การตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชั่นโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (อาร์ทีพีซีอาร์)

นาย โอภาส พุทธเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF DENGUE VIRUS IN BONE MARROW BY REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT – PCR)

Mr. Opass Putcharoen

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University

Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธีเวอร์สทรานสคริปชั่นโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (อาร์ทีพีซีอาร์)
โดย	นาย โอภาส พุทธเจริญ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธานินทร์ อินทรกำธรชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์

..... กรรมการ

(อาจารย์ วีนัส อุดมประเสริฐกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โอภาส พุทธเจริญ : การตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชั่นโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (อาร์ทีพีซีอาร์) (DETECTION OF DENGUE VIRUS IN BONE MARROW BY REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. นพ. วันล่า กุลวิชิต, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. นพ. พลภัทร โรจน์นครินทร์. 62 หน้า.

ที่มา เนื่องจากโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทย จากการตรวจสำรวจทางน้ำเหลืองวิทยาพบว่าประชากรผู้ใหญ่ไทยเกือบทั้งหมดเคยผ่านการติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อนแล้ว โดยที่ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อที่ไม่มีอาการ การติดเชื้อส่วนใหญ่ในผู้ใหญ่มักจะเป็นการติดเชื้อแบบทุติยภูมิและยังไม่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าไวรัสเดงกีสามารถที่จะคงอยู่ภายหลังจากที่มีการติดเชื้อครั้งก่อน แต่มีการศึกษาไวรัสชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ไวรัสตับอักเสบซี และไวรัสจีบีวี สามารถที่จะคงอยู่และมีการแบ่งตัวในผู้ที่เคยติดเชื้อนี้มาก่อนได้ เนื่องจากไวรัสเดงกีเป็นไวรัสที่มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อในเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มโมโนซัยท์และลิมฟ์โฟซัยท์ คณะผู้ทำการศึกษาจึงสนใจที่จะตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกของผู้ป่วยที่เคยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีตมาก่อน

วิธีการศึกษา ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาไวรัสเดงกีโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ในผู้ป่วยที่มารับการเจาะไขกระดูกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยที่มีการถามประวัติเพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบมีอาการในอดีต และใช้การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (HAI และ ELISA) เพื่อเป็นหลักฐานยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีต นอกจากนี้ได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วยแต่ละราย

ผลการศึกษา จากจำนวนผู้ป่วยที่เข้าในการศึกษา 74 ราย สามารถตรวจพบ ไวรัสเดงกีในผู้ป่วย 3 ราย โดยที่ทั้งผู้ป่วยทั้ง 3 รายมีผลการตรวจ HAI และ ELISA เข้าได้กับการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีต และทั้งสามรายมีผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของไขกระดูกที่แสดงว่าอยู่ในช่วงที่โรคเลือดสงบ

สรุปผลการศึกษา สามารถที่จะตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูกของผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสนี้มาก่อนในอดีต ซึ่งการที่มีไวรัสเดงกีอยู่ในร่างกายหลังจากการติดเชื้อครั้งก่อนอาจจะมีผลต่อการเกิดโรคติดเชื้อเดงกีภายหลัง เนื่องจากที่ไวรัสที่อยู่ในไขกระดูกอาจจะมีการแบ่งตัว หรือเนื่องทำให้มีผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อซ้ำโดยไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่นๆ ต่อมา แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้รายละเอียดเกี่ยวกับผลของไวรัสที่อยู่ในร่างกายต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	ชีวเวชศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2549	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

487 48203 30 : MAJOR MEDICINE (INFECTIOUS DISEASES)
KEYWORD: DENGUE VIRUS / BONE MARROW / PCR

OPASS PUTCHAROEN : DETECTION OF DENGUE VIRUS IN BONE MARROW BY REVERSE TRASCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PONLAPAT ROJNUCKARIN, M.D., Ph.D. 62 pp.

Backbround Our country is considered endemic area for dengue virus infection. Serosurveillance indicates that almost native all adults have been infected, mostly asymptomatically. A long-held mechanism for clinical severity involves sequential infections by different serotypes. Even though some of its peer flaviviruses are known to reside persistently within the host and contribute to host illnesses, dengue virus has not been shown to behave in a similar fashion. As dengue is a haematotropic virus, we sought to find evidence of its persistence in the bone marrow of previously-infected persons.

Methods We studied patients clinically suspected of haematologic malignancies and indicated to have diagnostic bone marrow studies. A fraction of cellular marrow was employed for RNA extraction for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) by dengue-specific primers. Serologic assessment by haemagglutination inhibition test (HI) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to minimise a chance of including patients with recent dengue infection. Demographic data of all patients were analysed, especially for the history of prior recent febrile illness and diagnosis of dengue infection.

Results Of 74 enrolled patients, dengue genome was detected in cellular marrow of 3 cases. These patients had had no history of febrile illness prior to the bone marrow study and HI and ELISA results of single or paired sera of from these patients were, similar to those of the rest, compatible with either remote or remote/no infection by flaviviviruses. Indication for bone marrow examination in these patients were for follow-up and pathological results also confirmed they were in the stage of remission.

Conclusions Dengue virus genome could be detected in bone marrow of asymptomatic haematologic patients by using RT-PCR. Sequential infections by different serotypes seem to be a key in severe dengue pathogenesis. The persistent first-serotype virus, defective or complete, could possibly confer a biological influence when co-infected with a second serotype later on in their life. As our understanding of dengue pathogenesis is far from perfect, this finding obviously opens up a door to a new arena of dengue research.

Department.....Medicine.....	Student's signature.....
Field of study.....Medicine.....	Advisor's signature.....
Academic year.....2006.....	Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ รองศาสตราจารย์นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต อาจารย์ที่ปรึกษา ที่เสนอและสนับสนุนประเด็นที่จะทำการศึกษาในครั้งนี้ นางสาวสุนิสา กระจิว นิสิตปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นผู้ช่วยดำเนินการเก็บข้อมูลของกระบวนการทำการตรวจทางชีวโมเลกุล นางสาว เกศินี อรุณยิ่งมงคล พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ช่วยทำหารตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาของผู้ป่วยทุกราย และผู้ป่วยทุกท่านที่ร่วมในการศึกษาครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่
1 บทนำ.....1
2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3
3 รายระเอียดกระบวนการทำ RT-PCR และการตรวจทาง serology โดยวิธี HAT และ ELISA.....26
4 วิธีการดำเนินการวิจัย.....28
5 ผลการวิจัย.....32
6 อภิปรายผลการวิจัย.....41
รายการอ้างอิง.....44
ภาคผนวก.....49
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การกระจายของเชื้อไวรัสเดงกีในภูมิภาคต่างๆแยกตาม serotype.....27
ตารางที่ 2.2 แสดงการพบไวรัสเดงกีในอวัยวะต่างๆของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก.....28
ตารางที่ 2.3 การแปลผล Hemagglutination-inhibition test ของเชื้อไวรัสเดงกี.....29
ตารางที่ 5.1 ลักษณะของผู้ป่วยที่เข้าในการศึกษา.....44
ตารางที่ 5.2 ลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูก.....45
ตารางที่ 5.3 ผลการตรวจ HAI และ ELISA.....46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1: ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศต่าง ๆ.....21
รูปที่ 2.2: อัตราการป่วยจากโรคไข้เลือดออกปี 2503-2545.....22
รูปที่2.3: แสดงโปรตีนของไวรัสเดงกี.....23
รูปที่2.4: ระดับความรุนแรงของไข้เลือดออกเดงกี.....24
รูปที่2.5 : รูปแบบของอาการ/อาการแสดงของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี.....25
รูปที่2.6: ตอบสนองของภูมิคุ้มกันใน primary และ secondary dengue infection.....26
รูปที่5.1-5.4: ภาพแสดงผลการตรวจ RT-PCR จากในไขกระดูก.....47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

การติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทย โดยประเทศไทยเป็น hyperendemic area ซึ่งหมายถึงมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อสูง ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี ปัจจุบันยังไม่ทราบพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคไข้เลือดออกอย่างแน่ชัด แต่เชื่อว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีหลังจากที่หายจากโรคแล้วจะไม่มีภาวะ persistence คือไม่มีไวรัสเดงกีที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ในร่างกาย มีแต่ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อเท่านั้น แต่ก็มีไวรัสที่อยู่ในกลุ่ม flavivivirus บางตัวที่มีความสามารถในการที่จะหลบซ่อนในร่างกายหลังจากการติดเชื้อครั้งแรก เช่นมีการศึกษาพบไวรัสตับอักเสบซีและไวรัสจบีวีซี(GBV-C) ในไขกระดูก ดังนั้นการหาหลักฐานว่ามีไวรัสเดงกีหลงเหลืออยู่ในร่างกาย ก็จะทำให้เข้าใจพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมากยิ่งขึ้น และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการตรวจหาไวรัสเดงกีโดยวิธีทางชีวโมเลกุล หรือ Reverse Transcriptase- PCR (RT-PCR) ในไขกระดูก

1.2 คำถามการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (Primary Research Question) สามารถตรวจพบไวรัสเดงกีได้ในไขกระดูกของประชากรกลุ่มที่น่าจะเคยมีการติดเชื้อไวรัส เดงกีมาก่อน

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objective)

เพื่อศึกษาการตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธี RT-nested PCR และศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อเดงกีและต่อเติมส่วนของความเข้าใจที่ยังบกพร่องเกี่ยวกับ ประเด็นเรื่อง viral persistence

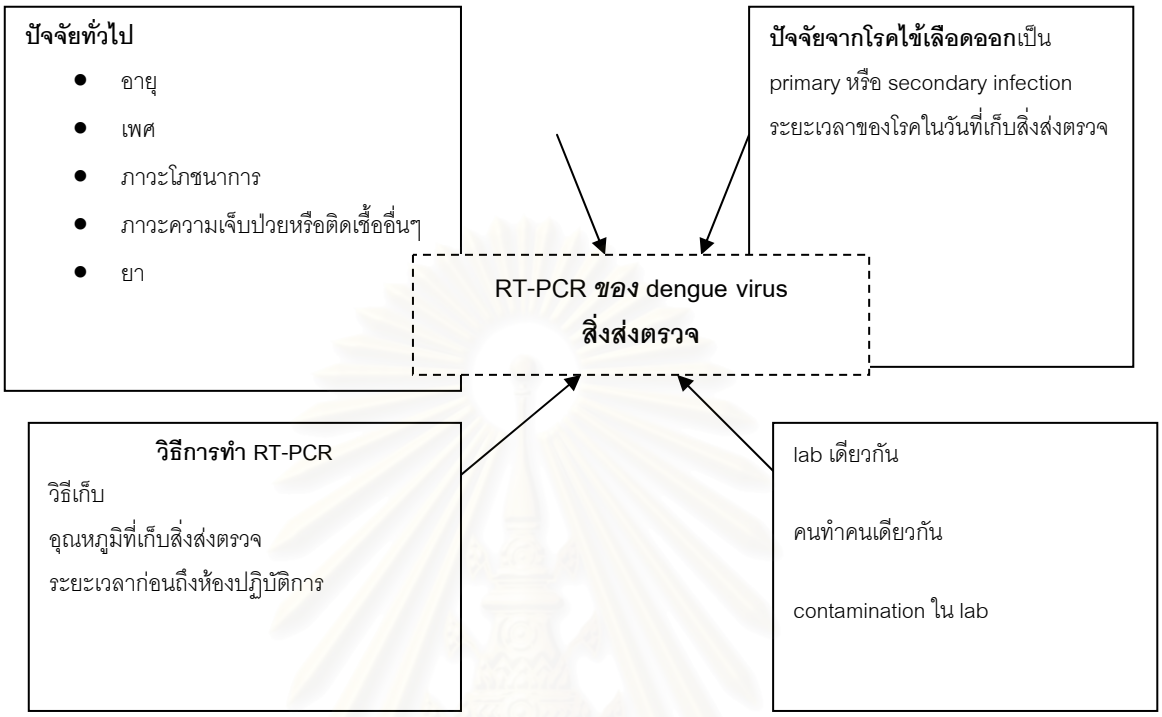
1.4 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

1.5 สมมุติฐานของการวิจัย (hypothesis)

สามารถตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธี RT-nested PCR ในผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีต

1.6 **กรอบความคิดในการทำวิจัย** (Conceptual Framework)



1.7 **การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย** (Operational Definition)

1. ผู้ป่วยที่มารับการตรวจไขกระดูกหมายถึงผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจไขกระดูก เพื่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษา
2. Polymerase chain reaction (PCR)เป็นวิธีการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA อย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ส่วน RT-nested PCR (Reverse transcription-nested polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคการตรวจ PCR ที่พัฒนาเพื่อเพิ่ม sensitivity ของการตรวจ

1.8 **ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย** (Expected Benefits & Application)

- เข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดโรคจากการติดเชื้อเดงกีไวรัสเกี่ยวกับการมี persistence
- สามารถนำเทคนิคการตรวจหาไวรัสในไขกระดูกเพื่อนำไปดัดแปลงใช้ในการตรวจหาไวรัสในสิ่งส่งตรวจอื่นๆ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม, เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้พื้นฐานและระบาดวิทยาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสเดงกี

เชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus) เป็นหนึ่งใน single-stranded RNA virus ที่อยู่ใน family Flavivirida มีทั้งหมด 4 ซีโรไทป์ (DEN-1, DEN-2, DEN-3 และDEN-4) พบการระบาดครั้งแรก ในประเทศฟิลิปปินส์ในปี พ.ศ. 2497 หลังจากนั้นพบว่ามีการระบาดในประเทศต่าง ๆ ทุกทวีป โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน (รูปภาพที่ 2.1) ในประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 [1] โดยมีแนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มมากขึ้นทุกๆปี ตั้งแต่ที่มีการ ระบาดในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ยกเว้นในปี พ.ศ.2542-2543 ซึ่งมีจำนวนผู้ป่วยลดลง อย่างมากเนื่องจากมีโครงการรณรงค์อย่างจริงจัง [2] (รูปภาพที่ 2.2 ตารางที่ 2.1) โดยซีโรไทป์ที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ DEN-1, DEN-2 และ DEN-3

Biology of dengue virus

Dengue virus เป็น RNA ไวรัส การเกิดโรคจากไวรัสในกลุ่ม flavivivirus ส่วนใหญ่การติดเชื้อเกิดผ่านจากแมลงมายังมนุษย์ ไวรัสที่อยู่ในกลุ่มนี้ที่เป็นที่รู้จักดีได้แก่ yellow fever, Japanese encephalitis, St Louis encephalitis, tick-borne encephalitis viruses

ดังที่กล่าวมาแล้วว่า dengue virus สามารถแบ่งกลุ่มทาง serology ได้เป็น 4 serotype คือ DEN-1, DEN-2,DEN-3 และ DEN-4 โดยที่ไวรัสทั้ง 4 ชนิดจะมีความแตกต่างกันทาง serology เนื่องจากมีความแตกต่างของ envelope protein และพบว่า ไวรัส DEN-1 และ DEN-3 มีความใกล้เคียงกันมากกว่า serotype อื่น

Immune response ในโรคติดเชื้อ dengue

Dengue virus ประกอบด้วย viral protein 10 ชนิด ได้แก่ membrane pretein (M), envelope glycoprotein(E), core , และ non-structural(NS) protein อีก 7 ชนิด

มีการศึกษา antibody ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี พบว่า anti E- antibody ตรงส่วน envelope protein domain III (E-D3) ที่เป็น conserve region ของ flavivivirus เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อ infectivity ของ dengue virus ทุก serotype โดยที่ antibody ต่อส่วนนี้จะมีผลทำ

ให้ป้องกัน การติดเชื้อเดงกีได้ โดยยับยั้ง binding ของไวรัสกับเซลล์ และ neutral viral infectivity นอกจากนี้ยังมี cross-reactivity ระหว่าง serotype ต่างๆ ที่จะป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในหนู

NS1 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์มีการติดเชื้อให้เข้าไปอยู่ในกระแสเลือด antibody ต่อ NS เป็นตัวที่สำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ complement-mediated lysis of DV-infected cell ใน vivo ในขณะเดียวกัน antibody นี้เองก็มีผลทำให้เกิด endothelial injury NS3 เป็น antigen ที่สำคัญที่เป็นตัวกระตุ้น กลไกการอักเสบโดยผ่าน antigen presenting cell แล้วมีการกระตุ้น dengue-specific CD4 และ CD8 T cell เป็นผลทำให้ มีการหลั่ง interferon gamma, beta และ alpha ทั้งหมดนี้จะทำให้เกิดการ lysis ของ dengue-infected cell ในที่สุด โดยสรุปพบสว่ามีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเดงกี โดยผ่ายหลายกลไก ในช่วงแรกการมีกระตุ้น B cell, NK cell และ IgM ส่วนช่วงหลังมีการกระตุ้น interferon gamma และ IgG จะมีผลในช่วงหลัง ส่วนในระยะยาวยังไม่มีข้อมูลที่มากเพียงพอ

การติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์หนึ่ง ๆ จะทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์นั้น ๆ อย่างถาวรไปตลอดชีวิต (homotypic immunity) แต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่น (heterotypic immunity) และป้องกันการติดเชื้อข้ามไปยังเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ชั่วคราวในช่วงระยะเวลาประมาณ 3-12 เดือน

Target cells ของ dengue infection

โดยทั่วไปหลังจากที่ได้รับเชื้อจากการที่ถูกยุงกัด จะมีการแบ่งตัวที่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง จากนั้นเชื้อก็จะเข้าไปที่ต่อมน้ำเหลืองและมีการแบ่งตัวกระจายไปตามเลือด (dissemination) จากนั้นเชื้อจะเข้าไปอยู่ตามอวัยวะต่างๆ [3] ในช่วงนี้จะเป็นช่วงที่เริ่มมีไข้เชื้อที่เข้าไปอยู่ใน กระแสเลือดสามารถเข้าไปอยู่ในเซลล์ต่างๆ [4] ได้แก่ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดย dengue สามารถที่จะอยู่ได้ทั้งใน monocyte และ B lymphocyte นอกจากนี้จะสามารถตรวจพบ dengue virus ในอวัยวะต่างๆที่มี cell ดังกล่าว จากการตรวจศพผู้ป่วยที่เสียชีวิต จากโรคไข้เลือดออก จะพบไวรัสที่เนื้อเยื่อต่างๆได้แก่ spleen, thymus, Kupffer cells, monophagocyte cells ของผิวหนัง, circulating monocytes, บางส่วนของ B-cells และบนผิวของเกร็ดเลือด การตรวจพบดังกล่าวเป็นการตรวจด้วยวิธี viral isolation หรือ antigen detection ดังตาราง 2.2 [5]

Location of viral genome in tissues or cells

มีการตรวจพบ virus ใน plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) โดยตรวจพบทั้ง infectious virus และ viral antigen เชื่อว่า cell ส่วนใหญ่ที่มีส่วนในการแบ่งตัวของไวรัสได้แก่ monocyte ส่วนใน B-lymphocyte พบได้บ้าง

มีการศึกษาในห้องทดลองที่พบว่า dengue virus สามารถที่จะ ติดเชื้อใน human cell line ได้ 23 cell line ในจำนวนนี้ประกอบด้วยทั้ง B cell line และ T cell line

ส่วนในไขกระดูก มีการตรวจพบว่า stromal cells ในไขกระดูกมี dengue antigen และเชื่อว่าอาจจะเป็นส่วนที่ ทำให้มี viral replication และ bone marrow suppression ในช่วง acute dengue infection [6,7]

Immunopathogenesis of dengue infection

เชื่อว่าการเกิดโรคและพยาธิสภาพใน dengue infection ส่วนหนึ่งเป็นจาก การที่ระบบภูมิคุ้ม กันของร่างกายตอบสนองต่อ virus ที่เป็น antigen

หน้าที่หลักของ antibody response ใน dengue infection ได้แก่

Neutralization
Complement-mediated cytolysis
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

Antibodies ต่อ dengue virus รวมกับ antigen เป็น antigen-antibody complex หลังจากนั้นมีการกระตุ้น CD4+ T cell แล้วมีการสร้าง IL-2, TNF gamma, จะกระตุ้นให้มีการสร้าง Fc gamma receptor ซึ่งจะช่วยเกิด antibody-dependent enhancement of infection หลังจากที่มีการเพิ่มจำนวน monocyte ที่มีการติดเชื้อ dengue ก็มีการกระตุ้นและสร้าง dengue virus-specific T cell การที่มีการเพิ่มและกระตุ้น T cell ก็จะทำให้มีระดับของ lymphokines สูงขึ้นอย่างมาก

Antibody-mediated immunity to dengue virus infection

พบว่ากลไกของการป้องกันการติดเชื้อเดงกีประกอบไปด้วย virus neutralization, complement lysis และ antibody-dependent cellular toxicity

จากการทดลองในหนูพบว่า monoclonal antibody ต่อส่วนที่เป็น protein E และ pre-M ของไวรัสเดงกี สามารถที่จะป้องกันการติดเชื้อเดงกีซ้ำได้ ได้มีการทดลองโดยใช้ pre-M antibody จาก antibody ห้าชนิด พบว่าสอง antibody สามารถที่จะ neutralize ไวรัส และ สามารถที่จะ fix complement ได้ที่ความเข้มข้นของ antibody ต่ำๆ สอง ชนิดสามารถที่จะ fix complement เพียงอย่างเดียว และหนึ่ง antibodyที่เหลือ ไม่สามารถมี reactivity

Persistent infection in dengue virus

ไวรัสในกลุ่ม flavivivirus มักจะไม่มีการติดเชื้อแบบ persistence แต่อย่างไรก็ตามก็มีทดลองที่พบว่า Japanese encephalitis virus และ Westnile virus สามารถที่จะ ติดเชื้อและมี persistence ได้ใน vivo ส่วนใน dengue virus เองก็ได้มีการทกลองพบว่าสามารถทำให้เกิด persistent infection ได้ใน cell หลายชนิด ได้แก่ Epstein-Barr virus (EBV)-transformed human lymphoblastoid cell line, Raji cell [8]

โดยทั่วไปไวรัสสามารถที่จะใช้กลไกที่ทำให้เกิด persistent infection ได้ 2 วิธีได้แก่

1. มีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่อยู่ที่บริเวณผิวหน้าของเซลล์ เพื่อที่จะหลบจากการจดจำของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย
2. มีการเปลี่ยนแปลง gene expression เพื่อที่จะให้มีการแบ่งตัวที่ช้าลง เป็น nonlytic replication สาเหตุที่ virus ในกลุ่ม flavivivirus สามารถที่จะแบ่งตัวและเกิด persistence นั้นมีหลักฐาน จากการใช้ model ของ virus ในกลุ่มนี้ ได้แก่

Tick-borne encephalitis

Strain ที่แตกต่างกันของไวรัส TBEV มีผลต่อการเกิด persistent infection ที่แตกต่างกันและ cell บางชนิดเองก็มีความจำเพาะ ต่อการติดเชื้อแตกต่างกัน ไวรัสที่มีความผิดปรกติทางโครงสร้างที่ ตำแหน่ง prM, E genes and NS1, gene fragments เป็นไวรัสที่มีความสามรถที่จะเกิด viral persistence มีการเปรียบเทียบการติดเชื้อ TBEV ใน human kidney cells ในระยะ acute กับ chronic infection ในไวรัสที่มีการเกิด persistence มีการเปลี่ยนแปลงของ NS1 และ E glycoprotein ซึ่งเป็น surface glycoprotein ของไวรัส [9]

Model ของการตรวจพบ Flavivirus ในไขกระดูก

ไวรัส GBV-C ถูกค้นพบในปี ค.ศ.1995 เนื่องจากมีลักษณะทางโครงสร้าง ที่คล้ายกับไวรัส hepatitis C ถึง 95% ขณะนั้นผู้ที่ค้นพบคิดว่าไวรัสนี้เป็นไวรัสชนิดเดียวกับ ไวรัสตับอักเสบ จึงได้ถูกเรียกอีกชื่อว่า hepatitis G virus แต่ภายหลังพบว่าไวรัสนี้ไม่ได้ เป็นสาเหตุ ของการเกิดโรคตับอักเสบ จึงทำให้ปัจจุบันนิยมเรียกว่า GBV-C มากกว่า

ในช่วงที่มีการค้นพบไวรัสนี้ใหม่ๆ เนื่องจากยังคิดว่าเป็นไวรัสที่คล้ายกับไวรัส HCV จึงมีผู้ที่พยายามทำการศึกษาเกี่ยวกับประเด็น extra-hepatic manifestations ของไวรัสนี้ว่าเหมือนกับ

ไวรัส HCV หรือไม่ ต่อมาก็พบว่าสามารถที่จะตรวจพบ GBV-C ได้ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC), และตรวจพบไวรัสนี้ได้ในไขกระดูก, ม้าม และต่อมน้ำเหลือง โดยวิธการย้อม antigen ของไวรัส [10,11]

ในปี ค.ศ. 1998 ได้มีการทดลองหา GBV-C ในไขระดูกร่วมกับการใช้ strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Tth-based strand-specific assay) พบว่าทั้ง HCV และ GBV-C มี active replication ในไขกระดูกของผู้ป่วยโรคเลือด ที่เข้ามารับการเจาะตรวจ ไขกระดูก [12] มีหลักฐานที่สนับสนุนว่า GBV-C เป็น lymphotrophic virus จึงสันนิษฐานว่าไวรัสสามารถ ที่จะแบ่งตัวได้ในเซลล์ดังกล่าวและสามารถตรวจพบ GBV-C ได้ในอวัยวะต่างๆอยุ่ในreticuloendothelial system

ในช่วงที่มีการระบาดของการติดเชื้อไวรัส HIV ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ GBV-C ไวรัส HIV เนื่องจากเป็นไวรัสที่มีคุณสมบัติที่จะติดเชื้อใน CD4 positive T cell เหมือนกัน และมีการศึกษา in vitro ที่พบว่าเมื่อเซลล์ CD4 positive T cell มี GBV-C อยู่ก่อนเมื่อมีการติดเชื้อ HIV เข้าไปในเซลล์เดียวกันจะทำให้ การแบ่งตัวของไวรัส HIV ลดลง [13,14] ซึ่งการค้นพบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านอกจากไวรัส GBV ในเซลล์แล้วยังสามารถ ทำให้เกิด interaction ระหว่างตัวมันเองกับไวรัสอื่นๆที่ติดเชื้อเข้าไปในเซลล์เดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 อาการ/อาการแสดงของโรคเชื้อไวรัสเดงกี

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นโรคติดต่อจากคนไปสู่คนโดยมีแมลงคือยุงลายเป็นพาหะ ยุงลายชนิดที่มีความสำคัญในทางระบาดวิทยาคือ Aedes aegypti ซึ่งเป็นยุงที่ออกหากิน ดูดเลือดคนในเวลากลางวัน โดยเชื้อไวรัสเดงกีจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และในที่สุดจะไปอยู่ ในต่อมน้ำลายของยุงตัวเมียที่ดูดเลือดของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในกระแสโลหิต ยุงที่มีเชื้อ ไวรัสอยู่จะสามารถแพร่เชื้อได้ตลอดช่วงชีวิตของมัน

ระยะฟักตัวของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในช่วงระยะเวลา 3-15 วัน โดยเฉลี่ยประมาณ 7 วัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไม่มีอาการ ส่วนในรายที่มีอาการนั้นสามารถมีอาการได้ 4 รูปแบบดังต่อไปนี้ (รูปภาพที่ 2.3)

1. **ไข้ทั่ว ๆ ไปหรือกลุ่มอาการติดเชื้อไวรัส** (undifferentiated fever or viral syndrome; UF) เป็นกลุ่มอาการที่มีลักษณะเหมือนกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถแยกกันได้จากอาการและอาการแสดงทางคลินิก คือมีไข้สูงเฉียบพลัน โดยอาจจะมีผื่น maculopapular ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ อาการในกลุ่มนี้มักพบในเด็กเล็ก
2. **ไข้เดงกี** (dengue fever; DF) ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงเฉียบพลัน ปวดศีรษะมาก ปวดรอบกระบอกตา ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดกระดูกอย่างรุนแรงที่เรียกว่า “break bone fever” การทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก (positive tourniquet test) ส่วนใหญ่จะตรวจพบเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดต่ำ อาการในกลุ่มนี้มักพบในเด็กโต และผู้ใหญ่
3. **ไข้เลือดออกเดงกี** (dengue hemorrhagic fever; DHF) อาการและอาการแสดงเหมือนกับไข้เดงกี (dengue fever) ร่วมกับมีการรั่วของพลาสมา ทำให้ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ Hct อาจตรวจพบน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดโดยเฉพาะช่องเยื่อหุ้มปอดข้างขวาจากการตรวจร่างกายหรือจากภาพเอ็กซเรย์ปอด บางรายอาจตรวจพบน้ำในช่องท้องได้ ความรุนแรงของอาการในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งที่สอง (การติดเชื้อไวรัสเดงกีทุติยภูมิ - secondary dengue infection) ซึ่งเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ต่างซีโรไทป์กับการติดเชื้อครั้งแรก (การติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิ – primary dengue infection) และจะมีแนวโน้มที่จะมีความรุนแรงมากกว่าการติดเชื้อครั้งแรก ยกเว้นในเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 1 ขวบซึ่งยังมีภูมิคุ้นกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีที่ได้รับจากมารดาซึ่งเคยติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อนและภูมิคุ้มกัน

ดังกล่าวยังหลงเหลืออยู่โดยที่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อแก่เด็กได้ แต่จะทำให้เกิดอาการของการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่รุนแรงได้

การดำเนินโรคของไข้เลือดออกเดงกีแบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะไข้ (febrile stage)

ไข้จะสูงเฉียบพลันและจะสูงลอยประมาณ 2-7 วัน ไม่ตอบสนองหรือตอบสนองต่อยาลดไข้เพียงเล็กน้อย ร่วมกับมีอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและกระดูก หน้าแดง จุกเสียดแน่นท้องบริเวณลิ้นปี่ ตับโตกดเจ็บคลื่นไส้อาเจียน ผลทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก เลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น เลือดกำเดาออก ถ่ายอุจจาระเป็นสีดำ ผื่น petechiae ขึ้นที่ผิวหนัง เป็นต้น

ระยะที่ 2 ระยะวิกฤต/ช็อก (shock stage)

เกิดพร้อม ๆ กับช่วงที่ไข้ลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดในช่วงระยะเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะเข้าสู่ระยะนี้หลังจากปริมาณเกร็ดเลือดต่ำลงประมาณ 12-24 ชั่วโมง [15] ถ้ามีการรั่วของพลาสมามากจะทำให้ผู้ป่วยมีความดันโลหิตต่ำและช็อกได้

ระยะที่ 3 ระยะฟื้นตัว (convalescent stage)

มีการหยุดการรั่วของพลาสมาร่วมกับอาการโดยทั่ว ๆ ไปของผู้ป่วยที่ดีขึ้น ผู้ป่วยจะมี ความอยากอาหารมากขึ้น ปัสสาวะออกมากขึ้น หัวใจเต้นช้าลง อาจมีผื่นขึ้นบริเวณลำตัว แขนขา ซึ่งเป็นผื่นที่มีลักษณะเฉพาะสำหรับโรคนี้ เรียกว่า “convalescent rash” โดยจะ เห็นมีลักษณะเป็นวงเล็ก ๆ สีขาวกระจายอยู่บนพื้นแดงซึ่งเป็น petechial rash ที่ขึ้น รวมกัน

ความรุนแรงของไข้เลือดออกแดงกี แบ่งออกเป็น 4 ระดับ (grade) ดังนี้ (รูปภาพที่ 2.4)

ระดับ 1 (grade I) ผู้ป่วยมีไข้ ร่วมกับการทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก โดยที่ไม่พบมีเลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ และ/หรือ มีจ้ำเลือดขึ้นได้ง่ายจากการโดนกระทบกระแทก (easy bruising)

ระดับ 2 (grade II) ผู้ป่วยมีเลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ เอง (spontaneous bleeding)

ระดับ 3 (grade III) ผู้ป่วยมีความดันโลหิตต่ำ, ชีพจรเบาเร็ว, pulse pressure แคบ (น้อยกว่า 20 มม.ปรอท), ช็อก

ระดับ 4 (grade IV) ผู้ป่วยมีภาวะช็อกอย่างรุนแรง (profound shock), คลำชีพจรไม่ได้, วัดความดันโลหิตไม่ได้

4. **ไข้เดงกีช็อก** (dengue shock syndrome; DSS) คือกลุ่มอาการไข้เลือดออกเดงกี (dengue hemorrhagic fever) ที่มีการรั่วของพลาสมามากจนทำให้ผู้ป่วยมีภาวะช็อก คือไข้เลือดออกเดงกีที่มีระดับความรุนแรง 3 หรือ 4 นั่นเอง

2.3 การเปลี่ยนแปลงทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ

2.3.1 **การตรวจนับเม็ดเลือด** (CBC) ระดับ Hct จะสูงขึ้นจากการที่ผู้ป่วยมีภาวะแห้งน้ำเนื่องจากรับประทานได้น้อย ไข้สูง ร่วมกับมีการรั่วของพลาสมา โดยมักจะเกิดในวันเดียวกันหรือภายหลังจากวันที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดลดลงต่ำที่สุด ซึ่งมักจะพบในระยะก่อนไข้ลง ใกล้ที่จะเข้าสู่ระยะวิกฤต/ช็อก ส่วนในรายที่ระดับ Hct ต่ำลงควรที่จะพยายามค้นหาว่ามีเลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะอวัยวะภายในช่องท้องหรือไม่ หรือผู้ป่วยอาจมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) จากโรคเลือดบางอย่างเช่น โรคธาลาสซีเมีย ฮีโมโกลบินเอช เป็นต้น ปริมาณเม็ดเลือดขาวในช่วงแรกอาจปกติหรือสูงกว่าปกติเล็กน้อย แต่ประมาณจะลดลงในช่วงเวลาต่อมา โดยอาจจะลดลงอยู่ในช่วง 1,000-2,000 ตัว/ลบ.มม. ได้ ร่วมกับมีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และจากการตรวจดูเสมียร์เลือด (peripheral blood smear) อาจพบว่าลักษณะของ lymphocyte จะเป็น atypical lymphocyte ชนิด plasmacytoid ได้สูงถึง 10-35% ส่วนปริมาณเกร็ดเลือดสามารถลดลงต่ำกว่า 20,000 /ลบ.มม. ได้[16]

2.3.2 **การตรวจการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง** (ESR) จะปกติในช่วงที่มีไข้ และจะลดต่ำลงในช่วงระยะวิกฤต/ช็อก ซึ่งอาจนำมาใช้ช่วยในการแยกโรคกับการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacterial sepsis) ได้

2.3.3 **การทดสอบทูนิเกต์** (tourniquet test) ทำโดยการใช้เครื่องวัดความดันโลหิตรัดที่ต้นแขน ขึ้นความดันให้อยู่กึ่งกลางระหว่างความดัน systolic และความดัน diastolic ค้างไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วอ่านผลหลังจากคลายความดันที่รัดไว้แล้วประมาณ 1 นาที โดยแปลผลว่า "บวก" ถ้ามีจุดเลือดออก (petechiae) มากกว่า 10-20 จุด/ตารางนิ้ว[15,18] โดยมีความไว (sensitivity) ของวันที่ 1, 3 และ 5 ของโรคอยู่ที่ 53.3%, 90.6% และ 98.7% ตามลำดับ ความจำเพาะ (specificity) ของวันที่ 1, 3 และ 5 ของโรคอยู่ที่ 75.8%, 77.8% และ 74.2% ตามลำดับ[18]

2.3.4 **การตรวจการแข็งตัวของเลือด** (coagulogram) จะตรวจพบว่าค่า PT และ PTT ยาวกว่าค่าควบคุมได้ โดยที่ค่า PTT จะมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า เกิดจากการที่การทำงานของตับบกพร่อง ร่วมกับมีภาวะ DIC

2.3.5 **การตรวจการทำงานของตับ** (liver function tests) ผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถตรวจพบการเพิ่มขึ้นของระดับ transaminase enzymes โดยที่ระดับ AST จะเพิ่มสูงกว่าระดับ ALT ผู้ป่วยมักไม่ค่อยมีอาการตาตัวเหลือง นอกจากจะมีภาวะแทรกซ้อนคือมีภาวะตับวายอย่างรุนแรง (fulminant hepatic failure) หรือมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยที่มีโรคเลือดบางชนิดอยู่แล้ว เช่น โรคธาลาสซีเมีย ฮีโมโกลบินเอช และโรคขาดเอนไซม์ G-6-PD เป็นต้น

2.3.6 **ภาพเอ็กซเรย์ปอด** (chest X-ray) จะพบน้ำในเยื่อหุ้มปอดได้ในระยะที่มีการรั่วของพลาสมา โดยเฉพาะช่องเยื่อหุ้มปอดข้างขวา

2.4 การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงกี/ไข้เลือดออกเดงกีช็อก

การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงกี/ไข้เลือดออกเดงกีช็อก (DHF/DSS) นั้นอาศัยอาการทางคลินิกและการเปลี่ยนแปลงทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้นตามเกณฑ์การวินิจฉัยตามองค์การอนามัยโลก (WHO) โดยใช้เกณฑ์อาการทางคลินิก 2 ข้อแรกเป็นหลัก ร่วมกับเกณฑ์การตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 1 ข้อ เกณฑ์ดังกล่าวนี้ช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงกี/ไข้เลือดออกเดงกีช็อกได้ตั้งแต่ในระยะแรกของโรค ก่อนที่ผู้ป่วยจะเข้าสู่ภาวะช็อกเต็มขั้นได้ ดังนั้นจึงเป็นเพียงการวินิจฉัยเบื้องต้น (provisional diagnosis) เท่านั้น[17]

อาการทางคลินิก

1. ไข้สูงเฉียบพลัน (2-7 วัน)
2. อาการเลือดออก (นับรวมถึงผลบวกจากการทดสอบทูนิเกต์ด้วย)
3. ตับโต (มักกดเจ็บร่วมด้วย)
4. มีภาวะช็อก

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. ปริมาณเกร็ดเลือด < 100,000/ลบ.มม.
2. มีการเพิ่มขึ้นของ Hct > 20% เมื่อเทียบกับค่าปกติเดิม หรือค่าเฉลี่ยปกติสำหรับอายุและเพศของประชากรนั้น ๆ

2.5 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี

การตรวจทางน้ำเหลือง (Serologic diagnosis)

คือ การตรวจหา antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งมีอยู่หลายวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน แต่วิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไปคือวิธี ELISA และ HAI ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป ข้อเสียของการตรวจหา antibody คือสามารถมีปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ได้ระหว่าง flavivirus ด้วยกันเช่น Japanese encephalitis virus (JEV), St. Louis encephalitis virus, West Nile virus ซึ่งจะทำให้มีปัญหาในการแปลผล

ในพื้นที่ที่มีเชื้อเหล่านี้อยู่ด้วย สำหรับในประเทศไทยก็จะมีปัญหา ในการแปลผลเพื่อแยกจากการติดเชื้อ JEV ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมี IgM ขึ้นภายหลัง จากมีไข้ประมาณ 2-4 วัน IgM จะเพิ่มขึ้นและคงอยู่ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 3-6 เดือน สำหรับการติดเชื้อแบบทุติยภูมินั้นจะพบการเพิ่มขึ้นของ IgG ก่อน IgM ถึงแม้ว่าจะเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกี serotype ที่ต่างจากเดิมก็ตาม (รูปภาพที่ 2.5)

การตรวจทาง serology สำหรับ dengue virus จะค่อนข้างสลับซับซ้อน ในการแปลผลเนื่องมาจาก

1. ผู้ป่วยอาจจะมีการติดเชื้อหลายครั้ง โดยไวรัสเดงกี 4 subtype* ได้เนื่องจากไม่มีการ cross-protection ของ neutralizing antibodies
2. ในบางพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสในกลุ่ม flaviviviruses อื่นๆ ก็จะมี ผลการตรวจลวงเนื่องจากร่างกายมีการสร้าง antibodies ต่อ flaviviruses เหล่านี้เหมือนกัน
3. IgG antibodies มีความสามารถที่จะทำให้เกิดการ cross-reactivity ต่อ homologous และ heterologous flavivirus antigen
4. หลังจากที่มีการติดเชื้อครั้งก่อนร่างกายจะมีการสร้าง antibodies อยู่ได้นาน

การตรวจหา antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกีมีหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. **Hemagglutination-inhibition test (HAI หรือ HI)**

หลักการของการตรวจโดยวิธีนี้ก็คือ antibodies ต่อ dengue virus สามารถที่จะยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน วิธีนี้จะเป็นวิธีที่เตรียมได้ง่ายและรวดเร็ว ขั้นตอนต้องมีการเตรียมสารที่ยับยั้ง non-specific inhibitor ต่างๆ ด้วยการเติม acetone หรือ kaolin และเติม type O red blood cells เพื่อ remove non- specific inhibitor of agglutinins ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องใช้การเปรียบเทียบ 2 serumในระยะเวลาที่ห่างกัน การตอบสนองของระดับ antibody ต่อการติดเชื้อ dengue virus ในกรณีที่เป็น primary infection จะมีระดับของการตอบสนองโดย antibodies จะสูงขึ้นช้าๆ และอยู่ระดับต่ำๆ ส่วนกรณีที่เป็น

secondary infection การตอบสนองจะรวดเร็วและขึ้นสูง ในกรณีที่เป็น primary infection ระดับของ antibodies response น้อยกว่า 1:2,560 แต่ถ้า เป็น secondary infection ระดับของ antibodies titer ควรจะมากกว่า 1:2,560

เนื่องจากเชื้อไวรัสเดงกีเป็นไวรัสที่มีสาร hemagglutinin ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่มกัน จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการหา antibody ต่อเชื้อไวรัสโดยดูการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง หลังจากผสมซีรั่มของผู้ป่วยที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ กับสาร hemagglutinin การแปลผลนั้นอ่านออกมาเป็นค่า titer ของซีรั่มที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ แต่ต้องแปลผลโดยใช้ซีรั่มสองครั้งที่เจาะห่างกันอย่างน้อย 7 วัน (ตารางที่ 2.3) วิธีนี้ในปัจจุบันยังถือว่าเป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นวิธีที่สามารถแยกการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิและทุติดยภูมิได้ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า antibody ที่ขึ้นนั้นเป็นชนิด IgG หรือ IgM วิธีนี้สามารถแยก serotype ของเชื้อไวรัสเดงกีได้สำหรับการติดเชื้อแบบปฐมภูมิ ส่วนการติดเชื้อไวรัสเดงกีทุติยภูมินั้นไม่สามารถบอก serotype ได้เนื่องจากเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีซ้ำด้วย serotype อื่น จะมีการกระตุ้นให้มีการสร้าง antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกี serotype เดิมให้สูงขึ้น เพราะเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 serotypes มี antigen บางส่วนที่เหมือนกัน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “doctrine of original antigenic sin”

2. **Plaque reduction neutralization test (PRNT)** เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากที่สุดเมื่อเทียบกับการตรวจทางน้ำเหลืองชนิดอื่น ๆ สามารถแยก serotype ในการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิได้[20]แต่เป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยากในการทำและเป็นวิธีที่ใช้เวลาในการทำนาน จึงไม่เป็นที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน ใช้หลักการลดการเกิดการเกาะกลุ่มกัน (plaque formation) ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี หลังจากนำเชื้อไวรัสเดงกีไปผสมกับซีรั่มของผู้ป่วย การแปลผลนั้นอ่านเป็นค่า titer ของซีรั่มที่สามารถลดจำนวน plaque ได้ 50-90% [21,22]
3. **Complement fixation test (CF)** เป็นการทดสอบที่อาศัยหลักการที่ว่า complement จะถูกนำใช้ถ้ามีการจับกันระหว่าง antigen กับ antibody ทำให้ไม่มีปริมาณ complement เหลือมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดการแตก (hemolysis) ของเม็ดเลือดแดงที่จับกับ antibody กับเม็ดเลือดแดง วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่สามารถแยก serotype ของเชื้อไวรัสเดงกีสำหรับการติดเชื้อแบบปฐมภูมิได้ แต่วิธีการทำยุ่งยาก และ antibody ขึ้นช้ากว่า antibody ที่ทดสอบได้โดยวิธี HAI [23]

Enazyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) เป็นการทดสอบที่มีความสะดวก รวดเร็ว และง่ายกว่าสามวิธีการทดสอบทางน้ำเหลืองข้างต้น มีความไวและความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดของ antibody ระหว่าง IgG และ IgM ได้ สามารถแยกการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ รวมทั้งยังสามารถแยกการติดเชื้อ JEV ได้

หลักการของ ELISA คือ การจับคู่กันระหว่าง antigen กับ antibody ดังนั้นการตรวจโดยวิธีนี้จะสามารถที่จะ detect ได้ทั้ง antigen และ antibody ที่อยู่ในตัวอย่างส่งตรวจ

ขั้นตอนของการทำ ELISA มีดังนี้

1. ในกรณีที่เป็นการตรวจหา antibody ก็จะใช้ antigen ที่เตรียมไว้ โดยที่ antigen จะเคลือบอยู่บนผิวของ หลุม
2. เติมสิ่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงไปในหลุมที่มี antigen coat อยู่ หากมี antibody ที่ต้องการหาอยู่ในตัวอย่างก็จะเกิดการจับกันของ antibody ที่อยู่ในส่งส่งตรวจกับ antigen ที่อยู่ในหลุม
3. ทำการล้างเอาส่วนของ antibody ที่ไม่ต้องการออก ทำให้เหลืออยู่แต่ antigen-antibody complex
4. เติม antibody ที่สองลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกริยากับ antigen-antibody complex อีกครั้ง แล้วทำการล้างเอาส่วนของ second antibody ออก
5. เติมสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นปฏิกริยาทำให้เกิดสีในหลุม แล้วทำการอ่านผล โดยวัดตามปริมาณของสี หรือแสงจากในหลุม การอ่านผลอาจจะใช้เป็น spectrophotometer หรือ optical device อื่นๆ

ปัจจุบันมีหลายวิธีย่อย ๆ แต่วิธีที่ได้รับความนิยมมากคือ Immunoglobulin M capture enzyme linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) และ rapid ELISA วิธี MAC-ELISA ถือเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี การแปลผลอาจใช้ผลจากซีรั่มเดี่ยวได้ หรือถ้าเป็นซีรั่มคู่นั้นสามารถเจาะเลือดห่างกันเพียง 2-3 วัน

การแปลผลว่ามีติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น ค่า antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกีจะต้องมากกว่า antibody ต่อ JEV ถ้าเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิ ค่า IgM:IgG จะมากกว่า 1.8:1 และค่า IgM ต้องมีค่าอย่างน้อย 40 units หรือมีการเพิ่มขึ้นของ IgM จากค่าที่น้อยกกว่า 15 units เป็นมากกว่า 30 units ส่วนการติดเชื้อไวรัสเดงกีทุติยภูมินั้นค่า IgM:IgG จะน้อยกว่า 1.8:1 หรือ ค่า IgM น้อยกว่า 40 units ร่วมกับมีการเพิ่มขึ้นของ IgG อย่างน้อย 2 เท่า โดยที่ค่า IgG ในซีรั่มที่สองจะต้องมีค่าอย่างน้อย 100 units [17,24-26]

มีหลายการศึกษาที่ใช้วิธี ELISA ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้สิ่งส่งตรวจอื่น ที่ไม่ใช้เลือด ได้แก่ น้ำลาย[15-18] ปัสสาวะ ซึ่งได้ทั้งความไวและความจำเพาะสูง ส่วนการตรวจ IgM ในน้ำไขสันหลัง มีระดับต่ำกว่าระดับ IgM ในเลือดมาก ยังไม่สามารถนำมาเป็นวิธีที่ใช้ ในการวินิจฉัย ภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาทจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้

การแยกเชื้อไวรัสเดงกี (Viral isolation)

วิธีการแยกเชื้อไวรัสเป็นวิธีซึ่งเป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโดยทั่ว ๆ ไปรวมทั้งเชื้อไวรัสเดงกีด้วย แต่วิธีในการทำยุ่งยาก รวมทั้งใช้เวลานาน เป็นสัปดาห์ จึงไม่เป็นที่นิยม วิธีนี้จะตรวจได้ในช่วงที่มีไวรัสในกระแสเลือด (viremia) คือในช่วง 6 วันแรก หลังจากมีอาการ[33] เนื่องจากปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดจะสูงในช่วงแรกและจะลดลงเรื่อย ๆ สวนทางกันกับ antibody ซึ่งจะขึ้นสูงขึ้น

ไวรัส dengue สามารถเพาะเลี้ยงได้ครั้งแรกในปี 1940 โดยใช้ซีรั่มของผู้ป่วยใน suckling mouse brain และในปี 1960 สามรถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ใน mammalian cell เช่น Vero, LLC, MK2, BHK ซึ่งแต่ละ cell จะมี sensitivity ที่แตกต่างกัน และเซลล์เหล่านี้จะมีการแสดง cytopathic effect เมื่อถูกติดเชื้อโดยไวรัสเดงกี โดยสามารถสังเกตได้ จากการที่มี plaque เกิดขึ้นใน agar

ปัจจุบันการเลี้ยงเชื้อใน mammalian cell นิยมน้อยลงเนื่องจากมีการนำเ ซลล์ที่ได้มาจากยุงมาใช้แทน ซึ่งเป็นวิธีที่ไวมากกว่าการใช้เซลล์อื่น แต่การใช้เซลล์ที่ได้จากยุงจะเกิด cytopathic effect ได้ยากเนื่องจากจำนวนของไวรัส ในเซลล์จะสูงมาก ทำให้เซลล์ตายได้ง่าย ดังนั้นจึงจะต้องใช้วิธีพิเศษในการตรวจพิเศษ ได้แก่ FA test, PCR และนอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงในระบบนี้ จะใช้ได้เฉพาะในบางห้องปฏิบัติการที่มีการเตรียมเซลล์จากแมลงได้เป็นอย่างดี สำหรับ cell ของยุงที่นิยมใช้ได้แก่ AP-61 จากยุง *Ae. psuedoscutallaris* , C6/36 clone จาก *Ae. albopictus* และ TRA-284 จาก *Tx amboinensis* จากเซลล์ดังกล่าวเซลล์ที่มีความไวที่สุดได้แก่ TRA-284 แต่ C6/36 cell line นิยมใช้อย่างกว้างขวางมากกว่าชนิดอื่นๆ เนื่องจากดูแลรักษาได้ง่ายประกอบกับยังมีความไวที่ดี

การอ่านผลใช้การดูวิธีการทำปฏิกิริยาของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี cytopathic effect (CPE) กับ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละ serotype โดยใช้วิธีการย้อม Immunofluorescence (IF)

การตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Molecular detection)

วิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลสามารถตรวจได้ไวกว่าวิธีการแยกเชื้อไวรัส เนื่องจากมีกระบวนการเพิ่ม ปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัส ทำให้สามารถ ตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีปริมาณ

น้อย ๆ ได้ การตรวจทางซีวโมเลกุลนี้มีข้อดีกว่าการตรวจหา antibody จากซีรั่มหลายประการ สามารถแยก serotype ของเชื้อไวรัสได้ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ไม่มีผลบวกข้ามกับ Flaviviruses ชนิดอื่น ๆ สามารถวินิจฉัยโรคโดยไม่จำเป็นต้องเก็บสิ่งส่งตรวจสองครั้ง ส่วนความไวนั้น ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของโรคในขณะที่เก็บสิ่งส่งตรวจ และขึ้นกับชนิดของสิ่งส่งตรวจด้วย โดยความไวในการตรวจจะสูงมากในช่วงที่มีไข้ทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ในระยะแรกของ โรค ซึ่งในขณะนั้นการตรวจทางน้ำเหลืองอาจให้ผลลบได้ การตรวจวิธีนี้ถ้าเก็บสิ่งส่งตรวจในช่วงระยะก่อนไข้ลงเพียงเล็กน้อยหรือหลังไข้ลงไปแล้วอาจตรวจได้ผลลบจากซีรั่ม แต่ยังอาจจะสามารถตรวจพบได้ใน buffy coat หรือ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เนื่องจากเชื้อไวรัสเดงกีมีการเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดขาว

การทำ RT-PCR โดยหลักการคือการ amplify ชิ้นส่วนของ ribonucleic acid (RNA) โมเลกุล โดยการสร้าง DNA จากสาย RNA ด้วยกระบวนการ reverse transcription DNA ที่ได้ก็จะเรียกว่า complementary DNA หลังจากนั้น จะมีวิธีการในการเพิ่มจำนวนของ specific part of DNA หรือที่เรียกว่า amplification โดยวิธี polymerase chain reaction ซึ่งกระบวนการนี้จะใช้ enzyme DNA polymerase ทำให้เกิดปฏิกริยาที่อุณหภูมิต่างๆ

RT-PCR มีขั้นตอนในการทำดังนี้

First strand reaction: เป็นการสร้าง complimentary DNA จาก messenger RNA template ด้วย dNTPs และ an RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase) โดยการนำ template มาทำปฏิกริยา dNTPs, reverse transcriptase, primer และ reverse transcriptase buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

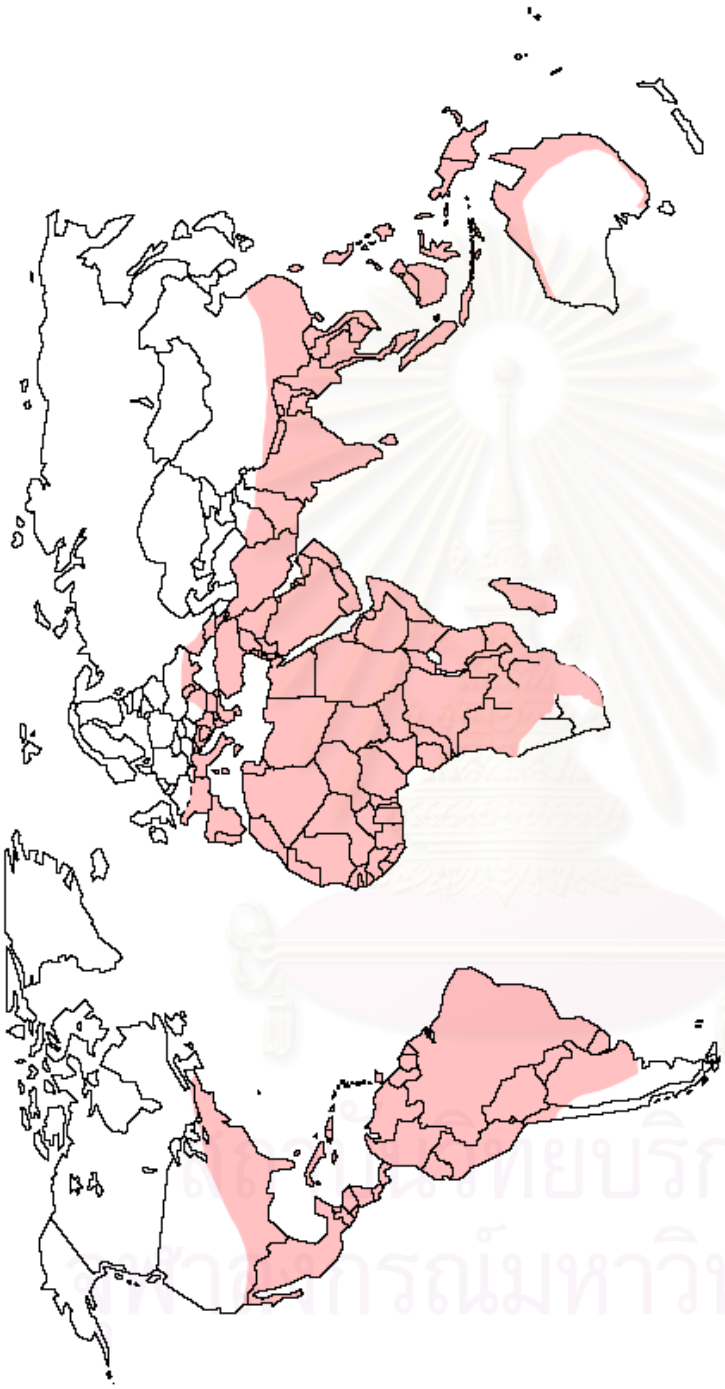
Second strand reaction: เป็นการเพิ่มจำนวนของ DNA โดยใส่ upstream และ downstream primer ทำปฏิกริยากับ DNA polymerase เพื่อที่จะสร้าง double-stranded DNA จากสาย complimentaryDNA เมื่อได้ double-stranded DNA หลังจากนั้น ทำการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ประมาณ 95 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะแยกสาย cDNA ให้เป็นสองสาย ต่อมาก็ทำให้อุณหภูมิลดลงเพื่อให้เกิดปฏิกริยาขั้นแรกใหม่ หลังจากที่มีการ run ปฏิกริยาหลายรอบก็จะได้จำนวนของสาย DNA เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่นถ้าทำ 30 cycle ก็จะได้ DNA หลายล้าน copies ขั้นตอนต่อไปคือการ purificatiuon โดย degrade สาย RNA ที่คงเหลืออยู่เพื่อให้ได้ product ที่มีแต่ DNA ขั้นตอนนี้จะทำโดยการใส่ enzyme RNase H

การทำ RT-PCR จะเป็นวิธีที่ช่วยให้ตรวจหา DNA ที่ sensitive สามารถตรวจหา ได้แม้จะมีปริมาณเล็กน้อยก็ตาม นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงเทคนิคการทำ PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และ specificity เช่นการใช้เทคนิค two-step nested PCR, multiplex PCR, NASBA assay

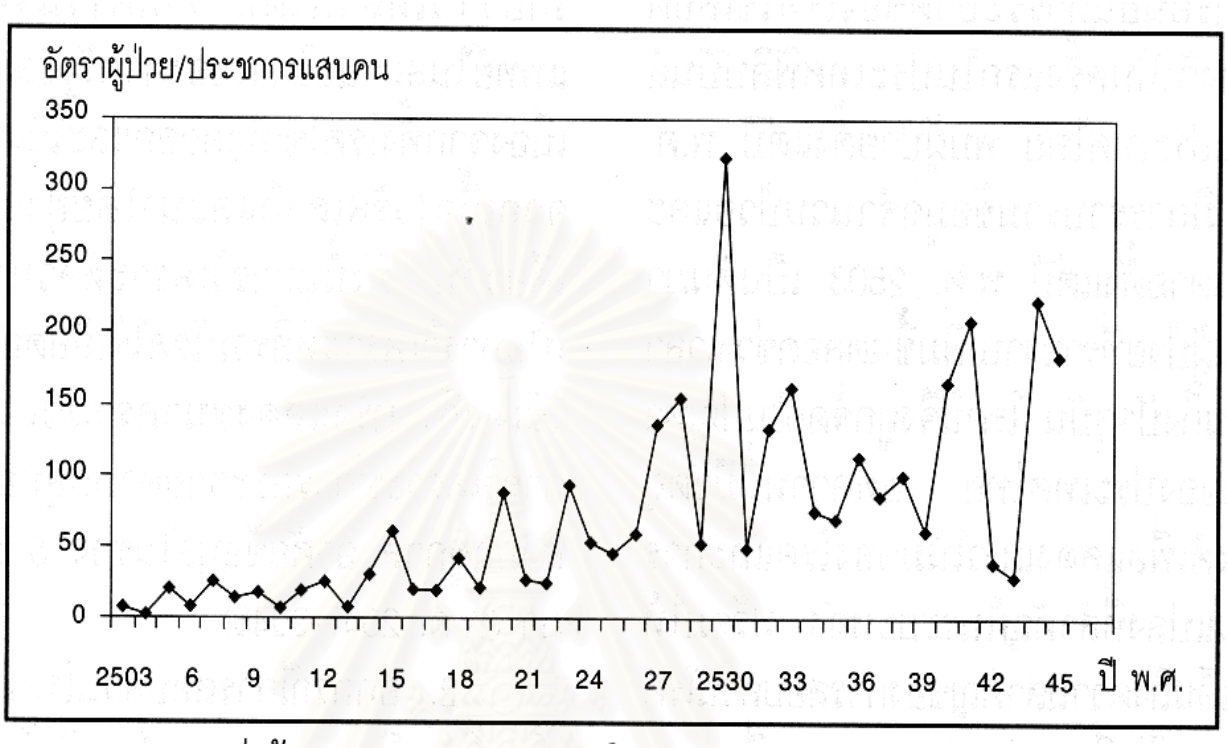
การตรวจทางชีวโมเลกุลสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีมีหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. **Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR)** เป็นการตรวจหา DNA ที่ถูกทำให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น (amplification) เป็น DNA ที่เปลี่ยนมาจาก RNA ของเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ปัจจุบันมีชนิดย่อย ๆ อีกหลายวิธี เช่น nested RT-PCR, real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR เป็นการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูงสำหรับเลือดเมื่อเทียบกับการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mosquito C6/36 โดยมีความไวอยู่ในช่วง 84-100% และความจำเพาะอยู่ในช่วง 86-100%[32-39] จะเห็นว่าแต่ละการศึกษาความไวและความจำเพาะต่างกัน เนื่องจากมีการใช้ primer ต่างกัน สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาต่าง ๆ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ ต่าง ๆ แตกต่างกัน ทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีการทดสอบ RT-PCR ที่เป็นมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี สิ่งส่งตรวจอื่นที่ไม่ใช่ซีรั่มเช่น เลือด, buffy coat และปัสสาวะ [40-43] ก็สามารถนำมาเป็นสิ่งส่งตรวจเพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR ได้ มีการศึกษาที่เทียบสิ่งส่งตรวจระหว่างเลือดซีรั่มและ buffy coat พบว่าซีรั่มเป็นสิ่งส่งตรวจที่ดีที่สุด[44]
2. **Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)** เป็นวิธีที่ตรวจหา RNA ที่ถูกทำให้เพิ่มปริมาณขึ้น โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนอุณหภูมิขึ้นลงเหมือนกับวิธี RT-PCR และมีการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการน้อยเนื่องจากเป็นการตรวจหา RNA ซึ่งเป็นข้อดีของวิธีนี้ที่เหนือกว่าวิธี RT-PCR แต่ RNA มีความคงตัว (stability) น้อยกว่า DNA การอ่านผลใช้วิธี electrochemiluminescence (ECL) การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี NASBA โดยใช้เลือดเป็นสิ่งส่งตรวจมื่อเทียบกับการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mosquito C6/36 โดยมีความไว 98.5% และความจำเพาะสูงถึง 100% [45]แต่การศึกษาเกี่ยวกับวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี NASBA ยังไม่ได้รับความนิยมและยังไม่เป็นที่แพร่หลายเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี RT-PCR

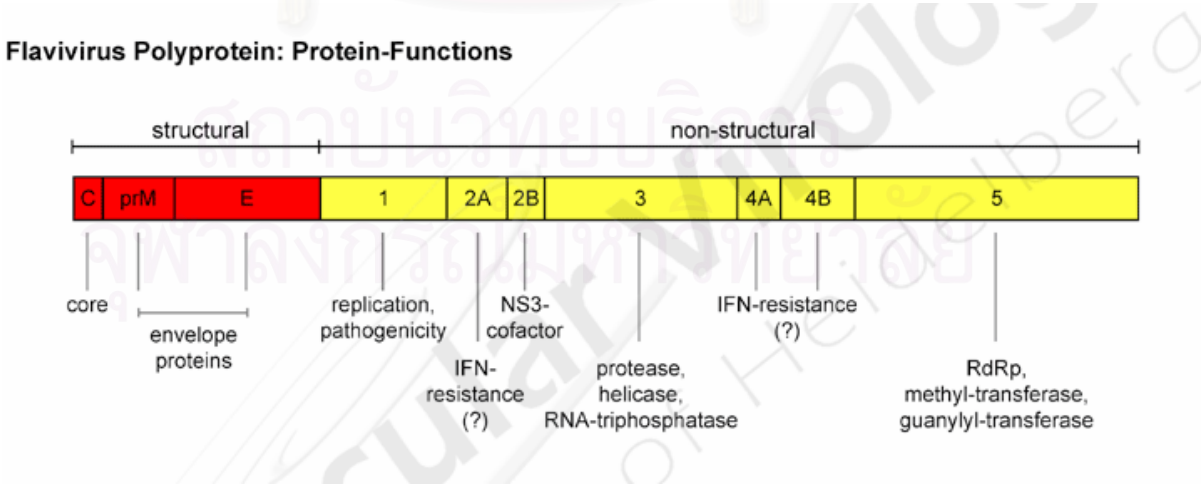
รูปที่ 2.1: ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศต่าง ๆ



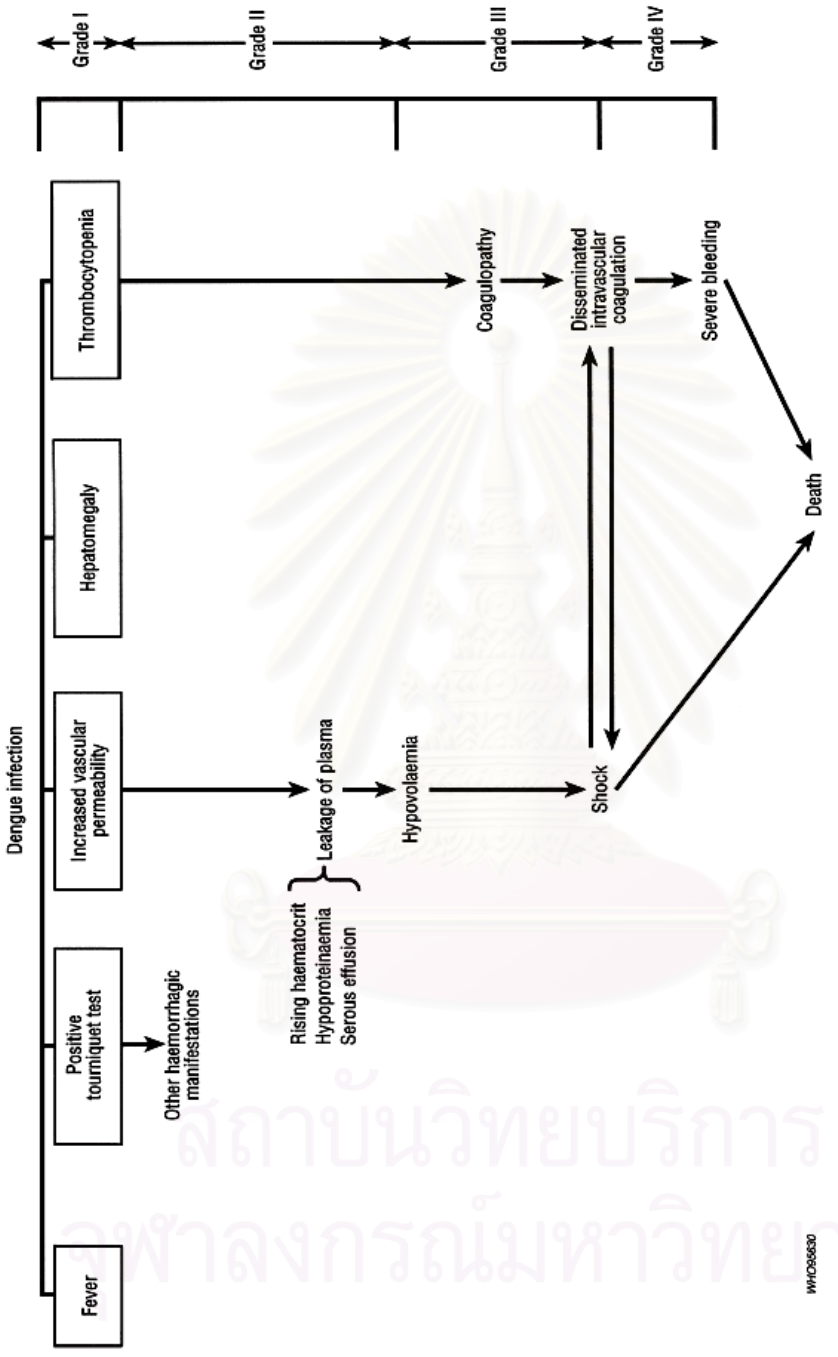
รูปที่ 2.2: อัตราการป่วยจากโรคไข้เลือดออกปี 2503-2545



รูปที่2.3: แสดง โปรตีนของไวรัสเดงกี

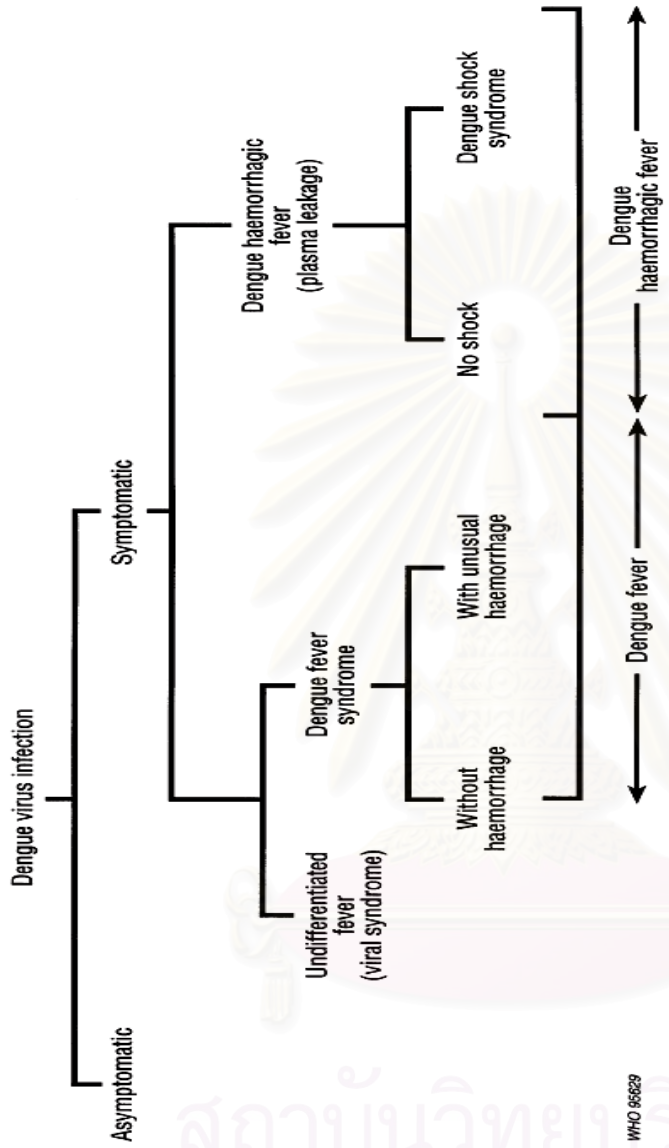


รูปภาพที2.4: ระดับความรุนแรงของไข้เลือดออกเดงกี



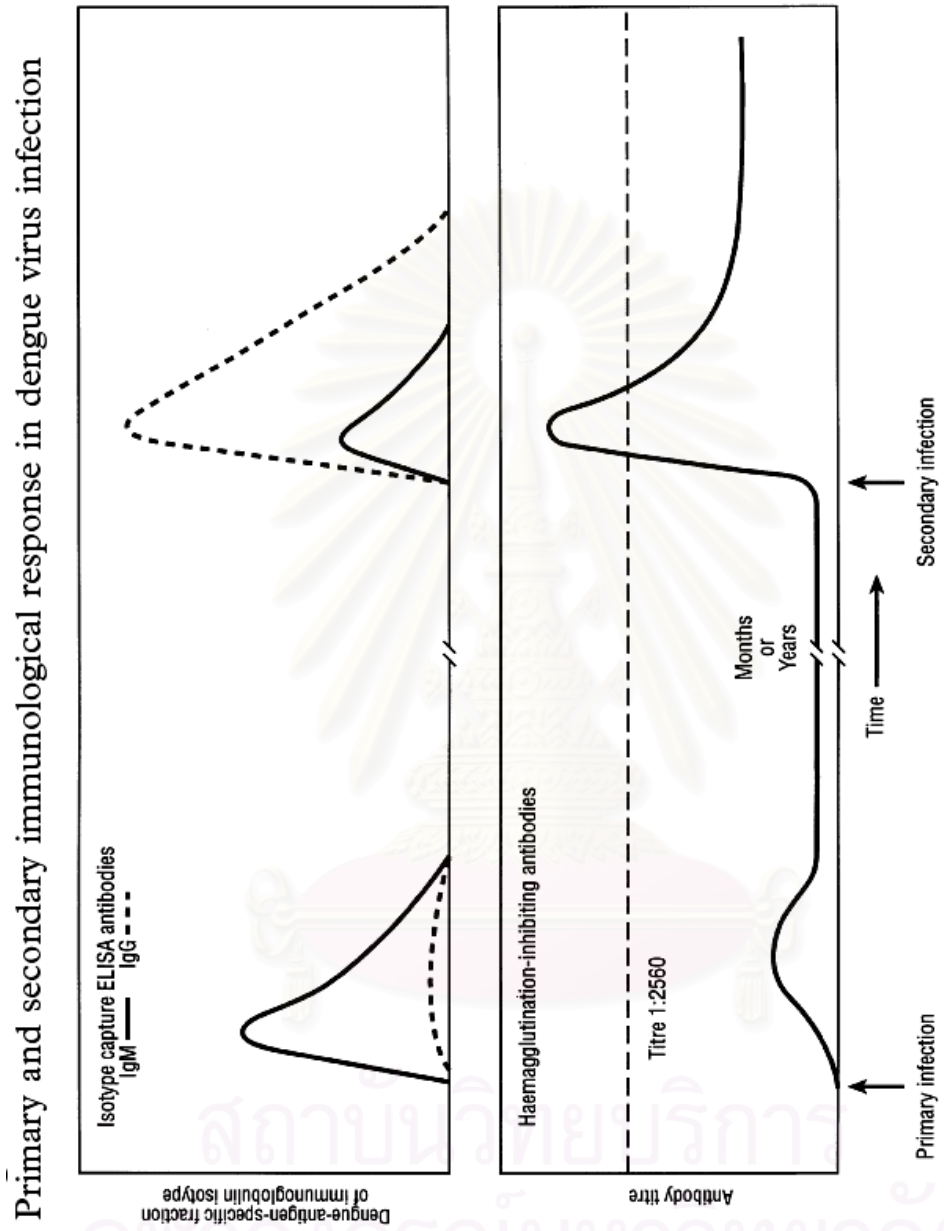
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปภาพที่2.5 : รูปแบบของอาการ/อาการแสดงของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปภาพที่2.6: **ตอบสนองของภูมิคุ้มกันใน** primary **และ** secondary dengue infection



ตารางที่ 2.1 การกระจายของเชื้อไวรัสเดงกีในภูมิภาคต่าง ๆแยกตาม serotype

Geographic distribution of dengue virus serotypes and genotypes identified by comparative sequence analysis of RT/PCR fragments	
Dengue-1	I. Thailand/Indonesia/Malaysia/Pacific islands (1970s) II. Thailand/ The Americans-Carribean/Africa/Pacific Island (1980s) III. Thailand/The Phillipines
Dengue-2	I. Thailand/Burma/Malaysia/Vietnam/New Guinea/The America-Caribean (1980-90s) II. Sri Lanka/ The Seychelles III. Africa IV. Africa (endemic)
Dengue-3	I. Malaysia/Indonesia/Pacific islands II. Thailand/Malaysia/Indonesia/Burma/Vietnam/The Philippines III. Carribean/ Pacific islands (1970) IV. Thailand (1971)
Dengue-4	I. The Philippines/Malaysia/Burma/Indonesia/Sri lunka/Africa/The American-Carribean/Pacific islands

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่2.2 แสดงการพบไวรัสเดงกีในอวัยวะต่าง ๆของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก

Reference	Method	Tissue	
		No virus detected (positive/no. tested)	Virus not detected (no. tested)
Nisalak et al, 1970	Virus isolation (tissue culture, newborn mice)	Blood (5/103),lymph node (1/22), bone marrow (1/21), liver (1/9)	Liver (92), spleen(65), kidney(59), skin
Guzman et al, 1984	Virus isolation (tissue culture, newborn mice)	Liver (1/9)	Blood(4), spleen(6), brain(5), kidney(4)
Rosen et al, 1989	Virus isolation (mosquitoes)	Liver(4/16), spleen(1/16), midbrain, (1 /16), heart blood(1/15)	Lymph node (16) Cerebrum (16) Cerebellum (16) Kidney (5)
Sumarto et al, 1983	Virus isolation (mosquitoes)	Liver (1/17)	Brain, CSF
Bhamarapravati and Boonyapaknavil, 1966	Antigen detection	Spleen (1/21), thymus (1/21)	Liver (21), lymph node(21), skin(21), kidney(21)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3: **การแปลผล** Hemagglutination-inhibition test **ของเชื้อไวรัสเดงกี**

Antibody response	S1–S2 interval[b]	Convalescent titre[c]	Interpretation
≥4-fold rise	≥7 days	≤1:1280	Acute flavivirus infection, primary
≥4-fold rise	Any specimen	≥1:2560	Acute flavivirus infection, secondary
≥4-fold rise	<7 days	≤1:1280	Acute flavivirus infection, either primary or secondary
No change	Any specimen	>1:2560	Recent flavivirus infection, secondary
No change	≥7 days	≤1:1280	Not dengue
No change	<7 days	≤1:1280	Uninterpretable
Unknown	Single specimen	≤1:1280	Uninterpretable

[a] These criteria were derived empirically from data collected at the U.S. Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand. Laboratories should assess the sensitivity of their assay with standard sera from WHO Collaborating Centres for Arboviruses and/or Haemorrhagic Fever Reference and Research or WHO Collaborating Centres for New, Emerging and Re-emerging Diseases (see Annex 6). Laboratories should also establish baseline data for the population they serve during a period of little or no flavivirus transmission.

[b] Interval in days between acute (S1) and convalescent (S2) specimens.

[c] Against any dengue antigen.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

รายระเอียดกระบวนการทำ RT-PCR และการตรวจทาง serology โดยวิธี HAT และ ELISA

3.1 หลักการทั่วไปของกระบวนการ *RT-PCR*

วิธี PCR เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมประเภท DNA (deoxyribonucleic acid) ภายหลังจากทำการเพิ่ม (amplification) จำนวนสารพันธุกรรมแล้ว จึงเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมปริมาณน้อย ๆ ได้ เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสูง และมีการนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย, ไวรัส, เชื้อรา, และปรสิตทั้งประเภทโปรโตซัว และหนอนพยาธิ สำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น ต้องใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เพื่อเปลี่ยน RNA (ribonucleic acid) เป็น DNA ก่อน เนื่องจากเชื้อไวรัสเดงกีเป็นเชื้อไวรัสประเภท RNA จึงเรียกวิธีการนี้ว่า reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

สำหรับวิธี RT-PCR ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นวิธี nested RT-PCR คือมีการทำ PCR 2 ครั้ง แต่ละครั้งของ PCR ใช้ primer ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ภายหลังจากได้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ครั้งแรกแล้ว มีการทำ PCR ครั้งที่สองโดยการใช้ primer อีกคู่หนึ่งที่แตกต่างจาก primer คู่แรก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ครั้งที่สองมีขนาดเล็กกว่ารอบแรก วิธีการ nested RT-PCR นี้จะเพิ่มความจำเพาะของการตรวจ PCR มากขึ้น

3.2 ขั้นตอนการทำ *RT-PCR* สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี

ในบทความนี้จะกล่าวถึงขั้นตอนของการทำ RT-PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีโดยคร่าว เฉพาะที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่านั้น ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. **การเตรียมและการเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ**

สิ่งส่งตรวจที่ได้คือ น้ำลายและเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย buffer) จะถูกนำมาปั่น (centrifuge) แล้วเก็บตะกอนที่ได้จากการปั่น (pellet) ไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ยังไม่ได้นำมาสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจดังกล่าวได้เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี

2. **การสกัดสารพันธุกรรม RNA ของไวรัส**

สิ่งส่งตรวจที่ถูกเก็บไว้จะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี โดยใช้น้ำยาและชุดอุปกรณ์ของบริษัท QIAGEN ชื่อการค้า “QIAmp® Viral RNA Mini Kit” ซึ่งจะได้สาร พันธุกรรม

ประเภท RNA ซึ่งจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในกรณีที่ยังไม่นำไปตรวจด้วยวิธี RT-PCR

3. **การเตรียม cDNA (complimentary DNA)**

เป็นกระบวนการที่ทำให้ RNA ที่สกัดได้เปลี่ยนเป็น DNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เรียกกระบวนการนี้ว่า “reverse transcription” ขั้นตอนนี้ใช้น้ำยาและชุดอุปกรณ์ของบริษัท Promega ชื่อการค้า “ImProm-II RT”

4. **การทำ PCR ครั้งที่ 1**

นำ cDNA ที่ได้ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตรไปผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ครั้งที่ 1 คือ primary DNA amplification 40 รอบ (denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extending 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที) โดยใช้ primer ชื่อ Den outer1 และ Den outer2 ตัวละ 0.75 ไมโครลิตร

ลำดับเบสของ DNA primer Den outer1 คือ 5’-CCATggAAgCTgTACgC-3’ และของ Dengue outer2 คือ 5’-gARACAgCAggATCTCTggTCT-3’

5. **การทำ PCR ครั้งที่ 2**

นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรกมาขยายปริมาณโดยการทำ PCR ครั้งที่ 2 คือ secondary DNA amplification 25 รอบ (denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extending 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที) โดยใช้ primer ชื่อ Den inner1 และ Den inner2 ตัวละ 0.75 ไมโครลิตร

ลำดับเบสของ DNA primer Den inner1 คือ 5’-ggTTAgAggAgACCCCTCCC-3’ และของ Dengue inner2 คือ 5’-gggggTCTCCTMTAACCTCTAKTCCTT-3’

6. **การอ่านผลการตรวจ**

นำ DNA ที่ผ่านการขยายโดยกระบวนการ RT-PCR แล้วไปตรวจสอบ โดยใช้ DNA ที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตรไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน agarose gel ที่ผสมกับ TBE buffer และ marker แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ก่อนนำไปตรวจดูและถ่ายรูปแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

4.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

4.2.1 **ประชากร**(Population)

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ประชากรผู้ใหญ่ทั่วไปที่เคยติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกมาก่อน

ประชากรตัวอย่าง (Sample Population)

ผู้ป่วยโรคเลือดที่เป็นผู้ใหญ่ ที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในการเช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา และมีข้อบ่งชี้ในการเจาะไขกระดูกเพื่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษา

4.2.2 **กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา** (Inclusion criteria)

ผู้ป่วยที่จะเข้าสู่การวิจัยต้องมีคุณสมบัติครบทุกข้อดังต่อไปนี้

มีอายุมากกว่า 15 ปี

- ผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจเจาะไขกระดูกเพื่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษา

4.2.3 **กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการวิจัย** (Exclusion Criteria)

ผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติอย่างน้อย 1 ข้อดังต่อไปนี้จะถูกตัดออกจากการวิจัย

ผู้ป่วยที่มีอาการของไข้เฉียบพลันในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนที่มีการเจาะไขกระดูก

ตัวอย่างที่ได้จากการทำ bone marrow aspiration มีปริมาณน้อยกว่า 5 ml. ซึ่งไม่สามารถตรวจหาไวรัสทางชีวโมเลกุลได้

4.2.4 **การคำนวณขนาดตัวอย่าง** (Sample Size Determination)

จำนวนตัวอย่างคือผู้ป่วยทั้งหมดที่มารับการเจาะไขกระดูกในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา ซึ่งรวมผู้ป่วยที่เป็นโรคเลือดและผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอดส์ จำนวน 50 ราย

4.2.5 **วิธีการเก็บตัวอย่าง** (Sample Techniques)

ผู้ป่วยทุกรายที่มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ (Consecutive cases)

4.3 **วิธีและขั้นตอนการทำวิจัย** (Study Methods)

- ถามประวัติและตรวจร่างกาย บันทึกรวบรวมข้อมูลต่างๆตามแบบบันทึกข้อมูล

  เก็บตัวอย่างไขกระดูกจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการเจาะตรวจไขกระดูกที่หน่วยโลหิตวิทยาโลหิตวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์โดยใช้ syringe ดูดทำ bone marrow aspiration ปริมาณ 5 ml. และเก็บเลือด EDTA blood 5 ml. โดยที่ผู้ป่วยได้รับการอธิบายวิธีการศึกษาและลงนามใบยินยอม

  การเก็บตัวอย่างเป็น consecutive case

  สิ่งส่งตรวจทุกชนิดจะถูกนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชม. ในกรณีที่ไม่สามารถส่งถึงห้องปฏิบัติการได้ภายในระยะเวลาดังกล่าวก็จะเก็บสิ่งส่งตรวจ ไว้ในตู้เย็น

  ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีจากไขกระดูกโดยวิธี RT-nested PCR โดยไขกระดูกจะถูกนำมาสกัดสารพันธุกรรมตาม protocol

  การตรวจหา dengue antibody จะทำในวันเดียวกับการทำ RT-nested PCR ในไขกระดูก หรือเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสกรณีที่ไม่ได้ทำการตรวจในวันนั้น

- บันทึกผลการตรวจพบลงในแบบบันทึกการทำศึกษาวิจัย

  เก็บเลือด EDTA blood เพื่อนำมาตรวจ serology โดยวิธี HAI และ ELISA

  ตัวอย่างที่เหลือจากการศึกษาจะถูกเก็บไว้เป็นเวลา 5 ปีเพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต หรือตรวจซ้ำในกรณีที่กรณีผลการตรวจมีความขัดแย้ง

4.4 **การสังเกตและการวัด** (Observation and Measurement)

การวัดผล (Outcome) คือ การตรวจพบ dengue virus โดยวิธี RT-PCR และการวินิจฉัยการติดเชื้อเดงกีไวรัสของประชาการที่ศึกษาโดยวิธี การหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA และ HAI

4.5 **การเก็บรวบรวมข้อมูล** (Data Collection)

ข้อมูลทั้งหมด ประวัติ ผลการตรวจร่างกาย ผลทางห้องปฏิบัติการต่างๆ จะได้รับการลงบันทึกในแบบเก็บข้อมูลของผู้ป่วย โดยผู้ทำการวิจัยเป็นผู้รวบรวม

4.6 **การวิเคราะห์ข้อมูล** (Data Analysis)

เนื่องจากการศึกษาเป็น descriptive study จึงใช้การหาอัตราการตรวจพบและการพรรณนาผลของการวิจัยในการวิเคราะห์ข้อมูล

4.7 **ปัญหาทางจริยธรรม** (Ethical Considerations)

การลดปัญหาด้านจริยธรรมผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการทุกคนได้รับข้อมูลโดยละเอียดถึง วิธีการตรวจ และได้ส่งรายละเอียดให้คณะกรรมการพิจารณา เพื่อขอความเห็นและต้องได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent) จากผู้ป่วยก่อน

4.8 **ข้อจำกัดในการวิจัย** (Limitation)

การแช่สิ่งส่งตรวจไว้ในตู้เย็น ในกรณีที่ไม่สามารถส่งสิ่งส่งตรวจถึงห้องปฏิบัติการภายใน 4-6 ชั่วโมง เช่น วันหยุดราชการนั้น อาจทำให้ผลการทำ RT-PCR เป็นผลลบปลอม (false negative) มากขึ้น จากการสลายตัวของ RNA ของเชื้อไวรัสเดงกี เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสิ่งส่งตรวจขึ้นลงหลายครั้งก่อนที่สิ่งส่งตรวจจะไปถึง
ยังห้องปฏิบัติการ เพื่อสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (viral RNA extraction) เนื่องจากเป็นการศึกษาการตรวจหาไวรัสในไขกระดูกในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของไข้เดงกี ซึ่งจะมีไวรัสในร่างกายน้อย จึงอาจทำให้อัตราการตรวจพบไวรัสได้น้อยลง

4.9 **อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข**

อุปสรรค

- เนื่องจากการตรวจหาไวรัสโดยเทคนิคการทำ RT-nested PCR เป็นการตรวจที่ต้องใช้ประสบการณ์และทักษะในการทำ ดังนั้นผู้ทำการวิจัยต้องฝึกปฏิบัติทำการตรวจในสิ่งส่งตรวจอื่นๆนอกเหนือไปจากไขกระดูก เช่นใน buffy coat, serum
- ผู้ป่วยไม่มาตรวจติดตามภายหลังจากจำหน่ายออกจากโรงพยาบาลแล้ว ทำให้ไม่มี paired serum ในการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี ELISA ทำให้ไม่ทราบการวินิจฉัยที่แน่นอน เพื่อที่จะยืนยันว่าในช่วงที่ผู้ป่วยมารับการเจาะไขกระดูกไม่ได้มีการติดเชื้อเดงกีนำมาก่อนในช่วงระยะเวลาไม่นาน

มาตรการในการแก้ไข

โทรศัพท์เตือนผู้ป่วยหรือญาติของผู้ป่วยก่อนถึงวันนัด 1 วัน

4.10 การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time Schedule)

การดำเนินงาน	2547			2548												2549			
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
1. ศึกษาและเตรียมงาน	*	*	*																
2. รวบรวมข้อมูล และ ทดสอบทางห้องปฏิบัติการ		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
3. วิเคราะห์ข้อมูล														*	*	*	*		
4. สรุปและเขียนรายงาน																*	*	*	
5. รายงานผล																			*

4.11 งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)

- งบประมาณ (Budget) หมวดค่าใช้สอย
- ค่าอุปกรณ์และเครื่องใช้สำนักงาน, ค่าเจ้าหน้าที่พิมพ์เอกสาร 2000 บาท
- หมวดหัตถการ – ค่าตรวจ RT-nested PCR ครั้งละ 600 บาท จำนวน 50 ครั้ง เป็นเงิน 30000 บาท
- ค่าตรวจเลือด ELISA 200 บาทต่อครั้ง รายละ 2 ครั้ง 50 ราย เป็นเงิน 20000 บาท
- หลอดแก้ว EDTA หลอดละ 4 บาทจำนวน 100 หลอด เป็นเงิน 400 บาท
- ค่าเข็มเจาะเลือดเบอร์ 22 จำนวน 100 อันเป็นเงิน 100 บาท
- ค่าจ้างเจ้าหน้าที่ 5000 บาทต่อเดือน จำนวน 12 เดือน เป็นเงิน 60000 บาท
- รวมเป็นเงิน 135000 บาท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการวิจัย

ข้อมูลของผู้ป่วยที่เข้าการศึกษา

ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วย

การศึกษาครั้งนี้มีผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษา 74 ราย เป็นผู้ป่วยที่มารับการเจาะตรวจไขกระดูกที่คลินิกโรคเลือด 69 รายและผู้ป่วยใน 5 ราย โดยผู้ป่วยที่มารับการเจาะตรวจไขกระดูกที่ตึกผู้ป่วยนอกมารับการเจาะตรวจเพื่อติดตามการ รักษาภาวะโรคเลือดที่เป็นอยู่ แบ่งตามประภทของโรคตามตารางที่ 5.1

ผู้ป่วยในการศึกษาที่มารับการเจาะไขกระดูกทุกรายได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจทาง serology ในวันที่มาตรวจครั้งแรกและภายใน 4-6 สัปดาห์หลังจากที่มีการเจาะตรวจครั้งแรก โดยมีผู้ป่วยมาตรวจเลือดครั้งที่สองทั้งหมด 26 ราย ดังนั้นจึงมีผลการตรวจทาง serology เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ titer 26 ราย ดังแสดงในตารางที่ 5.3

ลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธี RT-PCR

จำนวนของผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธี RT-PCR ในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาจำนวน 3 ราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

ผู้ป่วยรายที่หนึ่ง

ผู้ป่วยชายอายุ 56 ปี ภูมิลำเนาอยู่ที่ กรุงเทพมหานคร ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น chronic myelogenous leukemia (CML) เมื่อปี 2539 มาตรวจด้วยอาการ ไข้, อ่อนเพลียและตับม้ามโต แพทย์ตรวจพบว่ามีเม็ดเลือดขาวในเลือดสูง ลักษณะของเม็ดเลือดขาวมีความผิดปรกติ โดยพบเซลล์ myeloblast สูง ผู้ป่วยได้รับการเจาะไขกระดูกเพื่อตรวจทางพยาธิวิทยา ผลของไขกระดูก มีลักษณะเข้าได้กับ ผู้ป่วยมีประวัติการรักษาวัณโรคเมื่อต้นปี 2539 โดยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น TB pleura ขณะนั้นมีอาการน้ำในเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) โดยผล pleural biopsy พบมี granulomas ผู้ป่วยได้รับยาวัณโรคนาน 18 เดือน ต่อมามีอาการปรกติ

การรักษา

แพทย์ได้ให้การรักษาโดยใช้ยาที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้แก่ hydroxyurea โดยปรับขนาดยาตามการตอบสนองของการลดลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผิดปรกติ ร่วมกับยา

allopurinal เพื่อลดกรด uric ในเลือดที่สูงเนื่องจากมีการสร้างและทำลาย เซลล์มากขึ้นจาก ภาวะมะเร็ง

การรักษาด้วยยา hydroxyurea ได้ผลอยู่ในช่วงแรกของการรักษา แต่ต่อมามี จำนวนของเม็ดเลือดขาวสูงขึ้น ซึ่งบ่งถึงการที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อ hydroxyurea ที่ผู้ป่วยกำลังได้รับอยู่ แพทย์จึงได้ปรับสูตรการรักษาโดย เพิ่มยา 6-MP (mercaptopurine) ซึ่งเป็นยา purine antagonist ยั้บยังการสร้าง DNA และ RNA ผู้ป่วยได้รับยา 6-MP นาน และต่อมามี leukocytosis เพิ่มขึ้น จึงได้ปรับเปลี่ยนการรักษาอีกครั้งโดยใช้ยา Imatimib ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม thyrosine kinase inhibitor ที่มีความจำเพาะต่อ tumor ที่สร้างจากยีน Bcr-Abl

ผู้ป่วยได้รับการเจาะไขกระดูกเพื่อติดตามการรักษา โดยไขกระดูกได้นำมาตรวจเพื่อติดตามประเมินติดตามการรักษา และส่วนของไขกระดูกได้ นำมาตรวจหา dengue genome โดยวิธี RT-PCR ได้มีการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย 2 ครั้ง ห่างกันประมาณ 5 สัปดาห์ จากการตรวจ CBC ใน peripheral blood smear ไม่พบมี myeloblast cell

ผลการตรวจเซลล์ที่ได้จากการเจาะไขกระดูกของผู้ป่วยรายนี้ไม่พบมีลักษณะเซลล์ที่ผิดปรกติ

ผลทางพยาธิสภาพของไขกระดูก normocellular trilineage marrow with no histological evidence of ผลของการตรวจ HI และ ELISA ของผู้ป่วยรายนี้แสดงดังตาราง 5.3

จากการซักประวัติผู้ป่วยเรื่องการเจ็บป่วยภายในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนที่จะมีการเจาะไขกระดูก ผู้ป่วยให้ประวัติว่าปรกติไม่มีไข้มาก่อน และ ปฏิเสธการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีภายในอดีต

ผู้ป่วยรายที่สอง

ผู้ป่วยหญิงอายุ 38 ปี อาชีพพยาบาล ภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัด พิษณุโลก ผู้ป่วยมาตรวจที่โรงพยาบาล ครั้งแรกเมื่อเดือน มีนาคม 2548 ด้วยอาการ ไข้, หน้า,คอและแขนขวา มีอาการบวม มาประมาณ สัปดาห์ก่อนมาโรงพยาบาล ตรวจพบจากโรงพยาบาลที่ส่งตัวมาพบมี ต่อมน้ำเหลืองในช่องอกโต ทำให้เกิด superior vena cava obstruction ผล complete blood count(CBC) มีจำนวนของ lymphoblast สูงมากกว่า 6 % การตรวจเพิ่มเติมที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ flow cytometry วินิจฉัยว่าเป็น precursor B-lymphoblastic leukemia(CLL) ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยให้ยาเคมีบำบัดแบบที่ใช้ในผู้ป่วยที่เป็นโรค acute lymphoblastic leukemia (ALL) ประกอบด้วย viscristine, doxorubicin และ L-asperaginase หลังรับยาเคมีบำบัดครั้งแรกผู้ป่วยเกิด neutropenia และมี invasive pulmonary aspergillosis หลังจากได้รับเคมีบำบัติครั้งแรกผลการ

ตรวจไขกระดูกไม่พบ เซลล์มะเร็งหลงเหลืออยู่ และจากนั้นก็เริ่มให้ยาครั้งที่สองเมื่อเดือนกันยายน 2548 ซึ่งหลังจากให้ยาครั้งนี้ครบ ผลการตรวจ CBC มี เม็ดเลือดขาวสูงผิดปรกติและมีจำนวนของ lymphoblast cell สูงขึ้นอีก แพทย์ผู้ทำการรักษาจึงได้ปรึกษากับผู้ป่วยเพื่อที่จะทำการรักษาโดยการทำ peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) หลังจากที่ผู้ป่วยได้ ยาเคมีบำบัดครั้งที่สามจึงได้รับการทำ PBSCT เมื่อปลายเดือน กันยายน 2548

หลังจากที่ทำการปลูกถ่ายไขกระดูก ผู้ป่วยยังคงได้รับยา metrothexate และ cyclosporine A เพื่อป้องกันภาวะ graft-versus-host disease (GVHD) ผู้ป่วยได้รับการเจาะไขกระดูกเพื่อประเมินติดตามการรักษาเมื่อเดือน พฤศจิกายน 2549 ผลการเซลล์ในไขกระดูก ไม่พบเซลล์ที่ผิดปรกติและผลการตรวจทางพยาธิวิทยาปรกติ

การตรวจเลือดเพื่อหา HI และ ELISA ของผู้ป่วยรายนี้ได้แสดงในตาราง 5.3 ผู้ป่วยปฏิเสธประวัติ การมีไข้ในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนที่จะมีการตรวจไขกระดูก และผู้ป่วยรายนี้เคยได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์เมื่อตอนอายุประมาณ 16 ปี ว่าเป็นไข้เลือดออก

ผู้ป่วยรายที่สาม

ผู้ป่วยหญิงอายุ 54 ปี ภูมิลำเนาอยู่ที่กรุงเทพมหานคร มารับการักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2546 ด้วยอาการอาเจียนเป็นเลือดจากแผลในลำไส้เล็กส่วนต้น พบในขณะนั้นว่าผู้ป่วยมีปัญหาเม็ดเลือดขาวในเลือดสูง ตรวจไขกระดูก พบว่ามี hypercellularity of bone marrow with myeloid cell proliferation ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น chronic myeloid leukemia ผู้ป่วยมารับการเจาะไขกระดูกเพื่อติดตามการรักษา ในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาผลการตรวจไขกระดูก การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา คือ normocellular trilineage marrow with no histological evidence of leukemia ในช่วงเวลา 4 สัปดาห์ก่อนมาเจาะไขกระดูก ผู้ป่วยไม่มีอาการผิดปรกติ

ผู้ป่วยสามรายที่ตรวจพบจากการทำ PILOT study ในช่วงก่อนหน้านี้มีดังนี้

ผู้ป่วยรายที่สี่

ผู้ป่วยหญิงอายุ 44 ปี ภูมิลำเนาอยู่ที่กรุงเทพมหานคร ผู้ป่วยมาตรวจครั้งแรกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เมื่อเดือน กุมพาพันธ์ ปี พ.ศ. 2547 ด้วยอาการต่อมน้ำเหลืองโตทั่วไป (generalized lymphadenopathy) ผลการตรวจพยาธิวิทยาจากต่อมน้ำเหลืองเข้าได้กับ diffuse large B cell lymphoma ระยะของโรคตอนที่ได้รับการวินิจฉัยคือ stage IIIa

ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยยาเคมีบำบัดเพื่อรักษา lymphoma ดังนี้ M-CHOP จำนวน 7 ครั้ง ครั้งสุดท้ายคือเมื่อเดือนพฤศจิกายน 2549 โดยผลการตรวจ เอกซเรย์ตอมพิวเตอร์ในช่องท้องไม่พบว่ามี ต่อมน้ำเหลืองโตผิดปรกติ

ผู้ป่วยรายที่ห้า

ผู้ป่วยชายอายุ 79 ปี ภูมิลำเนาภูมิลำเนาอยู่ที่กรุงเทพมหานคร ผู้ป่วยมาตรวจครั้งแรกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เมือเมษายน พ.ศ. 2545 ด้วยอาการซีด หลังจากนั้นได้รับการตรวจเพิ่มเติมเพื่อหาสาเหตุของภาวะซีด ผลการตรวจเลือดมี globulin ในเลือดสูงและ มี monoclonal gammopathy ตรวจไขกระดูกพบว่ามี plasma cell ในไขกระดูกสูงขึ้น ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น multiple myeloma

ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยยาเคมีบำบัดที่ประกอบด้วย MP regimen

ผู้ป่วยไม่มีอาการผิดปรกติก่อนได้รับได้รับการเจาะไขกระดูก

ผู้ป่วยรายที่หก

ผู้ป่วยชายอายุ 45 ปี ภูมิลำเนาอยู่ที่ชลบุรี ผู้ป่วยมาตรวจครั้งแรกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เมื่อ เดือนพฤศจิกายน 2545 ด้วยอาการซีด อ่อนเพลีย ได้รับการตรวจวินิจฉัยจากการเจาะไขกระดูกและการย้อมพิเศษทาง immunohistochemistry ว่าเป็น multiple myeloma ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดประกอบด้วย DCEP จำนวน 6 ครั้ง ต่อมาได้รับการรักษาโดยวิธีการปลูกถ่ายไขกระดูก autologous peripheral blood stem cell transplantation เมื่อเดือน เมษายน 2548

ผู้ป่วยไม่มีอาการผิดปรกติก่อนได้รับได้รับการเจาะไขกระดูก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 ลักษณะของผู้ป่วยที่เข้าในการศึกษา

อายุอยู่ในช่วง 38-79 ปี (เฉลี่ย 56 ปี)
เพศ: ชาย 44 คน หญิง 28 คน
ระยะวลาของการป่วยเป็นโรคเลือด 4-8 ปี

Underlying diseases	Number of patients
Hematologic malignancy	
• Leukemia (Acute and Chronic)	41
• Non-Hodgkin lymphoma	25
• Multiple myeloma	6
Non-hematologic malignancy	
• HIV infection with disseminated cryptococcosis	1
• HIV infection with prolonged fever	1
Total	74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 ลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูก

ตารางแสดงลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธี RT-PCR แสดงผลการตรวจ HAI และELISA ของผู้ป่วยแต่ละราย

ผู้ป่วยรายที่ และการวินิจฉัยโรค	อายุ (ปี)	เพศ	HAI		ELISA			
					IgM		IgG	
			ครั้งแรก	ครั้งที่สอง	1st IgM	2nd IgM	1st IgG	2nd IgG
1. Chronic myelogenous leukemia (CML)	56	M	1:40	1:80	0	1	4	6
2. B cell lymphoma	38	F	1:40	1:40	0	0	2	2
3. Chronic myelogenous leukemia (CML)	54	F	<1:20	<1:20	0	0	10	5
4. B cell lymphoma	44	F	1:160	NA	2	NA	16	NA
5. Multiple myeloma	79	M	1:40	NA	24	NA	1	NA
6. Multiple myeloma	45	M	1:40	NA	4	NA	3	NA

M=male, F=female, NA=data not available

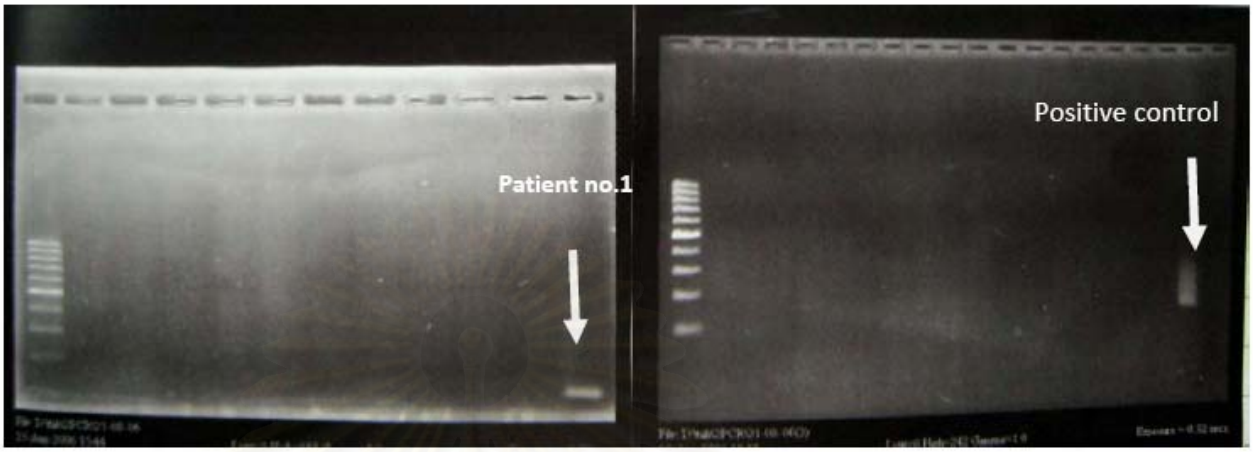
ผู้ป่วยรายที่ 4-6 เป็นผู้ป่วยรายที่ทำการเจาะตรวจในช่วง PILOT study

ตารางที่ 5.3 **ผลการตรวจ** HAI **และ** ELISA

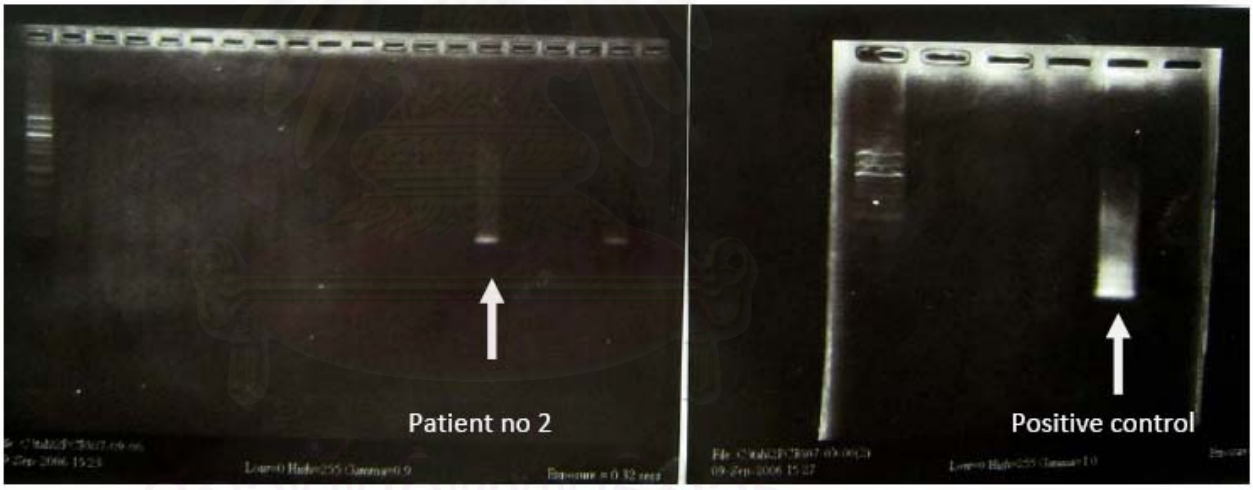
ลำดับที่	อายุ/เพศ	HI										ELISA			
		DEN1/1	DEN1/2	DEN2/1	DEN2/2	DEN3/1	DEN3/2	DEN4/1	DEN4/2	CHIK/1	CHIK/2	IgM/1	IgM/2	IgG/1	IgG/2
1	42/F	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	<1:20	0	NA	5	NA
2	55/M	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	<1:20	<1:20	4	3	13	14
3	65/F	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	<1:20	<1:20	0	0	13	10
4	47/M	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	0	0	1	1
5	39/F	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	<1:20	1	2	5	4
6	60/M	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:40	6	8	2	4
7	49/F	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	<1:20	0	0	1	1
8	52/M	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	<1:20	1:20	7	8	1	3
9	41/F	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:40	<1:20	<1:20	0	0	11	6
10	54/F	1:320	1:160	1:320	1:160	1:320	1:160	1:320	1:160	1:40	1:40	0	3	12	12
11	56/M	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	0	1	4	6
12	39/M	1:20	1:20	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	<1:20	21	19	10	6
13	60/M	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	1	2	5	0
14	50/F	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	5	1	6	0
15	38/F	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	0	0	2	2
16	48/F	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	4	0	13	2
17	42/F	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	3	3	3	5
18	69/M	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	<1:20	<1:20	5	4	23	17
19	32/F	1:80	1:80	1:160	1:80	1:160	1:80	1:160	1:80	<1:20	<1:20	1	0	7	8
20	58/M	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	0	2	1	5
21	36/M	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	5	3	1	0
22	44/F	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	0	6	1	7
23	39/M	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	0	0	7	2
24	50/M	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	<1:20	1	0	5	5
25	61/F	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	<1:20	1:20	3	4	4	2
26	54/F	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	0	0	10	5

F= female, M= male ผู้ป่วยหมายเลขที่ 11, 15, 26 เป็นผู้ป่วยที่ตรวจพบเดงกีในไขกระดูก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

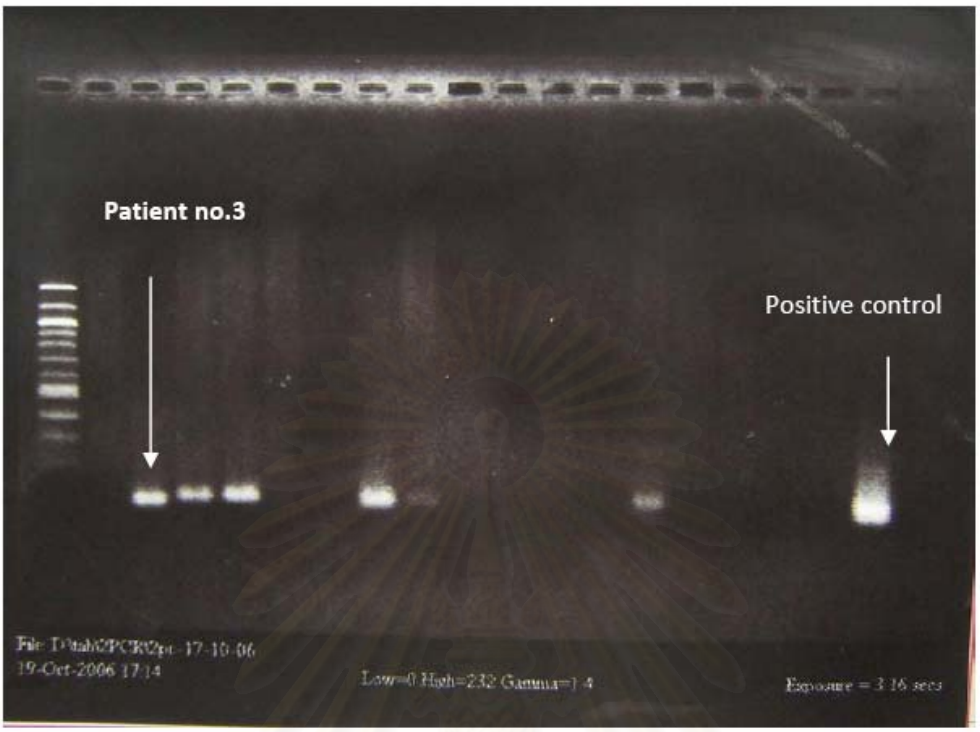


รูปที่ 5.1 แสดง RT-PCR ของผู้ป่วยรายที่หนึ่งเปรียบเทียบกับ positive control

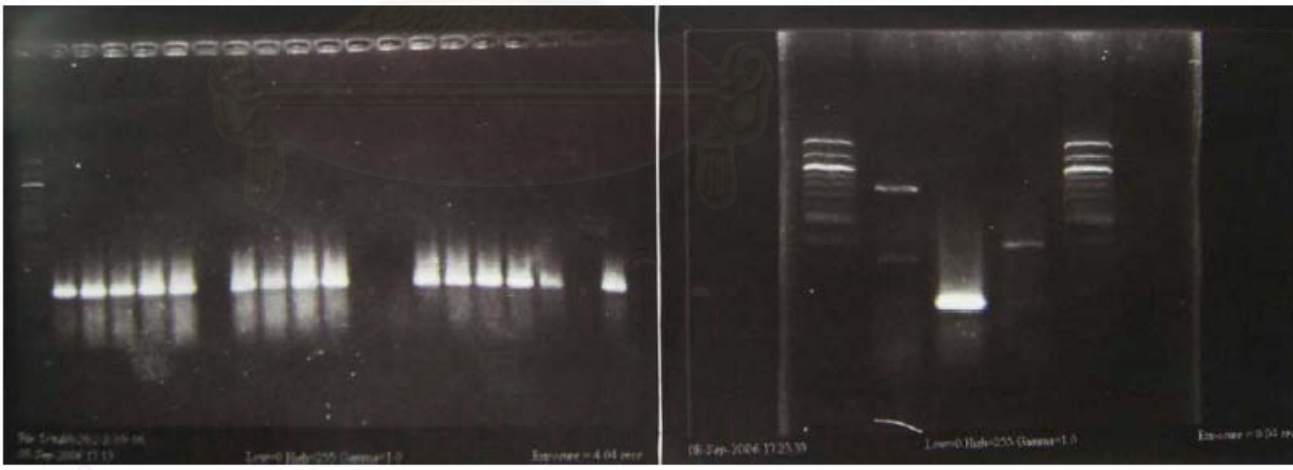


รูปที่ 5.2 แสดง RT-PCR ของผู้ป่วยรายที่สองเปรียบเทียบกับ positive control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.3 แสดง RT-PCR ของผู้ป่วยรายที่สาม เปรียบเทียบกับ positive controlและผลของผู้ป่วยรายอื่นที่ตรวจพบไวรัสเดงกีโดยวิธี RT-PCR ในPBMC จากในเลือด



รูปที่ 5.4 แสดง RT-PCR ของ Beta 2 globulin gene ที่ใช้แสดงถึงคุณภาพของ RNA ที่สกัดออกจากสิ่งส่งตรวจ

บทที่ 6

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการตรวจทาง serology โดยวิธี HAI และ ELISA พบว่า ระดับของ titer จากการตรวจโดยวิธี HAI จะอยู่ในระดับต่ำๆ ในส่วนใหญ่ของประชากรที่ศึกษาเคยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อนมานาน ซึ่งเป็นสิ่งที่พบได้บ่อยๆ ในคนที่อาศัยอยู่ใน endemic หรือ hyperendemic area ของการติดเชื้อไวรัสเดงก มีบางรายที่ระดับของ titer น้อยกว่า 1:20 ซึ่งไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยไม่เคยติดเชื้อไวรัสเดงกี แต่ประชากรกลุ่มนี้จะเป็นประชากร ที่เคยติดเชื้อมาแล้วนานมากจนระดับของ titer ลดลงมาต่ำกว่าที่การตรวจพบ ผู้ป่วยที่เป็น ผู้ใหญ่มักจะมีการติดเชื้อแบบ sequential infection แบบ secondary หรือ tertiary infection พบว่าการติดเชื้อส่วนใหญ่มักจะไม่มีอาการรุนแรง แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังมี คนไข้บางรายที่มีการติดเชื้อซ้ำที่มีอาการรุนแรงได้ ซึ่งกรณีนี้พบได้น้อยกว่า ส่วนความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีอาจจะเป็นผลของการที่ host มี immune response ต่อการติดเชื้อไวรัส หรือขึ้นอยู่กับ virulence ของเชื้อไวรัสเอง

การตรวจพบ genome ของไวรัสเดงกีในไขกระดูกของผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของโรคไข้เลือดออกมา ก่อนภายใน 4 สัปดาห์ กอ่นที่ทำการเจาะไขกระดูก และจากการตรวจโดยวิธี HI และ ELISA ทั้งสองวิธี ไม่พบว่ามี recent dengue infection ซึ่งการตรวจพบดังกล่าวอาจจะแสดงให้เห็นว่า ไวรัส หรือ บางส่วนของไวรัสสามารถที่จะมีความสามารถที่จะ หลบหลีกจากการกำจัดของ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ตรวจหา sequencing ของ genome ทั้งหมดของไวรัสที่คงเหลืออยู่ในไขกระดูก จึงไม่มารถที่จะบอกได้ว่าไวรัสที่อยู่ในไขกระดูกมีลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมอยู่ครบถ้วน สมบูรณ์หรือไม่ ส่วน ไวรัสใช้กลไกใดในการหลบหลีกจาก immune system ของร่างกาย หากใช้ model ของไวรัสอื่นๆ ที่สามารถคงอยู่หลังจาก การติดเชื้อครั้งแรก อาจจะตั้งสมมุติฐานได้ว่า เชื้อไวรัสเดงกีอาจจะมีกลไกใดกลไกหนึ่งที่คล้ายกันเพื่อทำให้สามารถคงอยู่ในเซลล์ของร่างกายได้ หรืออีกสาเหตุที่ทำให้ไวรัสสามารถคงอยู่หลังจากที่มีการติดเชื้อครั้งแรกได้ อาจจะเป็นจากสภาวะของ host ที่มีความผิดปรกติของระบบภูมิคุ้มกัน แม้ว่าประชากรในการศึกษาครั้งนี้ในการศึกษานี้จะเป็นประชากรที่เป็นโรคเลือดที่อาการสงบ แต่อย่างไรก็ดี ประชากรกลุ่มนี้ก็อาจจะยังมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ ยังบกพร่องไม่มากก็น้อย อาจจะเนื่องมาจากตัวโรคเอง หรือจากการที่ยังมีผลต่อการทำงานของ immune system ของร่างกายอยู่นานแม้ว่าจะสิ้นสุดการรักษานั้นไปแล้ว เนื่องจากการที่ได้ยาในกลุ่ม immunosuppressive agent หลายตัวที่สามารถทำให้มี delayed recovery ของ immune system

หากใช้ model ของ GBV-C ในการมาวิเคราะห์เนื่องจากเป็นไวรัสใน family เดียวกัน ก็อาจจะทำให้ตั้งสมมุติฐานได้อีกว่าไวรัสเดงกีเองก็สามารถที่จะมีการแบ่งตัวภายในเซลล์ที่อยู่ได้ ถ้าหากทีการศึกษาต่อโดยการหาหลักฐานว่าไวรัสยังมีชีวิตอยู่ ไม่ว่าด้วยการทำ viral isolation หรือรักษาการใช้ molecular study โดยการใช้ specific primer ที่สามารตรวจหา viral genome ที่เป็น post-transcription product ส่วนที่อาจจะมีผลต่อ host อย่างไรบ้างก็ควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ข้อจำกัดการศึกษา

ประชากรที่ศึกษาไม่ได้เป็นประชากรที่ healthy จริงแต่เป็นประชากรกลุ่มที่ มีความผิดปรกติของ immune system อยู่ การนำผลที่ได้ไปใช้เพื่ออธิบาย pathogenesis ของการติดเชื้อไวรัสเดงกีอาจจะนำไปใช้ได้ในประชากรที่เป็น immunocompromised host เท่านั้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ cross-sectional study จึงไม่สามารถที่จะอธิบายความผิดปรกติที่ตรวจพบว่าเกิดขึ้นเมื่อใด เนื่องจากมีการตรวจไขกระดูกเพียงครั้งเดียวหลังจากจบการศึกษาไม่ได้เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจอีกครั้งและไม่ได้ทำการศึกษาโดยนำไขกระดูกที่เคยส่งตรวจทางพยาธิวิทยามาทดลองหา ไวรัสโดยวิธี RT-PCR ดังนั้นถ้ามีการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจพบไวรัสเดงกีโดยวิธนี้ในผู้ป่วยรายเดียวกันแต่คนละช่วงเวลาก็น่าจะได้ข้อมูลที่น่าสนใจมากขึ้น ในส่วนของการตรวจหาไวรัสในการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจเพิ่มเติมเพื่อหา specific serotype ซึ่งถ้าหากทราบ serotype ก็อาจจะช่วยทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ การตอบสนองของ antibody ต่อไวรัสที่อยู่ในไขกระดูก ว่า antibody response นั้น specific ต่อ dengue ที่อยู่ในไขกระดูกหรือไม่ หรือ antibody response นั้น ไม่สามารถที่จะ cross-reactivity ต่อ persistent virus

จากการศึกษานี้ที่มีการตรวจพบไวรัสในไขกระดูก เป็นที่น่าสนใจว่าไวรัสสามารถที่จะหลบซ่อนอยู่ในที่ใด มีหลักฐานจากหลายการศึกษาที่สนับสนุนว่าเซลล์ที่สามารถมีไวรัสเดงกี ส่วนใหญ่จะเป็น monoctye ส่วนเซลล์อื่นที่พบได้บ้างแต่พบได้น้อยกว่าคือ B lymphocyte และ T lymphocyte แต่เนื่องจากไวรัสไม่ได้มีมีความจำเพาะเจาะจงเพียงแต่ hematologic cells เท่านั้นแต่มีการศึกษาว่าไวรัสเดงกีเองสามารถที่จะ infect เซลล์อื่นๆได้อีกด้วย โดยอ้างอิงจากหลักฐานทั้งใน vitro โดยมีการทดลองทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงติดเชื้อไวรัสเดงกี และ vivo เองก็มีหลักฐานที่พบว่าสามารถที่จะตรวจหาไวรัสโดยวิธีย้อม antigen ในอวัยวะต่างๆของผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออก ซึ่งรวมถึง เซลล์ไขกระดูก stromal cell หากมีการศึกษาต่อไปเพื่อหา reservoir ของ dengue genome การตรวจโดยวิธี immunohistochemistry ก็น่าจะมีประโยชน์ ในการสืบค้นต้นตอของไวรัส

การตรวจพบ dengue genome ในไขกระดูกอาจจะเป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่า ไวรัสเดงกีสามารถที่จะอยู่ในเซลล์ต่างๆ ภายหลังจากการติดเชื้อแบบเฉียบพลันช่วงที่มี viremia ไวรัสก็จะกระจายไปตามอวัยวะต่างๆ แล้วไวรัสก็เข้าไปอยู่ในเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์ที่ มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อเดงกี ในอวัยวะต่างๆ นอกเหนือไปจากเซลล์ PBMC ในไขกระดูก โดยอาจจะอยู่ในอวัยวะที่เป็น lymphoid tissue ต่างๆ เช่น ใน Payer's patch ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นหัวข้อการวิจัยเกี่ยวกับ pathogenesis ในอนาคต

ปัจจัยที่อาจจะเป็นสาเหตุของการมี persistence of dengue virus

- ปัจจัยด้าน host
- ปัจจัยเกี่ยวกับ virus
- สภาวะแวดล้อม

ผลที่อาจจะเกิดขึ้นภายหลังจากการที่มี viral persistence

- ไวรัสอาจจะมีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นในบางช่วงซึ่งทำให้เกิด viremia และมีอาการแสดงทางคลินิก ซึ่งสมมุติฐานนี้จะเป็นการเปลี่ยนแปลงความเข้าใจของ pathogenesis และการเกิดความรุนแรงของโรค โดยในปัจจุบันเชื่อว่าการเกิดโรคที่รุนแรง เกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการที่ไวรัสมีการคงอยู่ หลังจากที่ติดเชื้อครั้งก่อน แล้วมีการแบ่งตัว (active replication) ภายหลัง

- Virus มีการแบ่งตัวในขนาดต่ำๆ มีการกระตุ้น host immune response อยู่ตลอด ทำให้มีความผิดปรกติของระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกับโรคในกลุ่ม virus-associated lymphoproliferative disease เช่น EBV-associated lymphoma
- เนื่องจากมีไวรัสอยู่ในร่างกาย โดยเฉพาะที่ในไขกระดูก ก็อาจจะทำให้ร่างกายพยายามจะกำจัดไวรัส ทำให้เกิด inflammation ขึ้นมาให้ environment ของ bone marrow มีการเปลี่ยนแปลง และเกิด injury ต่อ เซลล์อื่นที่อยู่ข้างเคียง
- มีการ integration ของไวรัสเข้าไปใน host genome ซึ่งอาจจะกระตุ้นให้เกิดความผิดปรกติของเซลล์ของ host
- อาจจะมีผลต่อการเกิด interactionระหว่าง microbes เช่นเดียวกับ ไวรัสGBV-C ที่มี interaction กับ ไวรัสHIV

รายการอ้างอิง

[1] **แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคไข้เลือดออกเดงกี**. กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข, 2546: 1-2.

[2] คำนวณ อึ้งชูศักดิ์. **สถาณการณ์และแนวโน้มของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทย**. ใน: ชิษณุ พันธ์เจริญ และคณะ บรรณาธิการ. ไข้เลือดออก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ หจก. เพนตากอน แอ็ดเวอร์ไทซิ่ง, 2546:12-3.

[3] Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA Jr, Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. **J Infect Dis** 1973 Jul;128(1):23-30

[4] Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Sulianti Saroso Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. **J Am J Trop Med Hyg** 1979 Jul;28(4):701-10

[5] Dengue and dengue hemotrrhagic fever, D.J. Gubler and G. Kuno, CAB international Publication, Madison Avenue New York 1997

[6] Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. **Am J Trop Med Hyg** 1996 May;54(5):503-10

[7] La Russa VF, Innis BL.Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. **Baillieres Clin Haematol** 1995 Mar;8(1):249-70.

[8] Tomohiko Takasakia Kazuo Takadab Ichiro Kuranea Electron Microscopic Study of Persistent Dengue Virus Infection: Analysis Using a Cell Line Persistently Infected with Dengue-2 Virus **Intervirology** 2001;44:48–54

[9] J.V. Bugrysheva a, V.A. Matveeva a, E.Yu. Dobrikova a, N.V. Bykovskaya a,S.A. Korobova b, V.N. Bakhvalova b, O.V. Morozova Tick-borne encephalitis virus NS1 glycoprotein during acute and persistent infection of cells **Virus Research** 76 (2001) 161–169

[10] Wang JT, Sheu JC, Lin JT, Wang TH, Chen DS Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. **J Infect Dis** 1992;166:1167

[11] Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. **J Gen Virol** 1993;74: 669

[12] Marek Radkowski, Joanna Kubicka, Elzbieta Kisiel, Janusz Cianciara, Marek Nowicki, Jorge Rakela, and Tomasz Laskus Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects **Blood** 1995;12:3986-9

[13] Tillmann H. L., Heiken H., Knapik-Botor A., Heringlake S., Ockenga J., Wilber J. C., Goergen B., Detmer J., McMorrow M., Stoll M., Schmidt R. E., Manns M. P. Infection with GB Virus C and Reduced Mortality among HIV-Infected Patients **N Engl J Med** 2001; 345:715-724

[14] Williams C. F., Klinzman D., Yamashita T. E., Xiang J., Polgreen P. M., Rinaldo C., Liu C., Phair J., Margolick J. B., Zdunek D., Hess G., Stapleton J. T. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men **N Engl J Med 2004**; 350:981-990

[15] Kalayannarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **J Infect Dis** 1997;176:313-21.

[16] Chye JK, Lim CT, Ng KB, et al. Vertical transmission of dengue. **Clin Infect Dis** 1997;25:1374-7.

[17] WHO. Dengue hemorrhagic fever : diagnosis, treatment and control. Geneva 1997.

[18] Tasssniyom S, Vasanawathana S, Chirawatkul A, Rojanasupot S. Failure of high dose methylprednisolone in established dengue shock syndrome : a placebo-controlled, double-blinded study. **Pediatrics** 1993; 92(1):111-5.

[19] Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis** 2001; 2:33-42.

[20] Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol** 1996;3:621-7.

[21] Barnes WJS, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. **Am J Trop Med Hyg** 1974;23:495-506.

[22] Morens DM, Halstead SB, Larsen LK. Comparison of dengue virus plaque reduction neutralization by macro and "semi-micro" methods in LLC-MK2 cells. **Microbiol Immunol** 1985;29:1197-205.

[23] De Paula SO, Fenseca BAL. Dengue: A review of the laboratory tests – a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian J Infect Dis** 2004;8:390-8.

[24] Bundo K, Igarashi A. Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. **J Virol Methods** 1985;11:15-22.

[25] Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg** 1989;40:418-27.

[26] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **J Infect Dis** 1997;176:322-30.

[27] Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. **J Clin Microbiol** 1998;36:3737-9.

[28] Artimos de Oliveira S, Rodrigues CV, Camacho LA, Miagostovich MP, et al. Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. **J Virol Methods** 1999;77:81-6.

[29] Balmseda A, Guzmán MG, Hammond S, et al. Diagnosis of dengue virus infection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. **Clin Diagn Lab Immunol** 2003;10:317-22.

[30] Suandork P, Kulwichit W, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Prommalikit O, Panchareon C, et al. Diagnosis of dengue viral infection by detection of specific

immunoglobulin in oral fluid. **The 11th International Congress for Infectious Diseases (ICID)** 2004 Mar 4-7;Cancun:Mexico. (Abstract 14.016).

[31] Prommalikit O, Kulwichit W, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Suandork P, Pupaibool J, et al. Detection of urinary antibody as a tool for diagnosis of dengue infection. **The 11th International Congress For Infectious Diseases (ICID)** 2004 Mar 4-7;Cancun:Mexico. (Abstract 14.018).

[32] Chen WJ, Huang KP, Fang AH. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. **Southeast Asian J Trop Public Health** 1991;22:659-63.

[33] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase:viremia and antibody responses. **J Infect Dis** 1997;176:322-30.

[34] Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J Microbiol Immunol Infect** 2005:38:5-16.

[35] Henchal EA, Polo SL, Vorndam V, et al. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. **Am J Trop Med Hyg** 1991;45:418-28.

[36] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G, Voradam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1992;30:545-51.

[37] Maneekarn N, Morita K, Tanaka M, et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue viruses isolated from patient sera. **Microbiol Immunol** 1993;37:41-7.

[38] Yenchitsomanus P, Sricharoen P, Jaruthasana I, et al. Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 1996;27:228-36.

[39] Raengsakulrach B, Nisalak A, Maneekarn N, et al. Comparison of four reverse transcription polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. **J Virol Methods** 2002;105:219-32.

[40] Kulwichit W, Mekmullica J, Yapron R, et al. Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction in urine specimens. **The 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases**. Thailand. November10-13, 2002. Page 151. (Abstract TU-FP8-3).

[41] Kulwichit W, Mekmullica J, Krajiw S, Prommalikit O, Yapom R, Intaraprasong P, et al. Highly-sensitive virologic diagnosis of dengue infection by a newly-developed protocol of reverse transciptase-nested polymerase chain reaction of serum/plasma, peripheral blood leukocyte and urine specimens. **The 41st Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America (IDSA)**. 2003 Oct 9-12;San Diego:USA. (Abstact 345).

[42] Wang WK, Sung TL, Tsai YC, Kao CL, Chang SM, King CC. Detection of virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. **J Clin Microbiol** 2002;40:4472-8.

[43] Sudiro TM, Zivny J, Ishiko H, et al. Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Med Virol** 2001;63:29-34.

[44] De Paula SO, Fonseca BAL. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. **J Virol Methods** 2002;102:113-7.

[45] Wu SL, Lee EM, Putvatana R, et al. Detection of dengue virus RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. **J Clin Microbiol** 2001;39:2794-8.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Protocol **การทำ** RT-PCR **ที่ใช้ในการวิจัย**

- EDTA blood process
  - แยก EDTA blood 1 ml เพื่อ extract ด้วย RNA Blood kit เพื่อนำไปทำ Real time PCR และ PCR
- **นำ** EDTA blood **ที่เหลือไปปั่นที่** 3300 rpm 10 **นาที**
  - แยก Plasma ใส่ tube ขนาด 1.5 ml จำนวน 2 tube ปริมาตร 140 ul และอีก tube คือ Plasma ที่เหลือเก็บที่ -80'C
- **เติม** PBS **เป็น**1 **เท่าของปริมาตรเดิมแล้ว** mix **ให้เข้ากัน**
  - เตรียม Ficoll-Paque tm Plus ปริมาตรเท่ากับ EDTA blood เริ่มต้นใน tube 15 ml.
  - ทำการ Over layer บน Ficoll- Paque และนำไปปั่นที่ 2200 rpm 20 นาที
  - ดูดชั้นสีขาวขุ่น (PBMC) ใส่ tube ขนาด15 ml เติม PBS เป็น 10 เท่าของ PBMC
  - ปั่นที่ 1500 rpm 10 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้งแล้วเติม PBS ประมาณ 500-600 ul ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ pellet
- mix **ให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่** tube **ขนาด** 1.5 ml **จำนวน** 2 tube **ปริมาตร** 140 ul **และอีก** tube **เป็น** PBMC **ที่เหลือเก็บที่** -80'C

Viral RNA **extraction**

sample 140 ul + 560 ul RVL buffer

room temp 10 min, centrifuge 1 sec - เติม 560 ul ethanol (absolute), vortex 15 sec - นำ 630 ul ของ solution ใส่ใน column

centrifuge 6000 g,1min (8000 rpm)

- เท filtrate ทิ้ง, เอา column ใส่ tube เดิม
- นำ solution ที่เหลือใส่ column, ปั่น 8000 rpm 1 min
- ทิ้ง tube เดิมแล้วนำ column ใส่ tube ใหม่
- เติม 500 ul AW1 ปั่น 8000 rpm 1 min
- ทิ้ง tube เดิมแล้วนำ column ใส่ tube ใหม่
- เติม 500 ul AW2 ปั่น 14000 rpm 3 min
- ทิ้ง tube เดิมแล้วนำ column ใส่ tube ใหม่แล้วปั่น 14000 rpm 1 min
- นำ column ใส่ tube 1.5 ml, เติม 60 ul AVE, ทิ้งไว้ที่ room temp 1 min
- ปั่น 8000 rpm 1 min , และแบ่งใส่ 0.2 micro tube เก็บที่-80 'C

Reverse Transcriptase (Bio lab)

RT Protocal (ซึ่งเตรียม cDNA)

- **preparation template & primer**

  Final concentration

10 uM Den outer1	0.75	(0.75 μm)
10 uM Den outer2	0.75	(0.75 μm)
template	3.5	(25-50 ng)

  นำไป incubate ที่ 70'C, 5 min ……..quick chill 4'C, 5min…..hold on ice

- **Mixture**

  Final concentration

10X buffer (contain 3 mM Mgcl2)	2 ul	(1x)
10 uM dNTPs	1 ul	(0.5 mM)
RNA secure	0.8 ul	
DEPC	10.2 ul	
Ribo-inhibitor	0.5 ul	

  นำไป incubate ที่60'C , 20 min.....add enz RT 0.5 ul + template and primer

- **Condition**

25 'C	5 min
42 'C	60 min
70 'C	15 min

1 st PCR

- **Mixture**

  Final concentration

10 X buffer	2 ul	1x
10 mM dNTPs	0.4 ul	0.2 mM
25 mM MgCl2	1.6 ul	2 μM
10 uM Den outer1	0.75 ul	0.75 μM
10 uM Den outer2	0.75 ul	0.75 μM
dWater	11.9 ul	
hot strat taq	0.1 ul	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

cDNA		2.5 ul

- Condition

95'C	15 min	
95'C	1 min	
50'C	1 min	40 cycles
72'C	1 min	
72'C	7 min	

- 2 nd PCR

10 X buffer	2 ul
10 mM dNTPs	0.4 ul
25 mM MgCl2	0.4 ul
10 uM Den inner1	0.75 ul
10 uM Den inner2	0.75 ul
dWater	14.6 ul
hot strat taq	0.1 ul
1 st PCR product	1 ul

- Condition

95'C	15 min	
95'C	1 min	
58'C	1 min	25 cycles
72'C	1 min	
72'C	7 min	

4. Run gel electrophoresis (2%)

- ชั่ง agorose หรือ วุ้น 1.6 g (large chamber) เติม TBE buffer 80 ml หรือชั่ง agorose วุ้น 0.8 g (small chamber) เติม TBE buffer 40 ml

- ใส่ microwave เมื่อละลายจึงเทใส่ chamber และเสียบcombลงไปรอให้ gel เย็นจึงดึง combออก

load gel โดยใช้ PCR product 10 ul : loading dye 2 ul ผสมกันแล้วหยอดลงในช่องว่างบน gel

load marker โดยใช้ 100 bp 1 ul : loading dye 2 ul : buffer TBE 9 ul

95 – 100 volt เป็นเวลา 60-70 min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Protocol การทำ Dengue ELISA

I. Materials

1. Nunce E.I.A. Microtitration plate, 96 Flat bottom wells 1.0 x 0.7 cm, CAT. No. 449824
2. Humidified box
3. Goat anti-human IgM and IgG (5 FCm) (Cappel) 1:800 (40 ml = 250 บาท)
4. 0.006 M Carbonate-Bicarbonate buffer (pH 9.0 + 0.1)

Na_2CO_3	0.076	gm.
$NaHCO_3$	0.700	gm.
DW	500	ml.

5. 1 x PBS

10 x PBS (pH 7.4 + 0.1)

Sodium chloride	80.0	gm.
Potassium chloride	2.0	gm.
Potassium phosphate, monobasic	1.9	gm.
Sodium phosphate, dibasic, anhydrous	9.0	gm.
DW	1000	ml.

6. PBS-T (0.05% Tween in PBS):

Dilute 10 x PBS to 1:10 (10 x PBS 200 ml + DW 1800 ml) add Tween 20, 1 ml

7. 5% acetone extracted normal human serum (40 ml = 700 บาท) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bovine albumin fraction v (Sigma)

7. Test serum or CSF
8. Serum controls: (1 ชุด = 250 บาท) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

weak anti-dengue IgM (WDM); strong anti-dengue IgM (SDM)

weak anti-dengue IgG (WDG); strong anti-dengue IgG (SDG) and negative control (NC)

11. Antigens: (0.5 ml = 1000 บาท)

Dengue-1, Hawaii strain, HA: 1:5120, pH 6.2

Dengue-2, Tr 1751 strain, HA: 1:5120, pH 6.2

Dengue-3, H 87 strain, HA: 1:1280, pH 6.4

Dengue-4, H 241 strain, HA: 1:1280, pH 6.4

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

12. Anti-flavivirus IgG-horseradish peroxidase conjugate to give a weak positive control OD of 0.40 + 0.15

(100 ml = 250 บาท) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

13. Substrate:

1) 0.1 M Citrate phosphate buffer (pH 5.0 + 0.1)

Citric acid	3.5 gm.
Sodium phosphate dibasic, anhydrous	5.1 gm.
DW	1000 ml.

2) O-phenylene diamine (OPD) (5 mg) 1 tab Sigma

3) 3% H_2O_2: To prepare: Dissolve 1 tab (OPD) in 10 ml (0.1 M citrate phosphate buffer) and add 33 ul of fresh 3% H_2O_2.

14. M H_2SO_4
15. Votex
16. ELISA plate reader with 490 nm
17. Multichannel: 50-300 μl
18. Pipet: 10 μl, 20 μl, 200 μl, 1000 μl
19. Tip: 10 μl, 20 μl, 200 μl, 1000 μl
20. Incubator (35-37°C)
21. pH meter
22. Refrigerator
23. Disposable gloves
24. Distilled water
25. Absorbent paper
26. Sodium hypochlorite and Sodium bicarbonate

II. Methods (ทุกขั้นตอนต้องเก็บไว้ใน humidified box)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Sensitize Step

ก. นำ Goat anti-human IgM & IgG (1:800) 12.5 μl ลงใน 0.006 M Carbonate-Bicarbonate buffer 10 ml mix ให้เข้ากัน

ข. ใส่ 100 μl ลงในแต่ละหลุมของ EIA plate เมื่อเสร็จแล้วนำ plate ใส่ลงใน moisture box และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 1 คืน หรือที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาทำ

2. Antibody Step

ก. Dilute serum, to make 1:100 → 1 x PBS 990 μl + Serum 10 μl

Dilute CSF, to make 1:10 → โดยใช้ 1 x PBS 900μl + CSF100 μl

ข. Dilute controls 1:100 → โดยใช้ 1 x PBS 990 μl + controls 10 μl

(สามารถเก็บไว้ที่ 4 °C นาน 1 สัปดาห์หรือมากกว่าเล็กน้อย)

ค. นำ Plate ที่ sensitized แล้ว (ถ้าเก็บไว้ที่ –20°C นำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลาย หรือใส่ PBS-T ลงไปเพื่อให้ละลายได้เร็วขึ้น) ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง แล้วเคาะให้แห้ง

ง. ใส่ Serum, controls (duplicate) 50 μl จนครบทุกหลุม เก็บไว้ใน moisture box ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน หรือถ้าต้องการให้เสร็จภายในวันเดียว เก็บไว้ที่ moisture box ประมาณ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

จ. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง เคาะ plate ให้แห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Antigen Step

ก. เตรียม 5 ml. ต่อ plate ของ Den-1, -2 และ –3 ที่ 16 units ส่วน Den-4 ที่ 8 units ดังนี้

Den-1

1 unit = 1:5120

16 units = (1/5120) x 16 = 16:5120 = 1:320

ที่ dilution 1/320, 320 ml. มี Den-1 = 1 ml.

ที่ dilution 1/320, 5 ml. มี Den-1 = (1 x 5)/320 = 0.01563 ml.= 15.63 μl

Den-2

1:5120 คำนวณเหมือน Den-1 ดังนั้น Den-2 ที่ 16 units ใน 5 ml. = 15.63 μl

Den-3

1 unit = 1:1280

16 units = (1/1280) x 16 = 16:1280 = 1:80

ที่ dilution 1/80, 80 ml. มี Den-3 = 1 ml.

ที่ dilution 1/80, 5 ml. มี Den-3 = (1 x 5)/80 = 0.0625 ml. = 62.5 μl

Den-4

1 unit = 1:1280

8 units = (1/1280) x = 8:1280 = 1:160

ที่ dilution 1/160, 160 ml. มี Den-4 = 1 ml.

ที่ dilution 1/160, 5 ml.มี Den-4 = (1 x 5)/160 = 0.03125 ml. = 31.25 μl

ข. ใส่ antigen Den-1 titer 1:5120 = 15.63 μl

Den-2 titer 1:5120 = 15.63 μl

Den-3 titer 1:1280 = 62.50 μl

Den-4 titer 1:1280 = 31.25 μl

ลงใน NHS acetone extracted 5 ml. Mix ให้เข้ากัน

ค. ใส่ antigens ที่ได้ลงในทุก ๆ หลุมๆ ละ 50 μl จนครบ เก็บไว้ใน moisture box ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน หรือถ้าต้องการให้เสร็จภายในวันเดียว เก็บไว้ที่ moisture box ประมาณ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ง. เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง เคาะ plate ให้แห้ง

4. Conjugate Step

ก. เตรียม 0.5% BSA (Bovine Serum albumin) ลงใน NHS 2.5 ml. ต่อ plate โดยคำนวณดังนี้

100 ml. of 0.5% BSA มี BSA = 0.5 gm.

2.5 ml. of 0.5% BSA มี BSA = (0.5 x 2.5)100 = 0.0125 gm.

Mix ให้เข้ากัน

ข. เตรียม conjugate at 1:300 ลงใน NHS 2.5 ml ต่อ plate โดยคำนวณดังนี้

300 ml. conjugate = 1 ml.

2.5 ml. conjugate = (1 x 2.5)/300 = 0.00714 ml. = 8.33 μl

ใช้ NHS 2.5 ml + 0.5% BSA 0.0125 gm. + conjugate 7.14 μl mix ให้เข้ากัน

ค. ใส่ conjugate ที่ได้ลงในทุก ๆ หลุมๆ ละ 25 μl จนครบ เก็บไว้ใน moisture box เก็บไว้ที่ moisture box ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35-37°C

5. Substrate Step

ก. นำ 1 tab (5 mg) ของ O-phenylene diamine (OPD) ลงใน 0.1 M citrate phosphate buffer 10 ml. แล้วตามด้วย 3% H_2O_2 3.3 μl mix ให้เข้ากัน (เมื่อเหลือเวลา 20 นาทีก่อนจะล้าง plate) ขั้นตอนนี้ต้องหุ้ม foil เพื่อไม่ให้แสงเข้า

ข. เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว ล้าง plate ด้วย PBS-T 5 ครั้ง และล้างตามด้วย PBS 2 ครั้ง เคาะ plate ให้แห้ง

ค. ใส่ Substrate ลงไปทุกๆ หลุม ๆ ละ 100 μl จนครบ เก็บไว้ในที่มืด ถ้าเป็น IgG ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ส่วน IgM ทิ้งไว้ประมาณ 35 นาที

ง. หยุดปฏิกิริยาด้วย 4 M H_2SO_4 50 μl ทุกหลุม

6. อ่านผล: โดยใช้ spectrophotometer wave length 490 nm.

7. แปลผล:

ก. The weak positive control (WPC) is defined as 100 units

ข. Calculate a binding index: $BI = \frac{OD\ (test\ sample) - OD\ (negative\ control)}{OD\ (WPC) - OD\ (negative\ control)}$

ค. Unit = BI x 100

ง. A value of > 40 units is positive.

จ. For dengue infection, a ratio of anti-dengue IgM to IgG (if either test is > 40 units) of > 1.8 is typical of a primary infection. A ratio of units IgM to units IgG < 1.8 is typical of a secondary infection. This ratio is not valid for determining if JE occurred in a dengue-immune host. Test specificity is > 95%

แบบฟอร์ม Dengue ELISA และสรุปวิธีทำทั้งหมด

Anti-dengue IgM or IgG Infectious Diseases Division, Chulalongkorn Hospital

Date .....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Empty										Empty	
B	SPC											
C												
D					WPC							
E												
F							NC					
G									WPC			
H	Empty										Empty	

SPC = Strong positive control, WPC = Weak positive control, NC = Normal control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Step	Material (working/plate)	Buffer (working/plate)	Vol/well	Time	Temp	Wash	Time
Sensitize	Goat anti-human IgM 1:800 = 12.5 µl Goat ant-human IgG 1:800 = 12.5 µl	0.006 M Carbonate = 10 ml	100 µl	ON or 4 hrs	4 °C	PBS-T 5 ครั้ง	
Test specimen	Serum 1:100 = 10 µl CSF 1:10 = 100 µl Control 1:10 = 3 µl	PBS = 990 µl PBS = 900 µl PBS = 300 µl	50 µl	ON or 2 hrs	4 °C RT	PBS-T 5 ครั้ง	
Antigen	Ag Den 1 (1:5120) = 15.63 µl Den 2 (1:5120) = 15.63 µl Den 3 (1:1280) = 62.5 µl Den 4 (1:1280) = 31.25 µl	5% NHS = 5 ml	50 µl	ON or 2 hrs	4 °C RT	PBS-T 5 ครั้ง	
Conjugate	0.5% BSA = 0.0125 gm Human anti-flavivirus IgG-HRP conjugate 1:300 = 8.33 µl	5% NHS = 2.5 ml	25 µl	1 hr	35-37 °C	PBS-T 5 ครั้ง + PBS 2 ครั้ง	
Substrate	OPD 0.5 mg/ml = 0.005 g 3% H_2O_2 = 33 µl (ดูดจาก stock 3.3 µl) เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที add OPD + 3% H_2O_2 แล้วหุ้ม foil	0.1 M Citrate phosphate = 10 ml	100 µl	30 min	RT	IgM = 35 mins IgG = 30 mins	
Stop reaction	4 M H_2SO4		50 µl				

Anti-dengue IgM/IgG, Infectious Diseases Division, Chulalongkorn Hospital

Date .....

	IgM						IgG					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Empty						SDG (HN)				Empty	
B	SDM (HP)											
C												
D			WDM (LP)						WDG (LN)			
E												
F							NC (ST)					
G					WDM (LP)						WDG (LN)	
H	Empty										Empty	

SPC = Strong positive control, WPC = Weak positive control, NC = Normal control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Step	Material (working/plate)	Buffer (working/plate)	Vol/well	Time	Temp	Wash	Time
Sensitize	Goat anti-human IgM 1:1800 = 6.25 µl Goat ant-human IgG 1:800 = 6.25 µl	0.006 M Carbonate = 5 ml	100 µl	ON or 4 hrs	4°C	PBS-T 5 ครั้ง	
Test specimen	Serum 1:100 = 10 µl CSF 1:10 = 100 µl Urine & saliva No dilute Control: 1:100 = 3 µl	PBS = 990 µl PBS = 900 µl PBS = 300 µl	50 µl	ON or 2 hrs	4° C RT	PBS-T 5 ครั้ง	
Antigen	Ag Den 1 (1:5120) = 15.63 µl Den 2 (1:5120) = 15.63 µl Den 3 (1:1260) = 63.5 µl Den 4 (1:1280) = 31.25 µl	5 % NHS = 5 ml	50 µl	ON or 2 hrs	4°C RT	PBS-T 5 ครั้ง	
Conjugate	0.5% BSA = 0.0125 gm Human anti-flavivirus IgG-HRP conjugate 1:300 = 8.33 µl	5 % NHS = 2.5 ml	25 µl	1 hr	35-37° C	PBS-T 5 ครั้ง + PBS 2 ครั้ง	
Substrate	OPD 0.5 mg/ml = 1 tab (5 mgs) 3% H_2O_2 = 33 µl (ดูดจาก stock 3.3 µl) เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที add OPD + 3% H_2O_2 แล้วหุ้ม foil	0.1 M Citrate phosphate = 10 ml	100 µl	30 mins	RT	IgM = 35 mins IgG = 30 mins	
Stop reaction	4 M H_2SO4		50 µl				

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล โอภาส พุทธเจริญ

วัน เดือน ปี เกิด 23 ธันวาคม 2514

ภูมิลำเนา กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

2538 แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2545 วุฒิบัติแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์

การทำงาน

2539 แพทย์เวชปฏิบัติทั่วไป โรงพยาบาลพนัสนิคม จ.ชลบุรี

ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดหน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย