยะ Acute febrile phase (B) ระยะ Convalescence phase

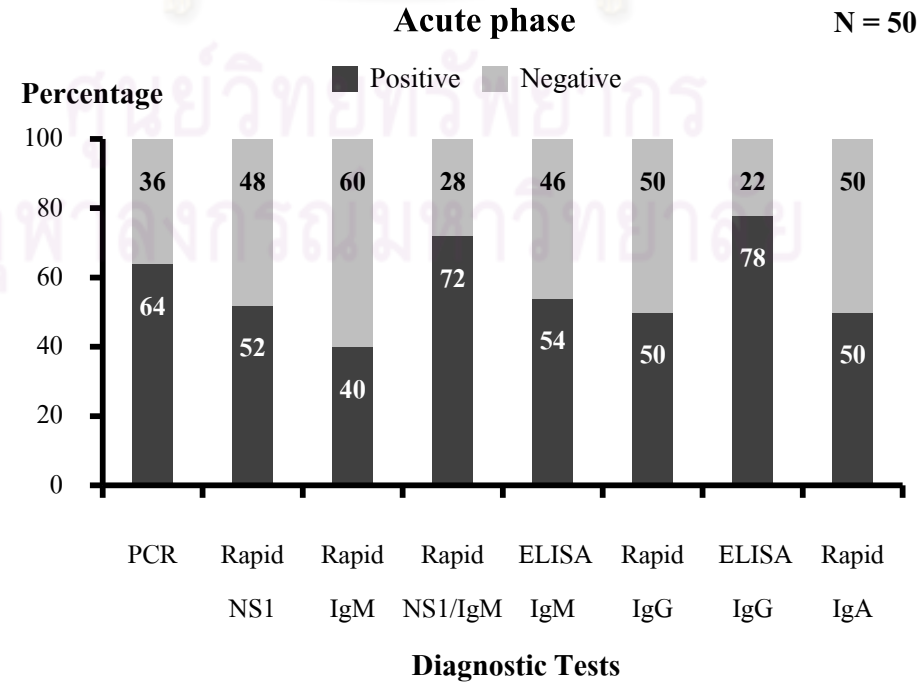
จากผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในระยะ Acute febrile phase ด้วยเทคนิค RT-PCR และวิธี NS1 Rapid Test พบว่า ให้ผลเป็นบวกต่างกันมาก คือ 50%

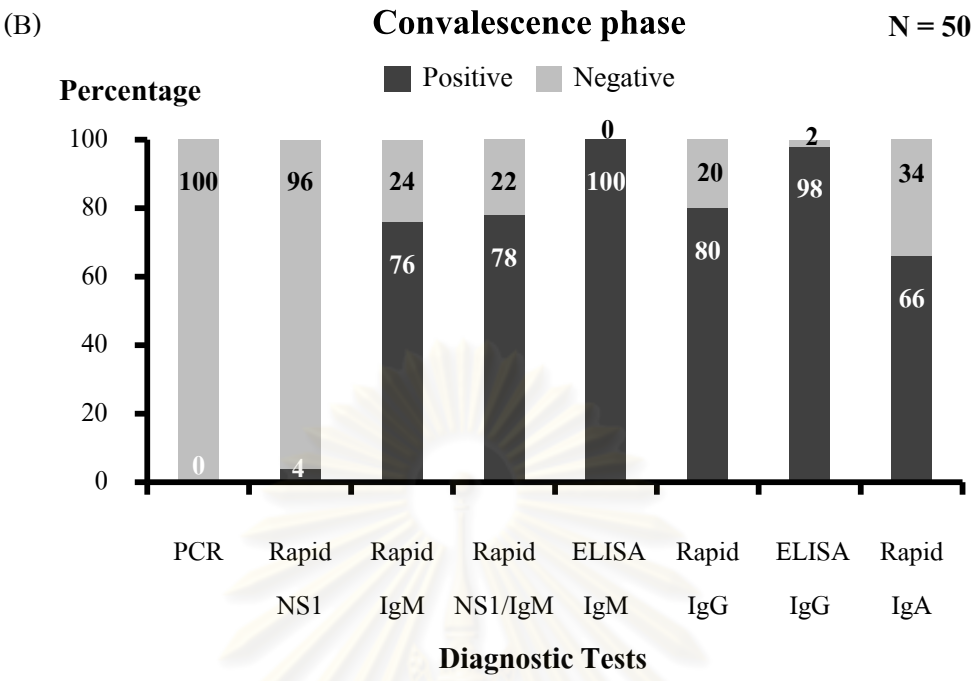
(46/92) และ 29.3% (27/92) ตามลำดับ ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test พบว่าให้ผลเป็นบวก 22.8% (21/92) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการตรวจสอบด้วยวิธี IgM ELISA ที่ให้ผลบวก 29.3% (27/92) และเมื่อนำผลการตรวจสอบของ NS1 และ/หรือ IgM Rapid Test มาเปรียบเทียบ พบว่า ให้ผลเป็นบวกสูงขึ้นถึง 41.3% (38/92) นอกจากนี้ การตรวจสอบด้วยวิธี IgG Rapid Test, IgG ELISA และ IgA Rapid Test ให้ผลเป็นบวก 34.8% (32/92), 68.5% (63/92) และ 28.3% (26/92) ตามลำดับ

ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในระยะ Convalescence phase ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ให้ผลเป็นลบ หรือพบผลบวกเพียง 3.3% (3/92) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid Test แต่ในทางกลับกัน การตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test และ IgM ELISA ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นเป็น 44.6% (41/92) และ 54.3% (50/92) ตามลำดับ รวมถึงผลการตรวจสอบของ NS1 และ/หรือ IgM Rapid Test พบว่า ให้ผลบวก 46.7% (43/92) นอกจากนี้การตรวจสอบด้วยวิธี IgG Rapid Test, IgG ELISA และ IgA Rapid Test ก็ให้ผลเป็นบวกเพิ่มขึ้นเช่นกัน คือ 50% (46/92), 78.3% (72/92) และ 42.4% (39/92) ตามลำดับ

แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจหาแอนติบอดี IgM ในระยะ Convalescence phase ของตัวอย่างที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ควรจะให้ผลเป็นบวกเสมอ ดังนั้น จึงทำการวิเคราะห์โดยใช้การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี IgM ELISA เป็นเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยจำนวน 50 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งหมด 92 ตัวอย่างให้ผลเป็นบวกต่อการตรวจสอบด้วยวิธี IgM ELISA แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับผลจากการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 18 (A - B)

(A)





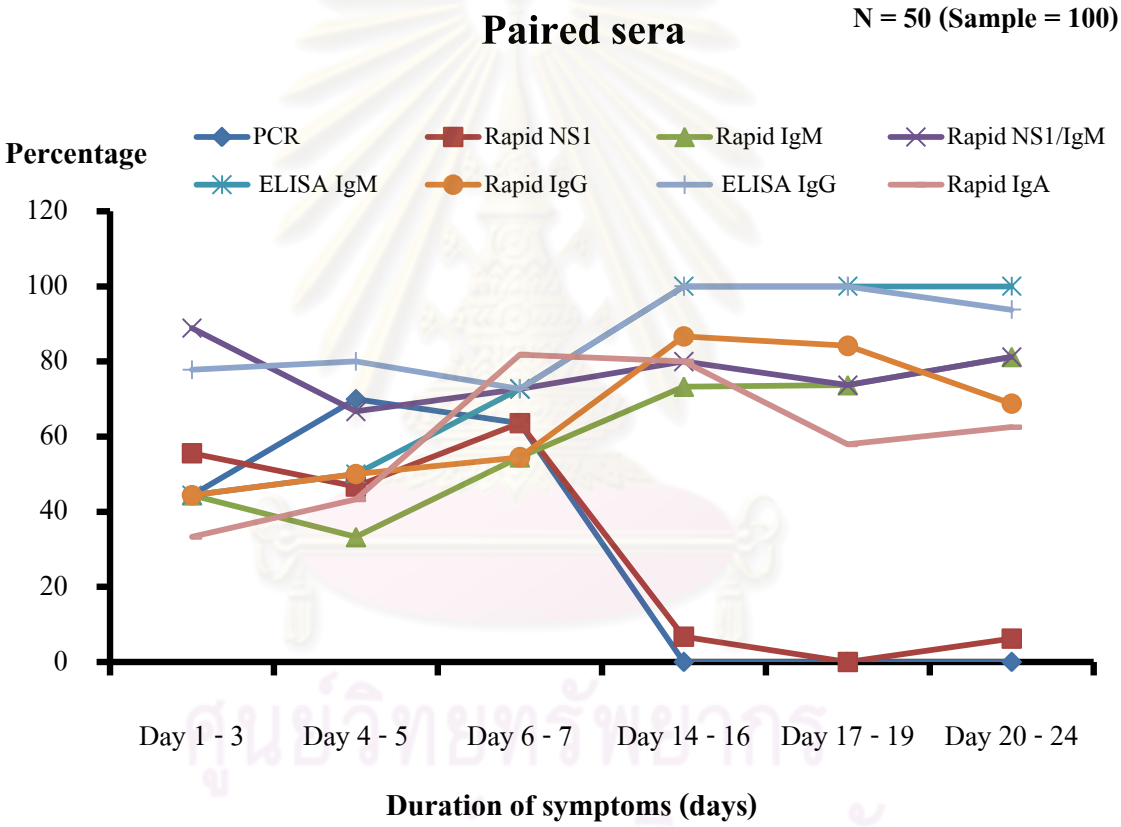
ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบใน Paired specimens จำนวน 50 ตัวอย่าง (A) ระยะ Acute febrile phase (B) ระยะ Convalescence phase

จากผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่จำนวน 50 ตัวอย่างด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ในระยะ Acute febrile phase ให้ผลเป็นบวก 64% (32/50) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ Convalescence phase แล้วพบว่า ให้ผลเป็นลบทั้งหมด ในทำนองเดียวกัน การตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid Test ในระยะ Acute febrile phase พบว่า ให้ผลเป็นบวก 52% (26/50) แล้วลดลงเหลือผลบวกเพียง 4% (2/50) ในระยะ Convalescence phase

ในทางตรงกันข้าม ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในระยะ Acute febrile phase ด้วยวิธี IgM Rapid Test, IgM ELISA, IgG Rapid Test, IgG ELISA และ IgA Rapid Test พบว่า ให้ผลเป็นบวกเท่ากับ 40% (20/50), 54% (27/50), 50% (25/50), 78% (39/50) และ 50% (25/50) ตามลำดับ จากนั้นจะให้ผลการตรวจสอบเป็นบวกมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ Convalescence phase โดยวิธี IgM ELISA ที่ใช้เป็นเกณฑ์ จะให้ผลบวก 100% (50/50) แต่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test ให้ผลเป็นบวกเพียง 76% (38/50) ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี IgG Rapid Test, IgG ELISA และ IgA Rapid Test ให้ผลเป็นบวก 80% (40/50), 98% (49/50) และ 66% (33/50) ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลการตรวจสอบของ NS1 และ/หรือ IgM Rapid Test ในระยะ Acute febrile phase ให้ผลเป็นบวก 72% (36/50) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับในระยะ Convalescence phase คือ 78% (39/50)

3. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบตามวันหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้

จากการนำตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยแบบ Paired specimens ที่แบ่งการเก็บเป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะ Acute febrile phase คือ ช่วงวันที่ 1 – 7 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ และระยะ Convalescence phase คือ ช่วงหลังวันที่ 14 เป็นต้นไป มีทั้งหมด จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งคัดเลือกมาจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบด้วยวิธี IgM ELISA เป็นเกณฑ์ แล้วนำผลการตรวจสอบด้วย วิธี Rapid Test, เทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบแต่ละวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบตามวันหลังจากแสดงอาการมีไข้

จากภาพจะเห็นว่า ช่วงวันที่ 1 – 3 หลังจากแสดงอาการมีไข้ ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค RT-PCR และวิธี NS1 Rapid Test ให้ผลเป็นบวก 44.4% และ 55.6% ตามลำดับ แต่หลังจาก 2 วันต่อมา พบว่า การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นเป็น 70% แต่วิธี NS1 Rapid Test ให้ผลเป็นบวกลดลงเหลือ 46.7% และเมื่อเข้าสู่ช่วงวันที่ 6 – 7 ผลการตรวจสอบของทั้งสองวิธีให้ผลบวกเท่ากัน คือ 63.6%

นอกจากนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อเข้าสู่ระยะ Convalescence phase หรือช่วงวันที่ 14 – 24 หลังจากแสดงอาการมีไข้ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ไม่พบผลเป็นบวกเลย หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ ให้ผลเป็นลบนั่นเอง ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid Test พบว่า ให้ผลเป็นบวกน้อยกว่า 7%

ส่วนผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี IgM Rapid Test และ IgM ELISA พบว่า ให้ผลเป็นบวกเท่ากัน คือ 44.4% ใน 3 วันแรกหลังจากแสดงอาการมีไข้ เมื่อเข้าสู่ช่วงวันที่ 4 – 5 ผลการตรวจสอบด้วยวิธี IgM ELISA เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 50% ในขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test ลดลงเหลือ 33.3% จากนั้นผลการตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test และ IgM ELISA เพิ่มขึ้นอีกครั้งในช่วงวันที่ 6 – 7 เป็น 54.5% และ 72.7% ตามลำดับ แต่หลังจากวันที่ 14 – 24 ผลการตรวจสอบของทั้งสองวิธีมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น กล่าวคือ วิธี IgM Rapid Test ให้ผลเป็นบวกอยู่ระหว่าง 73.3 – 81.2% และ IgM ELISA ให้ผลบวก 100% เมื่อสังเกตผลการตรวจสอบของ NS1 และ/หรือ IgM Rapid Test พบว่า ให้ผลเป็นบวกสูงและอยู่ในระดับคงที่ระหว่าง 72.7 – 88.9%

นอกจากนี้ ยังมีการตรวจสอบด้วยวิธี IgG Rapid Test ในระยะ Acute febrile phase พบว่า มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 44.4% ไปจนถึง 54.5% และให้ผลบวกมากที่สุดในช่วงวันที่ 14 – 16 คือ 86.7% แล้วลดลงจนเหลือ 68.8% ในช่วงวันที่ 20 – 24 แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธี IgG ELISA พบว่า ให้ผลที่แตกต่างกันมาก คือ ให้ผลบวกที่สูงตั้งแต่ 77.8 ไปจนถึง 80% ในช่วง 5 วันแรกหลังจากแสดงอาการมีไข้ แล้วลดลงเล็กน้อยเหลือ 72.7% ในช่วงวันที่ 6 – 7 จากนั้นก็เพิ่มขึ้นอีกจนถึง 100% ในระยะ Convalescence phase แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีอีกวิธีหนึ่งเพื่อใช้ยืนยันผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ คือ วิธี IgA Rapid Test ซึ่งพบว่า ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นมากจาก 33.3% ในช่วงวันที่ 1 – 3 เป็น 81.8% ในช่วงวันที่ 6 – 7 แล้วจึงค่อยๆ ลดลงในระยะ Convalescence phase

4. ผลการวิเคราะห์ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของชุดทดสอบ NS1, IgM และ IgG Rapid Test

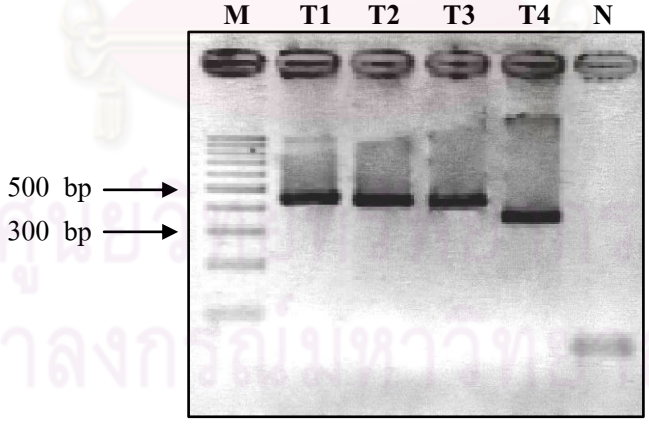
จากการวิเคราะห์หาความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบด้วยชุดทดสอบ NS1 Rapid Test จะทำโดยการเปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR พบว่า มีความไว 70.6% และความจำเพาะ 73.4% ส่วนการคำนวณหาค่าพยากรณ์บวก (PPV) และค่าพยากรณ์ลบ (NPV) ของวิธี NS1 Rapid Test มีค่าเท่ากับ 69.4% และ 74.6% ตามลำดับ ดังนั้น ความแม่นยำ (Accuracy) จึงมีค่าเท่ากับ 72.2%

นอกจากนี้ เมื่อนำผลการตรวจสอบด้วยวิธี IgM Rapid Test มาเปรียบเทียบกับวิธี IgM ELISA แล้วคำนวณหาความไวและความจำเพาะ จะพบว่ามีค่าเท่ากับ 75.6% และ 97.1% ตามลำดับ ส่วนการคำนวณหาค่าพยากรณ์บวกเป็น 97.1% และค่าพยากรณ์ลบเป็น 75% ดังนั้น ค่าความแม่นยำจึงเพิ่มสูงขึ้นเป็น 84.8% ในกรณีเดียวกัน เมื่อนำผลการตรวจสอบด้วยวิธี IgG Rapid Test มาเปรียบเทียบกับวิธี IgG ELISA แล้วคำนวณหาความไว พบว่ามีค่าเพียง 62.7% และความจำเพาะมีค่า 95.8% ส่วนการคำนวณหาค่าพยากรณ์บวกเป็น 97.2% แต่ค่าพยากรณ์ลบค่อนข้างต่ำ คือ 52.3% จากนั้น เมื่อนำไปคำนวณหาความแม่นยำ พบว่ามีค่า 72.6% ซึ่งจะสามารถสรุปค่าต่างๆ ได้ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่า Diagnostic Test ของชุดทดสอบ NS1, IgM และ IgG Rapid Test

ชุดทดสอบ	ความไว	ความจำเพาะ	ค่าพยากรณ์บวก	ค่าพยากรณ์ลบ	ความแม่นยำ
NS1 Rapid test	70.6%	73.4%	69.4%	74.6%	72.2%
IgM Rapid test	75.6%	97.1%	97.1%	75%	84.8%
IgG Rapid test	62.7%	95.8%	97.2%	52.3%	72.6%

5. ผลการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5



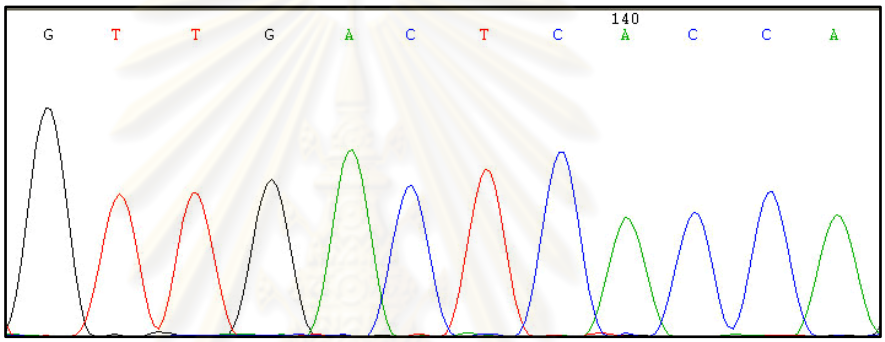
ภาพที่ 20 ผลการตรวจจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ในบริเวณยีน NS5 โดยที่ M = 100 bp marker, T1 = สายพันธุ์ที่ 1, T2 = สายพันธุ์ที่ 2, T3 = สายพันธุ์ที่ 3, T4 = สายพันธุ์ที่ 4 และ N = negative control

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ ในบริเวณยีน NS5 เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested PCR พบว่า ยังไม่สามารถ

จำแนกทั้ง 4 สายพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งจะได้ขนาดของ PCR product ที่แตกต่างกันไม่มากนัก คือ สายพันธุ์ที่ 1 มีขนาด 434 bp, สายพันธุ์ที่ 2 มีขนาด 420 bp, สายพันธุ์ที่ 3 มีขนาด 417 bp และสายพันธุ์ที่ 4 มีขนาด 358 bp (ดังภาพที่ 20)

หลังจากการตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วย 2% Agarose gel electrophoresis และย้อมดูแถบ DNA ด้วยสารละลาย Ethidium bromide แล้ว จากนั้นจึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลของทั้ง 4 สายพันธุ์ (T1 – T4) แล้วทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ จึงส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบด้วยวิธี BLAST search เพื่อเป็นการยืนยันสายพันธุ์ที่แน่นอน ดังตัวอย่างการตรวจยืนยันแสดงในภาพที่ 21

(A)



(B)

Sequences producing significant alignments:

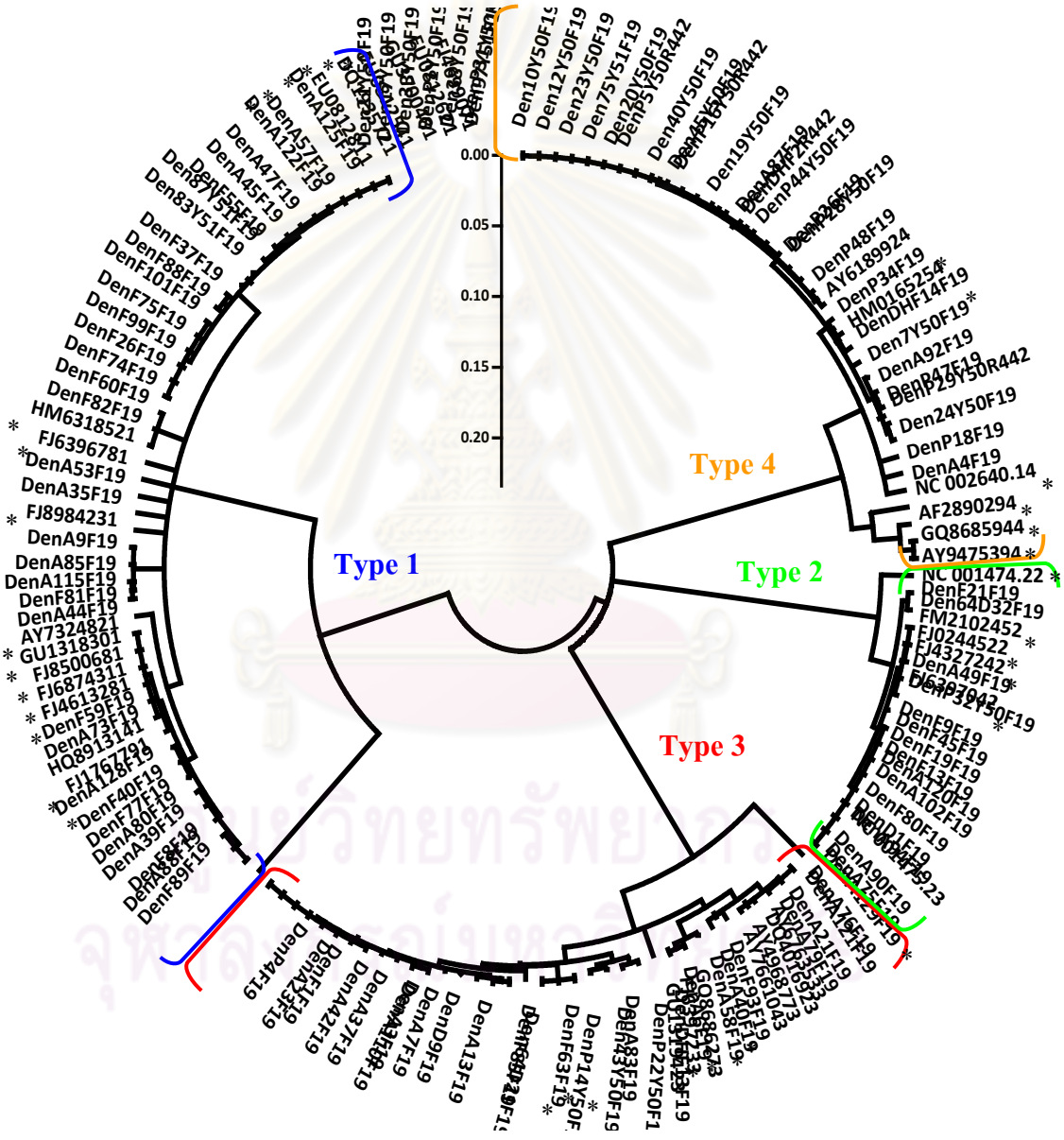
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU131830.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V4087/2008, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
GU131802.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V4048/2008, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
GU131736.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V3943/2008, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
GU131712.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V3879/2008, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
GU131709.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V3874/2008, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
GU131680.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V3842/2008, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ461328.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V1893/2007, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ850068.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/TH/BID-V2273/2001, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ687431.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/TH/BID-V2275/2001, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ687429.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/TH/BID-V2272/2001, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ687428.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/TH/BID-V2271/2001, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ687427.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/TH/BID-V2270/2001, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
FJ687426.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/TH/BID-V2269/2001, complete genom	681	681	95%	0.0	98%
JF937619.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V4082/2008, complete genom	677	677	95%	0.0	98%
HM181965.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/VN/BID-V3896/2008, complete genom	677	677	95%	0.0	98%
HM181952.1	Dengue virus 1 isolate DENV-1/KH/BID-V4253/2007, complete genom	677	677	95%	0.0	98%

ภาพที่ 21 ตัวอย่างยืนยันการตรวจจำแนกเชื้อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 1
(A) ผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (B) ผลการตรวจสอบด้วยวิธี BLAST search

6. ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree บริเวณยีน NS5 ของเชื้อไวรัสเดงกี่ที่ตรวจพบ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์โดยอาศัย phylogenetic analysis ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส ได้ โดยการศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อไวรัสเดงกี่จากตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบ

ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 (ขนาด 297 bp) จำนวน 108 ตัวอย่าง แล้วนำไป เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ อ้างอิง ของเชื้อไวรัส เดงกี่ทุก สายพันธุ์ (DENV 1 - 4) จากฐานข้อมูล GenBank database โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ Neighbor-joining method, Model แบบ Nucleotide: Maximum Composite Likelihood และตั้งค่า bootstrapping เท่ากับ 1 ,000 จึงทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ ของเชื้อไวรัส เดงกี่จากตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยได้ ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree บริเวณยีน NS5 (ขนาด 297 bp) ของเชื้อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 1 – 4 เปรียบเทียบกับที่ได้รายงานใน GenBank Database ด้วยโปรแกรม MEGA

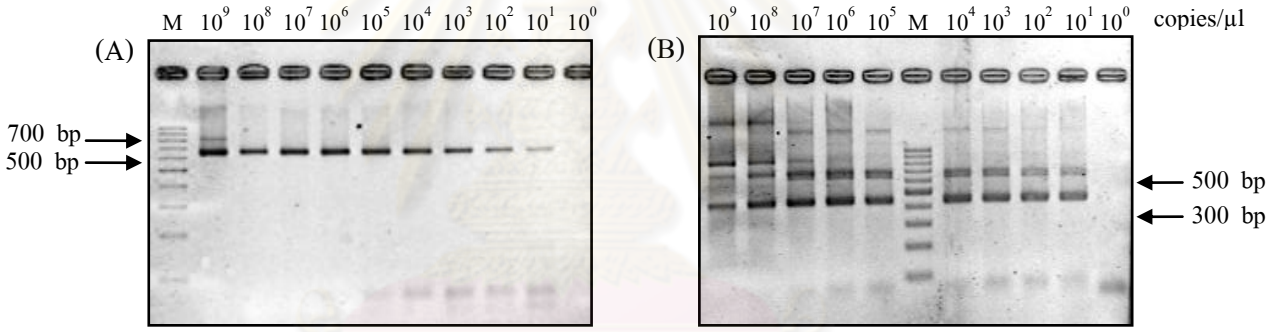
* คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (Reference sequence)

จากการวิเคราะห์ภาพที่ 22 พบว่า ตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 จำนวน 108 ตัวอย่าง ถูกจำแนกอยู่ในสายพันธุ์ที่ 1 จำนวน 34 ตัวอย่าง (31.5%) สายพันธุ์ที่ 2 จำนวน 13 ตัวอย่าง (12%) สายพันธุ์ที่ 3 จำนวน 29 ตัวอย่าง (26.9%) และสายพันธุ์ที่ 4 จำนวน 32 ตัวอย่าง (29.6%)

7. ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5

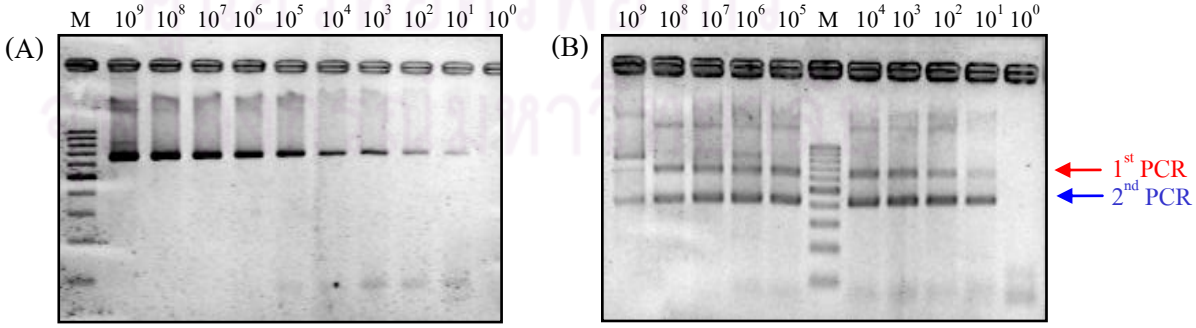
7.1 ความไว (Sensitivity)

หลังจากนำตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในแต่ละสายพันธุ์มา Cloning และทำ 10 fold-Serial dilution ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^9 – 10^0 copies/µl แล้วตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 ด้วยเทคนิค semi-nested PCR จะได้ผลดังแสดงในภาพที่ 23 – 26



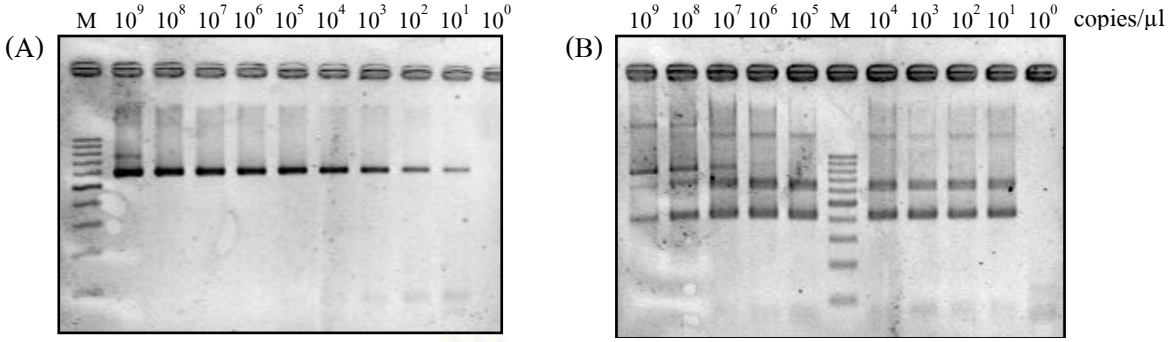
ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 1

(A) 1st PCR primer (B) 2nd PCR primer



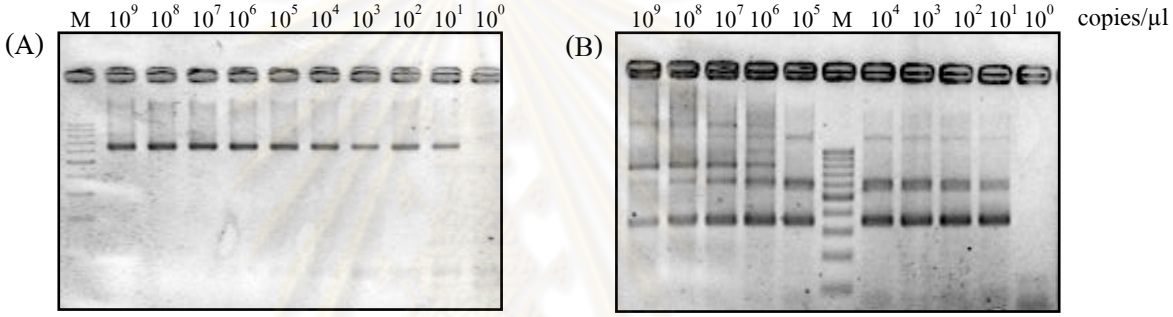
ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 2

(A) 1st PCR primer (B) 2nd PCR primer



ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 3

(A) 1st PCR primer (B) 2nd PCR primer



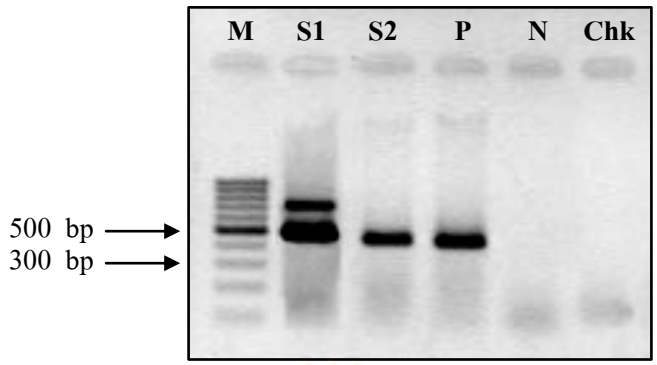
ภาพที่ 26 ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะต่อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์ที่ 4

(A) 1st PCR primer (B) 2nd PCR primer

จากภาพจะเห็นได้ว่า ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 นี้มีความไว (Sensitivity) สูง เพราะสามารถที่จะตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ทั้งใน 1st PCR ดังภาพที่ 23(A) – 26(A) และ 2nd PCR ดังภาพที่ 23(B) – 26(B) ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณ viral load ต่ำที่ความเข้มข้นเพียง 10^1 copies/µl

7.2 ความจำเพาะ (Specificity)

จากการนำตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี่และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus) มาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 ด้วยเทคนิค semi-nested PCR พบว่า จะมี positive band ปรากฏขึ้นเฉพาะกับเชื้อไวรัสเดงกี่ แต่ไม่มี positive band ปรากฏขึ้นกับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ดังนั้น จึงเป็นการบ่งบอกได้ว่า ไพรเมอร์นี้จำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสเดงกี่เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 27



ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบในบริเวณยีน NS5 โดย M = 100 bp marker, S1 = ตัวอย่างที่ 1, S2 = ตัวอย่างที่ 2, P = positive control, N = negative control และ Chk = ตัวอย่างเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

8. ผลการตรวจสอบและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค RT-PCR ในบริเวณ 3′UTR, ยีน NS1 และยีน NS5 กับวิธี NS1 Rapid test

จากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยด้วยเทคนิค RT-PCR ในบริเวณ 3′UTR, ยีน NS1 และยีน NS5 เป็นการตรวจหา genomic RNA ของเชื้อไวรัสเดงกี่ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid test ที่เป็นการตรวจหา NS1 antigen พบว่า การตรวจสอบในบริเวณ 3′UTR ให้ผลเป็นบวก 48.6% (160/329), บริเวณยีน NS1 22.8% (75/329) และบริเวณยีน NS5 32.8% (108/329) ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 Rapid test พบว่า มีตัวอย่างที่ให้ผลบวก 42% (138/329)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคไข้เลือดออกเป็น โรคติดเชื้อที่มีแมลงเป็นพาหะ และมีเชื้อไวรัสเดงกี่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดอาการทางคลินิกที่หลากหลาย คือ ตั้งแต่ไม่แสดงอาการไปจนถึงขั้นช็อกและเสียชีวิต ซึ่งความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันไปขึ้นกับระยะเวลาของการติดเชื้อ โดยในช่วงระยะแรก ผู้ป่วยอาจจะแสดงอาการเป็นไข้ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ คล้ายกับอาการของไข้หวัดใหญ่ (Influenza), โรคมาลาเรีย (Malaria) หรือ ไข้ไทฟอยด์ (Typhoid fever) จึงทำให้ยากต่อการรักษาได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อ ไวรัสเดงกี่ (ระยะ Acute febrile illness) จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการรักษาอย่างมาก เพราะนอกจากจะช่วยลดความรุนแรงของโรคที่อาจจะเกิดขึ้นหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาทันเวลาแล้ว ยังช่วยหลีกเลี่ยงการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะเกินความความจำเป็นอีกด้วย

งานวิจัยนี้จึง มุ่งเน้นที่จะศึกษาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี Rapid Test เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยทั้งหมด 329 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Single specimen 237 ตัวอย่างและ Paired specimen 92 ตัวอย่าง โดยจะทำการหาความถูกต้องและความแม่นยำ รวมทั้งคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวด้วย ซึ่งในปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย ได้แก่ ชุดทดสอบ Rapid Test, เทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA โดยแต่ละวิธีก็มีตัวชี้วัดแตกต่างกันไป กล่าวคือ ชุดทดสอบ Rapid Test จะมีการตรวจวัด NS1 antigen, แอนติบอดี IgM/IgG และ IgA ส่วนเทคนิค RT-PCR ใช้สำหรับการตรวจหา viral genome และวิธี ELISA ใช้สำหรับการตรวจวัดการตอบสนองของแอนติบอดี IgM/IgG แต่อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อในช่วงระยะ 1 – 2 วันแรกจะยังไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี IgM ได้ จนกระทั่งเข้าสู่วันที่ 3 – 5 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ และถ้าหลังจากวันที่ 10 – 14 ก็มีความเป็นไปได้ที่จะตรวจพบแอนติบอดี IgG ด้วย นอกจากนี้ การติดเชื้อครั้งแรกและการติดเชื้อซ้ำก็ส่งผลทำให้การตรวจวัดแอนติบอดีมีค่าแตกต่างกันได้ [44]

จากที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การตรวจหา NS1 antigen สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 – 9 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการมีไข้ [51-53] และจะตรวจพบมากที่สุดวันที่ 6 – 10 [54] โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะทำการเปรียบเทียบการตรวจสอบวิธี NS1 Rapid Test กับเทคนิค RT-PCR ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า Rapid Test สามารถตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกต่อ NS1 antigen มากที่สุดในช่วงวันที่ 6 – 7 ของระยะ Acute febrile phase ใน Single specimens ดังภาพที่ 16(C) และใน

Paired specimens ดังภาพที่ 19 ส่วนระยะ Convalescence phase หรือหลังจากวันที่ 14 เป็นต้นไป Rapid Test จะตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ NS1 antigen เพียง 4% จากตัวอย่างทั้งหมด ดังภาพที่ 18(B) แต่สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ให้ผลเป็นบวกมากที่สุดในช่วงวันที่ 4 – 5 ทั้งใน Single specimens ดังภาพที่ 16(B) และในระยะ Acute febrile phase ของ Paired specimens ดังภาพที่ 19 ส่วนในระยะ Convalescence phase ไม่สามารถตรวจพบ viral genome เลย นอกจากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่โดยการตรวจหา NS1 antigen แล้ว ยังมีการตรวจหาแอนติบอดี IgM หรือ IgG เพื่อหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้เลือดออกด้วย โดยจะทำการเปรียบเทียบการตรวจสอบวิธี IgM Rapid Test กับวิธี IgM ELISA พบว่า ทั้งสองวิธีสามารถตรวจพบแอนติบอดี IgM ในตัวอย่างของระยะ Convalescence phase ได้มากกว่าระยะ Acute febrile phase ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานไว้ว่า ปริมาณแอนติบอดี IgM จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันหลังจากการติดเชื้อ [44] และจากผลการตรวจสอบ แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของแอนติบอดีจะไม่ปรากฏในระยะ viremia phase หรือถ้าตรวจพบ ก็ในปริมาณที่ต่ำมาก แต่เมื่อนำผลการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 และ IgM Rapid Test มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่า ให้ผลเป็นบวกสูง ซึ่งเป็นการยืนยันว่า แต่ละวิธีนั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ส่วนการตรวจหาแอนติบอดี IgG จะไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์การติดเชื้อในระยะ Acute febrile phase ของ Single specimens เพียงอย่างเดียวได้ เนื่องจากเป็นตัวบ่งชี้ถึงการติดเชื้อซ้ำในผู้ป่วย แต่จะใช้เป็นตัวตรวจสอบก็ต่อเมื่อมีการเก็บตัวอย่างทั้งในระยะ Acute phase และ Convalescence phase ดังภาพที่ 19 ได้แสดงให้เห็นว่า ทั้งการตรวจสอบด้วยวิธี Rapid Test และวิธี ELISA ปริมาณแอนติบอดี IgG จะเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 14 เป็นต้นไป นอกจากนี้ มีการตรวจสอบด้วยวิธี IgA Rapid Test อีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจพบการติดเชื้อตั้งแต่ระยะแรก แต่จะคงอยู่เพียงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น [45] คือ ช่วงวันที่ 6 – 7 และ 14 - 16 ดังภาพที่ 19

แต่อย่างไรก็ตาม การที่จะทราบว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในผู้ป่วยมีความแม่นยำเพียงใด จะต้องทำการตรวจสอบหาความไวและความจำเพาะของวิธีทดสอบนั้นๆ โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบ NS1 หรือ IgM Rapid Test กับวิธีมาตรฐาน คือ เทคนิค RT-PCR และวิธี IgM ELISA ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ชุดทดสอบ NS1 Rapid Test มีความไวสูงถึง 70.6% จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา NS1 antigen และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า วิธี NS1 Rapid Test มีความไวในการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่มากกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR แต่ในความเป็นจริงจะตรวจพบ NS1 antigen ที่ช่วงเวลาหลังจากการตรวจพบ genomic RNA ของไวรัส [55] และเมื่อตรวจหาความจำเพาะของวิธี NS1 Rapid Test ต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ พบว่า มีค่าสูงถึง 73.4% ส่วนวิธี IgM Rapid Test พบว่า มีความไว 75.6% และความจำเพาะ 97.1% นอกจากนี้ มีการรายงานว่า เมื่อนำผลการตรวจสอบด้วยวิธี NS1 และ IgM

Rapid Test มาวิเคราะห์ร่วมกัน จะช่วยทำให้ตรวจวินิจฉัยได้เพิ่มขึ้น [55] และจากการศึกษาพบว่าอัตราการตรวจพบมีค่าสูงประมาณ 70%

นอกจากนี้ ผลการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ (Serotypes) ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วย เทคนิค semi-nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบ ในบริเวณยีน NS5 สามารถจำแนกเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ 4 สายพันธุ์ (DENV 1 – 4) ซึ่งทำการยืนยันการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี BLAST search เรียบร้อยแล้ว และจากที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า บริเวณยีน NS5 เป็นบริเวณที่มีการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการจำลอง RNA ของไวรัสเดงกี่ คือ เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) และเอนไซม์ methyltransferase [29] ดังนั้น จึงแสดงให้เห็นว่า บริเวณนี้จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบและ จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ แต่ขนาด PCR product ที่ได้ของแต่ละสายพันธุ์มีความใกล้เคียงกัน ทำให้การตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ยังไม่สามารถใช้สำหรับบ่งชี้ขนาดและความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถจำแนก PCR product ที่มีขนาดต่างกันอย่างชัดเจนต่อไป นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์นี้ พบว่า มีความไวสูงในการตรวจพบการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าตัวอย่างจะมีปริมาณ viral load ต่ำที่ความเข้มข้นเพียง 10^1 copies/µl และจากผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบ ในบริเวณยีน NS5 กับตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus) เนื่องจากไวรัสชิคุนกุนยามีลักษณะพื้นฐาน เช่น ลักษณะ genome เป็น RNA virus, มียุงลายเป็นพาหะนำโรค และผู้ป่วยจะมีอาการเป็นไข้สูง พบผื่นแดงที่ผิวหนัง คล้ายคลึงกับการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ [56] ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่า ไม่มี positive band ปรากฏขึ้น จึงเป็นการบ่งบอกได้ว่า ไพรเมอร์นี้จำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสเดงกี่เท่านั้น แต่ทั้งนี้ก่อนการนำไปใช้จริงควรได้มีการทดสอบกับไวรัสชนิดอื่นๆ ที่อาจพบได้ในซีรั่ม เช่น ไวรัสตับอักเสบชนิดบี (Hepatitis B virus), ไวรัสตับอักเสบชนิดซี (Hepatitis C virus) เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าจะไม่เกิดผลบวกลวง (False positive) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการวินิจฉัยโรคผิดพลาดได้

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยด้วยเทคนิค RT-PCR ใน 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ 3′UTR, ยีน NS1 และยีน NS5 พบว่า ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบ ในบริเวณยีน NS5 สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพียง 32.8% ซึ่งน้อยกว่าการตรวจสอบในบริเวณ 3′UTR (48.6%) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไพรเมอร์ในบริเวณ 3′UTR เป็นไพรเมอร์ที่มาจากวารสารที่ตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ [49] จึงมีความน่าเชื่อถือและยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ง่าย เนื่องจากเป็นลำดับเบสขนาดสั้นประมาณ 100 bp แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบในบริเวณยีน NS1 [50] ซึ่งเป็นไพรเมอร์จากวารสารประมาณ 15 ปีที่แล้ว จะพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพียงแค่ 22.8% จึงมีความเป็นไปได้ว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวเหมาะสมกับการตรวจสอบการติดเชื้อ

ไวรัสเดงกี่เมื่อ 15 ปีที่แล้ว แต่ไม่เหมาะสมกับเชื้อไวรัสเดงกี่ในปัจจุบัน ซึ่งถ้าหากนำมาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ อาจทำให้ผลการตรวจวินิจฉัยเกิดความผิดพลาดได้

โดยสรุปของงานวิจัยนี้ ผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธี NS1 และ IgM/IgG Rapid Test กับเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ทำให้ทราบว่าวิธี NS1 และ IgM/IgG Rapid Test เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลเร็ว สามารถตรวจสอบได้ง่าย เพราะเป็นการทดสอบแบบ 1 ตัวอย่างต่อ 1 ชุดทดสอบ (Single test) มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งแตกต่างกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR และวิธี ELISA ที่มีกระบวนการหลายขั้นตอนและใช้เวลาค่อนข้างมาก ทั้งนี้ การตรวจหา NS1 antigen ก็เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการตรวจสอบการติดเชื้อในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยระยะ Acute phase ส่วนการตรวจหาแอนติบอดี IgM และ IgG จะช่วยบ่งบอกถึงความรุนแรงของโรค เพราะแอนติบอดี IgM และ IgG จะถูกสร้างและปลดปล่อยออกมาเมื่อผู้ป่วยเข้าสู่ระยะ dengue hemorrhagic fever (DHF) หรือ dengue shock syndrome (DSS) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพิจารณาวิธีการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยอย่างเหมาะสม มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือได้มากที่สุด นอกจากนี้ การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วย เทคนิค semi-nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบ ในบริเวณยีน NS5 ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าสามารถใช้จำแนกเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ 4 สายพันธุ์ (DENV 1 – 4) โดยที่มีความไวและความจำเพาะสูง ดังนั้น ถ้าได้มีการพัฒนาการออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถจำแนกขนาดของ PCR product ในแต่ละสายพันธุ์ให้มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ก็จะส่งผลทำให้การจำแนกสายพันธุ์มีประโยชน์ในด้านการช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกี่จากตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย รวมทั้งยังสามารถนำข้อมูลการตรวจพบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี่ ไปใช้ในการวางแผน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ และวิเคราะห์แนวโน้มการระบาด ในปีต่อๆไป พร้อมทั้ง การเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] World Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever. WHO fact sheet 117 (2002). World Health Organization, Geneva, Switzerland.

[2] Morens DM, Fauci AS. Dengue and hemorrhagic fever: a potential threat to public health in the United States. JAMA 299 (2008): 214-216.

[3] Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nat Rev Microbiol 2 (2004): 789-801.

[4] Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987–2007. Trans R Soc Trop Med Hyg 102 (2008): 522–523.

[5] Chanthavanich P, C. Luxemburger, C. Sirivichayakul, K. Lapphra, K. Pengsaa, S. Yoksan, A. Sabchareon, J. Lang. Short report: immune response and occurrence of dengue infection in Thai children three to eight years after vaccination with live attenuated tetravalent dengue vaccine. Am J Trop Med Hyg 75 (2006): 26–28.

[6] Santos HWG, Poloni TRRS, Souza KP, Muller VDM, Tremeschin F, Nali LC, Fantinatti LR, Amarilla AA, Castro HA, Nunes MR, Casseb SM, Vasconcelos PF, Badra SJ, Figueiredo LTM, Aquino VH. A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. J Med Virol 80 (2008): 1426–1433.

[7] Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. Int J Infect Dis 8 (2004): 69–80.

[8] ดารินทร์ ซอโสตถิกุล. Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. ใน : ประเวศ วะสี, บรรณาธิการ, คลินิก, 505-511. กรุงเทพฯ : หมอชาวบ้าน, 2553.

[9] Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Lancet 352 (1998): 971-977.

[10] Halstead SB. Epidemiology of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. In : Gubler DJ, Gk, editors, Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, 23-44. New York : CAB international Press, 1997.

[11] Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue hemorrhagic fever. In : Dupont HL, Steffen R, editors. Textbook of Travel Medicine and Health, 312-314. 2nd ed. Hamilton : B.C.Decker Inc, 2001.

[12] ชิษณุ พันธุ์เจริญ, อุษา ทิสยากร. Dengue infection in teenage children. วารสารโรคติดเชื้อและยาต้านจุลชีพ 17 (2543): 93-96.

[13] ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร. Dengue virus infection in adult. ใน : พรรณพิศ สุวรรณกุล, ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร, บรรณาธิการ, Updates in Antimicrobial Agents and Vaccinations, 253-268. กรุงเทพฯ : บีบี การพิมพ์และบรรจุภัณฑ์. 2544.

[14] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In : Gubler DJ, Kuno G, editors. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, 1–22. New York : CAB International, 1997.

[15] Leichtenstern O. Influenza and dengue. In : Nothnagel H, editors. Specielle Pathologie und Therapie, 133–226. Wien : Alfred Holder, 1896.

[16] Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. J Virol 73 (1999): 3108–3116.

[17] I-Mei Yu, Zhang W, Heather A, Holdaway, Long Li, Victor A, Kostyuchenko, Paul R, Chipman, Richard J, Kuhn, Michael G, Rossmann, Chen J. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. Science 319 (2008): 1834-1837.

[18] Brinton MA, Fernandez AV, Dispoto JH. The 3′- nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. Virology 153 (1986): 113–121.

[19] Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. Conserved elements in the 30 untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. J Mol Biol 198 (1987): 33–41.

[20] Chang CJ, Luh HW, Wang SH, Lin HJ, Lee SC, Hu ST. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue virus core protein. DNA Cell Biol 20 (2001): 569–577.

[21] Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. Science 319 (2008): 1830–1834.

[22] Johnson AJ, Guirakhoo F, Roehrig JT. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown inmosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. Virology 203 (1994): 241–249.

[23] Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. Virology 171 (1989): 302-305.

[24] Winkler G, Randolph VB, Cleaves GR, Ryan TE, Stollar V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. Virology 162 (1988): 187-196.

[25] Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. J Virol 75 (2001): 4633–4640.

[26] Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. Nat Struct Mol Biol 13 (2006): 372–373.

[27] Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. J Virol 79 (2005): 5414–5420.

[28] Vasilakis N, Holmes EC, Fokam EB, Faye O, Diallo M, Sall AA, Weaver SC. Evolutionary processes among sylvatic Dengue-2 viruses. J Virol 81 (2007a): 9591–9595.

[29] Ackermann M, Padmanabhan R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. J Biol Chem 276 (2001): 39926–39937.

[30] Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. Infect Disord Drug Targets 9 (2009): 327-43.

[31] Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infection, Genetics and Evolution 9 (2009): 523–540.

[32] Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev 3 (1990): 376-396.

[33] Sosothikul D, Seksarn P, Sureeporn P, Thisayakorn U, Lusher JM. Activation of Endothelial cells, Coagulation and Fibrinolysis in Children with Dengue Virus Infection. Thromb Haemost 97 (2007): 627-634.

[34] Halstead SB. Dengue. Curr Opin Infect Dis 15 (2002): 471–476.

[35] Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. Virus Res 73 (2001): 81–89.

[36] Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology 230 (1997): 244–251.

[37] Dengue Hemorrhagic Fever. Diagnosis, treatment, prevention and control, 12-47. Geneva : World Health Organization, 1997.

[38] ดารินทร์ ซอโสตถิกุล. Hematological Changes in Dengue Virus Infection. ใน : บุรณี กาญถวัลย์, โสพสินี เหมรุ่งโรจน์, ชุติมา หรุ่มเรืองวงษ์, บรรณาธิการ , เวชศาสตร์ร่วมสมัย , 23-32. กรุงเทพฯ : ภาพพิมพ์, 2549.

[39] Mitrakul C, Poshyachinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 26 (1997): 975-984.

[40] Weiss HJ, Halstead SB. Studies Of Hemostasis In Thai Hemorrhagic Fever. J Pediatr 66 (1965): 918-926.

[41] Branch SL, Levett PN. Evaluation of four methods for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. Clin Diag Lab Immunol 6 (1999): 555-557.

[42] Alcon S, Talarmin A, Debrutyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assays specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of diseases in patients experiencing primary or secondary infections. J Clin Microbiol 40 (2002): 376-381.

[43] Lorekha R, Chokephaibulkit K, Yoksan S, *et al*. Diagnosis of dengue infection using various diagnosis tests in the early stages of illness. Southeast Asian J Trop Med Public Health 35 (2004): 391-395.

[44] Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol 11 (2004): 642-50.

[45] Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. Clin Diagn Lab Immunol 12 (2005): 1235-7.

[46] Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. J Clin Microbiol 36 (1998): 1189-1192.

[47] Thisyakorn U. Current status of the knowledge on dengue/dengue haemorrhagic fever/ dengue shock syndrome in Thailand. Clinical aspects. Mosquito Borne Disease Bulletin 11 (1994): 61-63.

[48] Chuansumrit A, Tangnararatchakit K. Pathophysiology and management of dengue hemorrhagic fever. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 8 (2006): 3-11.

[49] Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. J Virol Met 129 (2005): 8-15.

[50] Yenchitsomanus P, Sricharoen P, Jaruthasana I, Pattanakitsakul S, Nitayaphan S, Mongkolsapaya J, Malasit P. Rapid detection and identification of Dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). Southeast Asian J Trop Med Public Health 27 (1996): 228-236.

[51] Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. Arch Virol 142 (1997): 897–916.

[52] Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MRT, Rodrigues SG, Storck-Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clin Vaccine Immunol 13 (2006): 1185–9.

[53] Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Yang HH, Lin TH, Huang JH. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic

study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. J Clin Microbiol 40 (2002): 1840–4.

[54] Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, He LJ, Yuen KY, Che XY. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. J Clin Microbiol 44 (2006): 2872–8.

[55] Huhtamoa E, Hasua E, Nathalie YU, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. J Clin Virol 47 (2010): 49-53.

[56] Nazea F, LeRouxa K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowskyb F, Grivarda P, Michault A, Laurent P. Simultaneous detection and quantitation of chikungunya, dengue and west nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. J Virol Met 162 (2009): 1-7.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS)

ชั่ง NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g และ KH_2PO_4 0.24 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl หรือ NaOH จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ml แล้วนำไปผ่านการ autoclave

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัด RNA

- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือ Distilled water (DW) เตรียมโดยนำขวดน้ำบรรจุน้ำกลั่นแล้วนำไปผ่านการ autoclave
- น้ำปราศจากเอนไซม์ RNase หรือ DepC water เตรียมโดยเติม 0.1% DepC ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำไปผ่านการ autoclave
- 95% Ethanol ; 95 ml Absolute Ethanol เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 100 ml
- ละลาย Carrier RNA ใน 200 µl DepC water จนหมด แล้วเทผสมกับ Lysis buffer หลังจากใช้เก็บไว้ที่ 4°C
- เติม 100 ml Absolute Ethanol ลงใน Wash buffer แล้วผสมให้เข้ากัน

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทำ RT - PCR

- Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany) ; 1.25 U Taq DNA polymerase, 200 µM dNTP และ 1.5 mM Mg^{2+}

4. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการ run gel electrophoresis

- 5x Tris borate buffer (5x TBE) ; ชั่ง Tris-base 54 g, Boric acid 27.5 g และ 0.5 M EDTA 20 ml ละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1x Tris borate buffer (1x TBE) ; 5x TBE 200 ml เติมน้ำกลั่น 800 ml
- 2% (w/v) Agarose gel ; ชั่ง agarose gel 4 g ละลายใน 1x TBE buffer 200 ml เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด
- Loading dye ; 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% Bromophenol blue, 0.03% Xylene cyanol FF, 60% Glycerol และ 60 mM EDTA
- 10% Ethidium bromide ; ละลาย Ethidium bromide 30 µl ในน้ำกลั่น 300 ml

ภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. ผลงานวิจัยได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health หัวข้อเรื่อง Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล แพรวพิไล ตัณฑุลาวัฒน์ **เพศ** หญิง

อายุ 25 ปี **เกิด** 6 มีนาคม พ.ศ. 2529

สถานที่เกิด โรงพยาบาลรามาธิบดี จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ 111/26 หมู่บ้านภัทรพาร์ค ถนนนนทบุรี-ปทุมธานี ตำบลบางคูวัด อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีวเคมี)
จาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2550

ระดับปริญญาโท สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทางการแพทย์
จาก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2553

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

หัวข้อเรื่อง : Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus.

ชื่อผู้นิพนธ์ : Praewpilai Tontulawat, Piyathida Pongsiri, Chittima Thongmee, Apiradee Theamboonlers, Nuantip Kamolvarin, Yong Poovorawan

ตีพิมพ์ในวารสาร Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health Volume 42 No. 3 May 2011

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย