สัญญาเลขที่ RSA4580022

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหาปริมาณและความหนาแน่นของไวรัสเดงกี ที่ตรวจพบในเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในเลือดและในซีรั่มหรือพลาสมา ด้วยวิธี RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction) และ real-time PCR

ผู้วิจัย
ผศ.นพ.วันล่า กุลวิชิต

สังกัด
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

หมายเหตุ โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนร่วมส่วนหนึ่ง จากมูลนิธิเกาหลีเพื่อการศึกษาขั้นสูง และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ คณาจารย์, เจ้าหน้าที่, และนักวิทยาศาสตร์ของศูนย์ห้องปฏิบัติการโรคทางสมอง อปร 11, ศูนย์วิจัยการแพทย์ อปร 9-10, กลุ่มวิจัยของศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, และของศ.นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, และ Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) สำหรับข้อแนะนำและความอนุเคราะห์เกี่ยวกับงานวิจัยทั้งหมด, ขอบพระคุณแพทย์ประจำบ้านและแพทย์ประจำบ้านต่อยอดตลอดจนเจ้าหน้าที่พยาบาลและบุคลากรทางแพทย์ของกุมารเวชศาสตร์, อายุรศาสตร์, หน่วยฉุกเฉิน, และแผนกผู้ป่วยนอก ที่ดูแลรักษาและช่วยเหลือประสานงานเกี่ยวกับผู้ป่วยในโครงการวิจัย, เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยของคณะแพทยศาสตร์และของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำทางด้านเอกสารและการดำเนินการเกี่ยวกับทุนวิจัย

Abstract (บทคัดย่อ)

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของประเทศไทย การวินิจฉัยการติดเชื้อทางห้องปฏิบัติการ ยังมีข้อจำกัดอยู่ที่ความจำเป็นต้องเจาะเลือด ผู้ป่วยเด็กมักไม่ใคร่ให้ความร่วมมือดีนัก คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สิ่งส่งตรวจในช่องปาก และ/หรือ ปัสสาวะของผู้ป่วย มาทำการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาเบื้องต้น ในผู้ป่วยหลายสิบราย พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในน้ำลายได้ โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ประมาณ 30-50% ของผู้ป่วย และตรวจได้ในปัสสาวะประมาณ 80% แม้จะเป็นสิ่งส่งตรวจในระยะท้ายๆ ของไข้ ซึ่งนับเป็นอัตราการตรวจพบที่ใกล้เคียงกับหรือดีกว่าการใช้ซีรั่มในการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีนั้น สามารถ

ตรวจพบได้ในผู้ป่วยเกือบทุกราย ทั้งในน้ำลายและในปัสสาวะ เนื่องจากใช้สิ่งส่งตรวจในระยะท้ายของไข้ และ/หรือในระยะหลังไข้แล้ว จากผลการศึกษาวิจัยชิ้นนี้ สรุปได้ว่า สิ่งส่งตรวจจากในช่องปากและปัสสาวะ มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้สูง สมควรมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาต่อเนื่อง เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกและในทางระบาดวิทยาต่อไป

Dengue viral infection is one of the most important public health problems in Thailand. Laboratory diagnosis is limited by a need to draw blood and pediatric patients are not happy to cooperate. Our group studied a feasibility of using oral specimens and/or urine for dengue diagnostics. A pilot study in a handful of patients showed that the virus could be detected in 30-50% of oral specimens and 80% of urine. This is true even for late febrile specimens. Sensitivity was comparable or even slightly better than that of serum specimens in previous studies. As for antibody detection by ELISA, almost all patients gave positive results in both saliva and urine specimens. This is related to the fact that late febrile and postfebrile specimens were employed. In conclusion, oral specimens and urine have a potential to be used for dengue diagnosis and deserve further research and development for clinical and epidemiologic applications.

Key Words: dengue, urine, saliva, buccal brush, PCR, ELISA

Project Code :
(รหัสโครงการ)

RSA4580022

Project Title :
(ชื่อโครงการ)

การตรวจหาปริมาณและความหนาแน่นของไวรัสเดงกี ที่ตรวจพบในเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในเลือดและในซีรั่มหรือพลาสมา ด้วยวิธี RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction) และ real-time PCR

Investigator : Asst. Prof. Wanla Kulwichit, MD

Project Period : August 15, 2002 – August 14, 2005

หมายเหตุ โครงการวิจัยชิ้นนี้ ได้ถูกปรับเปลี่ยนในขณะเริ่มทำการวิจัย เนื่องจากการวิจัยดังกล่าว ต้องใช้ทุนสนับสนุนจำนวนมาก แต่การขอทุนสนับสนุนเพิ่มเติมจากแหล่งทุนอื่นในช่วงเริ่มต้นของการทำวิจัยชิ้นนี้ ไม่ประสบความสำเร็จ คณะผู้วิจัย จึงทำการปรับเปลี่ยนแผนการวิจัย เป็นการวิจัยนำร่อง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้สิ่งส่งตรวจที่ไม่ปรกติธรรมดา (เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ปัสสาวะ น้ำลาย และเยื่อบุช่องปาก) มาช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ที่จะนำสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) และ/หรือปัสสาวะ (urine) มาตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกี เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีในทางคลินิก และ/หรือนำมาใช้สำรวจในทางระบาดวิทยา ซึ่งอาจจะทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการเจาะเลือดผู้ป่วยเพื่อการวินิจฉัยได้
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ตรวจปัสสาวะและสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก เพื่อการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกีตั้งแต่วันแรกๆ ของโรค
3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ ELISA ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกีย้อนหลัง จากหยดเลือดหรือปัสสาวะแห้งบนกระดาษกรองที่เก็บรักษาไว้เป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของประเทศไทย ในปัจจุบัน การติดเชื้อนี้พบได้ตลอดทั้งปี และพบได้ชุกชุมในฤดูฝน ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน จะมีการดูแลรักษาที่ดีขึ้น ก็ยังพบมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อที่มีอาการรุนแรง คือ โรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever) และ dengue shock syndrome เกิดขึ้นทุกปี

การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี อาศัยข้อมูลดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทางคลินิก(1997a) คือ อาการไข้สูงเฉียบพลัน ซึ่งมักจะมีระยะเวลาในช่วง 1-7 วัน ก่อนมาพบแพทย์อาจมีอาการออกผื่น ตรวจร่างกายพบหน้าแดง ตับโต อาจมีผื่น ตรวจ Tourniquet test ได้ผลบวก ประกอบกับการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ซึ่งอาจพบ ฮีมาโตคริตปกติหรือเพิ่มสูงขึ้น เม็ดเลือดขาวปกติหรือต่ำ ตรวจพบ atypical lymphocyte เพิ่มขึ้น เกร็ดเลือดต่ำ อาจพบเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ อาจมีอาการช็อคได้

2. การวินิจฉัยที่แน่นอน ได้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่จำเพาะ(1997b) ซึ่งจำแนกเป็นหมวดใหญ่ๆ ได้เป็น

2.1 การตรวจทางปฏิกริยาน้ำเหลือง (serologic diagnosis) ได้แก่ การตรวจเลือดเพื่อหา dengue specific antibody ด้วยวิธีการมาตรฐานต่างๆ ที่ใช้ในทางคลินิก ได้แก่ hemagglutination inhibition test (HAI), ELISA test, และ immunochromatographic test

2.2 การเพาะแยกเชื้อจากเลือดผู้ป่วย ซึ่งทำได้เฉพาะในสถาบันวิจัยบางแห่งเท่านั้น

2.3 การตรวจทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การทำ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ตรวจหาเชื้อ ซึ่งมักนิยมทำในซีรั่มหรือพลาสมา

2.4 การตรวจวิธีอื่นๆ ซึ่งไม่ใคร่นำมาใช้ในทางคลินิก เช่น การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ ในอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธี immunofluorescence เป็นต้น

ข้อจำกัดของวิธีการวินิจฉัยที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน คือความจำเป็นของการเจาะเลือดผู้ป่วย เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค ซึ่งอาจต้องเจาะมากกว่าหนึ่งครั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรณีการตรวจหาแอนติบอดี ซึ่งจะแปลผลได้แม่นยำขึ้น หากมีการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีสองครั้ง ในช่วงเวลาต่างกัน ในขณะที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวนมาก เป็นผู้ป่วยเด็ก ซึ่งอาจมีปัญหาและอุปสรรคในการเจาะเลือดเพื่อการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวหลายๆ ครั้ง หากสามารถนำสิ่งส่งตรวจอื่นๆ ที่น่าจะได้รับความร่วมมือจากผู้ป่วยมากกว่า มาตรวจวินิจฉัยได้ น่าจะเป็นตัวเลือกที่ดี ที่แพทย์จะพิจารณานำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค สิ่งส่งตรวจที่คณะผู้วิจัยสนใจนำมาศึกษา ได้แก่ ปัสสาวะ และสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) ซึ่งได้แก่ น้ำลาย (saliva)

การศึกษาในการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีในปัสสาวะและสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสได้หลายชนิด ด้วยความไวและความจำเพาะ ที่ไม่แตกต่างจากการตรวจซีรั่มหรือพลาสมา ไม่ว่าจะเป็นการตรวจปัสสาวะหาแอนติบอดีต่อไวรัสเอดส์ (Connell et al., 1993; Hashida et al., 1997; Martinez et al., 1999; Morgado de Moura Machedo et al., 2003; Oelemann et al., 2002; Urnovitz et al., 1999) ไวรัสหัดเยอรมัน (Takahashi et al., 1998; Terada et al., 2000) ไวรัสตับอักเสบเอ(Joshi et al., 2002; Rodriguez Lay Lde et al., 2003) ไวรัสตับอักเสบซี(Constantine et al., 1992; Elsana et al., 1998; Zhang et al., 1994) สำหรับสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) ซึ่งรวมถึงน้ำลาย (saliva) และน้ำคัดหลั่งจากร่องเหงือก (gingivocrevicular หรือ crevicular fluid) ก็สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสได้หลายชนิด นับตั้งแต่ไวรัสเอดส์(Connell et al., 1993; Hashida et al., 1997; Martinez et al., 1999; Morgado de Moura Machedo et al., 2003) ไวรัสหัดเยอรมัน(Vyse et al., 2001) และไวรัสตับอักเสบซี(Elsana et al., 1998; Judd et al., 2003) เป็นต้น ดังที่ได้เสนอตัวอย่างเฉพาะไวรัสที่เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA virus) ที่สำคัญบางชนิด และอ้างอิงเฉพาะการศึกษาบางชิ้นเท่านั้น ก็จะเห็นได้ว่ามีการนำประโยชน์ของปัสสาวะและ oral fluid มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส เป็นจำนวนมาก แต่เป็นที่น่าสนใจว่า สำหรับไวรัสเดงกีแล้ว นอกจากการศึกษา 2-3 ชิ้น ที่พยายามตรวจหาแอนติบอดีในน้ำลายแล้ว(Artimos de Oliveira et al., 1999; Balmaseda et al., 2003; Cuzzubbo et al., 1998) ไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกีใน crevicular fluid นอกจากนั้น การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกีในน้ำลาย ในการศึกษาที่ผ่านมายังมีจุดที่อาจปรับปรุงให้ดีขึ้นอีกได้ เช่น ความไวในการตรวจพบยังไม่ดีนัก (65-80% ในบางรายงาน)(Artimos de Oliveira et al., 1999) หรือใช้ชุดการตรวจสำเร็จรูปทางการค้า ซึ่งอาจมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง(Cuzzubbo et al., 1998) หรือตรวจหา IgM และพบว่ามีปัญหาในเรื่องของความจำเพาะ เนื่องจากสามารถตรวจได้ผลบวกได้ในผู้ที่แข็งแรงดีบางราย(Balmaseda et al., 2003) คณะผู้วิจัย จึงมีความสนใจ ที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ ที่จะนำการตรวจหาแอนติบอดี ในปัสสาวะ น้ำลาย และน้ำคัดหลั่งจากร่องเหงือก มาใช้ช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี

สำหรับการตรวจวินิจฉัย โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) นั้น เป็นที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน ว่าจะมีความไวและความจำเพาะเพียงพอ ที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกีได้หรือไม่ การตรวจ RT-PCR ดังกล่าว แม้จะมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการตรวจด้วยแอนติบอดีโดยทั่วๆ ไป แต่มีข้อได้เปรียบหลายประการดังนี้

1. **สามารถตรวจวินิจฉัยได้ในระยะแรกของโรค** (early diagnosis) เนื่องจากไวรัสปรากฏอยู่ในเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ตลอดจนออกมาในปัสสาวะ ตั้งแต่ระยะไข้ ในขณะที่ร่างกายจะตอบสนอง

ต่อการติดเชื้อ ด้วยการสร้างแอนติบอดี ต้องใช้ระยะเวลาพอควร ซึ่งมักจะเป็นระยะหลังไข้ไปแล้ว จึงจะสามารถวินิจฉัย จากการตรวจหาแอนติบอดีได้ ด้วยความแม่นยำสูง การที่สามารถบอกการวินิจฉัยได้ตั้งแต่วันแรกๆ ของโรค มีประโยชน์ทั้งในแง่ลดความกังวลของผู้ปกครอง กรณีที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสไข้เลือดออก หรือในด้านตรงข้าม หากตรวจพบว่าเป็นไข้เลือดออกตั้งแต่วันแรกๆ จะทำให้สามารถเฝ้าระวังผู้ป่วยเป้าหมาย (target patients) จำนวนน้อยลงอย่างมาก ความคุ้มค่าทั้งในด้านลดความกังวล และในการเฝ้าระวังผู้ป่วยเป้าหมายที่ถูกต้อง น่าจะมีน้ำหนักเพียงพอ ที่จะทำการศึกษาวิจัย ถึงความเป็นไปได้ในการใช้การตรวจดังกล่าว ในการ ดูแลรักษาผู้ป่วย

2. **การตรวจหาแอนติบอดี** เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกีที่แน่นอน มักต้องการการตรวจสองครั้งห่างกันหลายวันหรือเป็นสัปดาห์ ค่าใช้จ่ายทั้งหมด ซึ่งรวมถึงการเสียเวลาของผู้-ป่วยและผู้ปกครอง (ขาดเรียนและขาดงาน) เพื่อมาติดตามการรักษาและเจาะเลือดครั้ง-ที่สอง น่าจะมากกว่าการตรวจด้วย RT-PCR ในวันแรกๆ ของไข้

การนำสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก มาใช้ประโยชน์ในการตรวจด้วย PCR หรือ RT-PCR มีการศึกษาในไวรัสหลายชนิด นับตั้งแต่ไวรัสตับอักเสบซี(Roy et al., 1998) ไวรัสโรคหัด(Nigatu et al., 2001) ไวรัสจีบี (GB virus)(Chen et al., 1997; Eugenia et al., 2001) และไวรัสทีที (TT virus)(Deng et al., 2000) เป็นต้น แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในไวรัสไข้เลือดออก ส่วนการตรวจ PCR หรือ RT-PCR ในปัสสาวะนั้น มีการศึกษาจำนวนมากเช่นกัน เช่น ไวรัสโรคหัด(Rota et al., 1995) ไวรัสจีบี (Eugenia et al., 2001) ไวรัสพิษสุนัขบ้า(Wacharapluesadee and Hemachudha, 2002) ไวรัสตับอักเสบบี(Knutsson and Kidd-Ljunggren, 2000) ไวรัสซีเอ็มวี (CMV)(Blank et al., 2000) เป็นต้น สำหรับไวรัสไข้เลือดออกนั้น กลุ่มคณะผู้วิจัยนี้ เป็นกลุ่มแรกและกลุ่มเดียวในโลกในขณะนี้ ที่ศึกษาการตรวจ RT-PCR ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกี โดยใช้ปัสสาวะ (ดังบทคัดย่อในงานประชุม Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases และ 41st Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America ที่แนบมาด้วย) และพบว่ามีความไวในการตรวจพบประมาณ 80% และความจำเพาะ 100% แม้จะเป็นการตรวจในช่วงท้ายๆ ของระยะไข้ หรือช่วงต้นของระยะหลังไข้แล้ว (ซึ่งโอกาสตรวจพบไวรัสน้อยลงมาก จากการที่ผู้ป่วยเริ่มสร้างแอนติบอดีขึ้นต่อต้านแล้ว) เป็นที่น่าสนใจว่า หากนำปัสสาวะมาตรวจตั้งแต่ระยะไข้วันแรกๆ จะมีความไวสูงขึ้นหรือไม่เพียงใด

ดังนั้น คณะผู้วิจัย จึงมีความสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ ที่จะตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR ตั้งแต่ในระยะไข้ แม้ว่าจะมีผู้ทำการศึกษาการใช้เทคนิคดังกล่าวมาแล้วเป็นจำนวนมากก็ตาม แต่เป็นการศึกษาในเลือดทั้งสิ้น โดยใช้ซีรั่ม/พลาสมาเป็นส่วนใหญ่ และศึกษาใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) บ้าง โดยใช้เทคนิคแตกต่างกันไป ไม่ว่าจะเป็น single-step PCR(De Paula et al., 2001; Harris et al., 1998; Henchal et al., 1991; Seah et al.,

1995; Sudiro et al., 1997) nested PCR(De Paula et al., 2002; Lanciotti et al., 1992; Meiyu et al., 1997; ter Meulen et al., 2000; Yenchitsomanus et al., 1996) การหา 'viral load' ด้วย quantitative RT-PCR(Murgue et al., 2000; Sudiro et al., 2001; Wang et al., 2000) real-time PCR(Callahan et al., 2001; Chen et al., 2001; Houng et al., 2000; Houng et al., 2001; Laue et al., 1999; Warrilow et al., 2002) หรือ NASBA (nucleic acid sequence-based analysis)(Wu et al., 2001) สิ่งที่คณะผู้วิจัยต้องการศึกษา คือความเป็นไปได้ที่จะใช้ปัสสาวะ และสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) มาตรวจด้วยวิธี RT-PCR เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกี ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก และหลีกเลี่ยงการเจาะเลือดเพื่อการวินิจฉัย

วิธีการวิจัย (Procedure)

ผู้ป่วยที่มีอาการไข้เฉียบพลัน ที่เข้ารับการตรวจรักษาในแผนกกุมารเวชศาสตร์ และแผนกอายุรศาสตร์ ทั้งแผนกผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยที่ไม่มีอาการและอาการแสดงจำเพาะของอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง หรือญาติของผู้ป่วย (ในกรณีผู้ป่วยเด็ก) จะได้รับคำชี้แจงและคำอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัยโครงการนี้ หากผู้ป่วยและ/หรือญาติ ได้ซักถามจนเข้าใจ และยินยอมเข้าร่วมในการวิจัยแล้ว ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการ MAC-ELISA ในซีรั่มหรือพลาสมา ทั้งในระยะไข้ (acute phase) และในระยะหลังไข้ (convalescent phase) เพื่อตรวจยืนยันการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี(1997b; Innis et al., 1989) ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่ได้ติดเชื้อไวรัสเดงกีเฉียบพลันจะตกอยู่ในกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) สิ่งส่งตรวจคือน้ำลายและปัสสาวะ จากผู้ป่วยที่เข้ารับการศึกษา ถูกนำมาตรวจหาแอนติบอดี และ RT-PCR ตรวจหาเชื้อและทำการตรวจเฉพาะ RT-PCR ใน buccal brush specimen โดยแบ่งเป็น acute specimen คือสิ่งส่งตรวจที่ได้ในระยะไข้ และ convalescent specimen คือสิ่งส่งตรวจจากระยะหลังไข้แล้ว โดยนัดผู้ป่วยมาติดตามผลการรักษาที่ 1-2 สัปดาห์หลังไข้ สิ่งคัดหลั่งในช่องปากและปัสสาวะ จากกลุ่มควบคุมผลลบที่กล่าวแล้ว จะทำหน้าที่ตรวจสอบความจำเพาะของการตรวจหาแอนติบอดีในการศึกษานี้ ซึ่งจากประสบการณ์การทำวิจัยในผู้ป่วยติดเชื้อเดงกี ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย พบว่าผู้ป่วยที่รับเข้าในโครงการวิจัย จะเป็นผู้ป่วยติดเชื้อเดงกีจริงประมาณ 80% ผู้ป่วยกลุ่มที่เหลือ จะทำหน้าที่เป็นกลุ่มควบคุมผลลบดังกล่าว สำหรับ ผู้ป่วยติดเชื้อเดงกี จะได้รับการแยกประเภทออกเป็น DF และ DHF ตาม WHO criteria(1997a) และแยกออกเป็น primary หรือ secondary infection ตามผลตรวจ MAC-ELISA ในเลือด(1997b; Innis et al., 1989)

จำนวนของผู้ป่วยทั้งหมด ที่คาดว่าต้องใช้เข้าร่วมในโครงการ คาดประมาณจาก<u>ความไวของวิธีการตรวจ ที่จะทำการศึกษา</u> โดยใช้ข้อมูลจากการศึกษานำร่อง ของการตรวจหาแอนติบอดีเป็นแนวทาง ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยติดเชื้อเดงกี 10 ราย และผู้ป่วยไข้เฉียบพลันจากสาเหตุอื่น 10 ราย สามารถตรวจพบแอนติบอดีในสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก 9 ราย และในปัสสาวะทั้ง 10 ราย และตรวจไม่พบแอนติบอดีในผู้ป่วยไข้เฉียบพลันอื่นเลย ไม่ว่าจะเป็นในสิ่งส่งตรวจชนิดใด คณะผู้วิจัย ตั้งสมมติฐานว่า ความไวของการตรวจหาแอนติบอดีในปัสสาวะและสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก ควรจะได้ในช่วงประมาณ 95 $\pm$ 4% และความจำเพาะ 100%

precision ของ 95% confidence interval โดยใช้เกณฑ์ 95% CI $\pm$ 2 S.E.M.[1] ซึ่งคำนวณจากสูตร

1 S.E.M = $\sqrt{P(1-P)/N}$ โดยที่

P = ความไวของการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่จะนำมาศึกษา

N = จำนวนสิ่งส่งตรวจ

จากข้อมูลการศึกษานำร่องดังกล่าว หากกำหนด P = 0.95 และ 1 S.E.M. = 0.02 (ซึ่งจะได้ 95% confidence interval ของความไวของการตรวจเป็น 95 $\pm$ 4 %) จะคำนวณได้จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 120 ราย แต่เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องงบประมาณการวิจัย (การตัดลดงบประมาณของทุนวิจัย และการเสาะหาแหล่งทุนวิจัยอื่นเพิ่มเติมยังรอผลการพิจารณา) คณะผู้วิจัยจึงปรับแผนการวิจัยของโครงการนี้ เป็นการวิจัยนำร่อง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ 'non-blood specimens' ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี เพื่อนำผลการวิจัยไปเสนอในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ และส่งพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารการแพทย์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขอรับทุนวิจัยสนับสนุนการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นต่อไป

---

[1] Standard error of means

ผลการวิจัย (Results)

เนื่องจากข้อจำกัดในการรวบรวมสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ และการนัดผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยมารับการตรวจรักษาต่อเนื่อง หลังการจำหน่ายออกจากโรงพยาบาล เพื่อดูแลรักษาและเก็บรวบรวมสิ่งส่งตรวจครั้งสุดท้าย ไม่สามารถทำได้ครบถ้วน 100% ในผู้ป่วยทุกราย ประกอบกับปริมาณของสิ่งส่งตรวจที่รวบรวมได้ในผู้ป่วยแต่ละครั้งไม่เท่ากัน จึงทำให้จำนวนของสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ ที่นำมาศึกษาด้วยวิธีต่างๆ มีอยู่แตกต่างกัน

1. **การตรวจด้วยวิธี RT-PCR** เพื่อตรวจหาไวรัสเดงกีใน buccal brush, น้ำลาย, และปัสสาวะ
   1.1 การตรวจในน้ำลายและ buccal mucosal specimens ได้ผลการศึกษาดังในตารางที่ ๑

Methods / Specimens	**Sensitivity**	**Specificity**	**Positive predictive value**	**Negative predictive value**
RT-PCR using saliva	7/22 cases 31.82%	0/16 cases 100.00%	7/7 cases 100.00%	16/31 cases 51.61%
RT-PCR using buccal mucosal cells	7/21 cases 33.33%	0/14 cases 100.00%	7/7 cases 100.00%	14/28 cases 50.00%
RT-PCR using saliva and buccal cells	11/21 cases 52.38%	0/14 cases 100.00%	11/11 cases 100.00%	14/24 cases 58.33%

ตารางที่ ๑ ผลการศึกษาการตรวจหาไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ saliva และ buccal mucosal cells (buccal brush)

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า วิธี RT-PCR มีความเชื่อถือได้สูงมาก ในส่วนของ positive predictive value (PPV) กล่าวคือ หากการทดสอบได้ผลบวก ผู้ป่วยรายนั้นมีโอกาสสูงมาก ที่จะป่วยด้วยการติดเชื้อจากเดงกีไวรัสเฉียบพลัน อย่างไรก็ตาม ความไวของการทดสอบยังไม่ดีนัก กล่าวคือ ผู้ป่วยประมาณหนึ่งในสามเท่านั้น ที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธีนี้ หากใช้สิ่งส่งตรวจอย่างใดอย่างหนึ่งระหว่างน้ำลาย (saliva) หรือ buccal brush แต่หากพิจารณาผลบวกจากสิ่งส่งตรวจ 2 ชนิดร่วมกัน พบว่าสามารถวินิจฉัยครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยไข้เดงกีเฉียบพลันได้ โดยที่ความจำเพาะของการตรวจยังคงเป็น 100% เช่นเดิม

1.2 การตรวจในปัสสาวะ ได้ผลดังในตารางที่ ๒

Methods / Specimens	Sensitivity (cases/%)	Specificity (cases/%)	PPV (cases/%)	NPV (cases/%)
RT-PCR using urine - febrile	10/13 (76.9%)	0/18 (100%)	10/10 (100%)	18/21 (85.7%)
RT-PCR using urine – postfebrile	30/35 85.7%	0/18 100.00%	30/30 cases 100.00%	18/23 cases 78.3%

ตารางที่ ๒ ผลการศึกษาการตรวจหาไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ปัสสาวะ (urine) โดยแบ่งออกเป็นสิ่งส่งตรวจในระยะไข้ และสิ่งส่งตรวจในระยะหลังไข้

ผลการตรวจพบว่า ความไวในการตรวจพบไวรัสในปัสสาวะในผู้ป่วยเดงกี ดีกว่าการตรวจโดยใช้น้ำลายหรือ buccal brush โดยมีความไวใกล้เคียงกับ 80% ทั้งในระยะไข้และระยะหลังไข้ โดยที่ความจำเพาะอยู่ที่ 100% ทั้งสองกรณี

2. การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากการศึกษาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่า ด้วยเทคนิคการตรวจด้วยวิธี ELISA ที่คณะผู้วิจัยใช้ในปัจจุบัน ยังไม่สามารถตรวจพบ dengue specific IgM ได้ดีนัก ยังต้องการการปรับปรุงทางเทคนิคในอนาคต ในขณะนี้ คณะผู้วิจัยจึงมุ่งความสนใจมาที่ dengue specific IgG ซึ่งสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อเดงกีชาวไทยที่มาเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลในปัจจุบันนั้น พบว่าเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำ (secondary/tertiary/quarternary infections) แทบทั้งสิ้น (80-90% ของผู้ป่วยเด็ก และเกือบ 100% ของผู้ป่วยผู้ใหญ่) การใช้ dengue specific IgG มาช่วยในการวินิจฉัย จึงได้ประโยชน์มากในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ดังแสดงในตารางที่ ๓

2.1 การตรวจในน้ำลาย ได้ผลดังในตารางที่ ๓

Methods / Specimens	Sensitivity (cases/%)	Specificity (cases/%)	PPV (cases/%)	NPV (cases/%)
ELISA using saliva	23/23 (100%)	0/16 (100%)	23/23 (100%)	16/16 (100%)

ตารางที่ ๓ ผลการศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกีด้วยวิธี ELISA โดยใช้น้ำลาย (saliva)

จากผลการตรวจพบว่า การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ในน้ำลาย สามารถใช้วินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้ดี ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำ (ซึ่งผู้ป่วยไทยเกือบทั้งหมดเป็นลักษณะนี้) หากใช้สิ่งส่งตรวจที่เก็บในผู้ป่วยที่มีไข้ในวันท้ายๆ และ/หรือในระยะหลังไข้

2.2 การตรวจในปัสสาวะ ได้ผลดังในตารางที่ ๔

Methods / Specimens	Sensitivity (cases/%)	Specificity (cases/%)	PPV (cases/%)	NPV (cases/%)
ELISA using urine – febrile	22/33 (66.7%)	0/16 (100%)	22/22 (100%)	16/27 (59.3%)
ELISA using urine – postfebrile	35/35 100%	0/16 100.00%	35/35 cases 100.00%	16/16 cases 100%

ตารางที่ ๔ ผลการศึกษาการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกีด้วยวิธี ELISA โดยใช้ปัสสาวะ (urine) โดยแบ่งออกเป็นสิ่งส่งตรวจในระยะไข้ และสิ่งส่งตรวจในระยะหลังไข้

ในลักษณะที่คล้ายคลึงกับการตรวจ ELISA ในน้ำลาย การตรวจในปัสสาวะมีความไวที่สูงเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับสิ่งส่งตรวจที่เก็บในระยะหลังไข้แล้ว พบว่ามีความไวและความจำเพาะ 100%

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

การใช้สิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือด มาช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อ เป็นที่สนใจในการทำการศึกษาวิจัยสำหรับจุลชีพหลายชนิด รวมทั้งไวรัส และได้รับการพัฒนาจนได้รับการยอมรับในทางคลินิกในหลายกรณี อาทิเช่น การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเอดส์ ในสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก ซึ่งมีการพัฒนาชุดการตรวจสำเร็จรูป ที่ตรวจได้ง่าย สะดวก และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (Wright and Katz, 2006) สำหรับการติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น เนื่องจากเป็นการติดเชื้อที่พบได้มากทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ และอาการเจ็บป่วยในเด็กนั้น อาจรุนแรงมากในบางราย จนถึงกับเกิดอาการเลือดออกรุนแรง หรือ ช็อก หรือเสียชีวิตได้ ทำให้เกิดความกังวลสำหรับผู้ป่วยและญาติได้อย่างมาก การตรวจวินิจฉัยโรคได้ถูกต้องแม่นยำ ด้วยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส ได้ตั้งแต่ก่อนที่ผู้ป่วยจะสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสในระยะหลังของโรค จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจ เมื่อนำมาบวกกับความเป็นไปได้ที่จะใช้วิธีการดังกล่าว ในสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือด (ผู้ป่วยจึงไม่ต้องเจ็บตัวจากการเจาะเลือด) จึงเป็นสิ่งที่สมควรได้รับการศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ ผลการศึกษาจากโครงการนี้แสดงให้เห็นว่า การทำการขยายสารพันธุกรรม RNA ของไวรัสเดงกี ด้วยวิธี RT-PCR สามารถนำมาใช้วินิจฉัยการติดเชื้อได้ในผู้ป่วยจำนวนมาก ด้วยการใช้ปัสสาวะและ/หรือสิ่งคัดหลั่งในช่องปากของผู้ป่วย ที่เก็บในระยะไข้

นอกจากนั้น เมื่อทำการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ร่วมด้วย ก็พบว่า ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection or later) สูงมาก กล่าวคือ 100% เท่าๆ กับการตรวจด้วยวิธีเดียวกันในเลือด อนึ่ง การติดเชื้อเดงกีในผู้ป่วยไทยที่มีอาการทางคลินิกมาพบแพทย์นั้น เป็นการติดเชื้อซ้ำเป็นส่วนใหญ่ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ การตรวจดังกล่าว จึงได้ประโยชน์มาก แม้จะมีข้อจำกัดอยู่ที่ ความจำเป็นที่ต้องใช้สิ่งส่งตรวจครั้งที่สอง (convalescent specimen) ในระยะหลังไข้แล้ว ในผู้ป่วยจำนวนมากก็ตาม

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษานำร่อง (จำกัดด้วยงบประมาณและระยะเวลาการทำวิจัย) จึงเพียงสามารถบอกได้ว่า เทคนิคทั้งสองวิธี คือ RT-PCR และ ELISA ที่นำมาศึกษา มีความน่าสนใจมากที่สมควรจะนำมาศึกษาต่อ เพื่อพัฒนาศักยภาพในการนำมาใช้สอย ทั้งในทางคลินิก ระบาดวิทยา และการวิจัยในอนาคต ข้อจำกัดของการศึกษานำร่องนี้ มีหลายประการคือ

1. **การพัฒนาเทคนิคการตรวจ** จากผลการวิจัย จะเห็นได้ว่า แม้การตรวจหา dengue-specific IgG ในน้ำลายและปัสสาวะ ได้ผลดีมาก แต่ในอนาคตหากสามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจ dengue IgM ในสิ่งส่งตรวจดังกล่าว ให้ได้ความไวและความจำเพาะที่ดี จะทำให้เกิดประโยชน์ทั้งในการวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อครั้งแรก (primary infection) และใช้ประกอบการวินิจฉัยการติดเชื้อซ้ำได้ด้วย

และสำหรับเทคนิค RT-PCR นั้น ยังสามารถปรับปรุงรายละเอียดการตรวจ ให้มีความไวเพิ่มขึ้น ในขณะที่ยังคงความจำเพาะไว้ได้เช่นกัน

2. **การศึกษาสิ่งส่งตรวจในช่วงเวลาแรกๆ ของระยะไข้** เนื่องจากการศึกษานำร่องนี้ เป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่รับไว้รักษาเป็นผู้ป่วยใน ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งมักจะพิจารณารับผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีเฉียบพลัน เมื่อผู้ป่วยอยู่ในระยะหลังๆ ของไข้ เนื่องจากความจำกัดของจำนวนเตียงนั้น ทำให้การเก็บสิ่งส่งตรวจที่ได้ เป็นสิ่งส่งตรวจในวันท้ายๆ ของระยะไข้ หรือวันแรกๆ ของระยะหลังไข้ (late specimens) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอาจทำให้โอกาสตรวจพบผลบวกของแอนติบอดีมากขึ้น แต่ผลบวกของการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR น้อยลง เป็นไปได้ว่า หากสามารถเก็บสิ่งส่งตรวจในวันแรกๆ ของระยะไข้ จะทำให้โอกาสได้ผลบวกจาก RT-PCR เพิ่มขึ้น

3. **การประสานผลการตรวจ RT-PCR และ ELISA** เนื่องจากข้อจำกัดหลายประการ ระหว่างการศึกษาวิจัย ทำให้การศึกษาสิ่งส่งตรวจสองประเภท คือ น้ำลายและปัสสาวะนั้น ไม่ได้กระทำในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกันทั้งหมด ทำให้เป็นการยากที่จะวิเคราะห์ในขณะนี้ว่า หากนำผลการตรวจ RT-PCR ทั้งในปัสสาวะ น้ำลาย และ buccal brush ในผู้ป่วยรายเดียวกันมารวมกัน จะทำให้ความไวและความจำเพาะของการตรวจ RT-PCR เปลี่ยนแปลงไปอย่างไรบ้าง การศึกษาในลำดับถัดไป ร่วมกับการปรับปรุงวิธีการตรวจ และระยะเวลาของสิ่งส่งตรวจ ดังกล่าวข้างต้น น่าจะทำให้ผลความถูกต้องแม่นยำของการตรวจเพิ่มมากขึ้นได้อีก

ข้อสรุป (Conclusions)

การศึกษาวิจัยชิ้นนี้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือด ในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยตรวจได้ทั้ง RT-PCR หาไวรัส และ ELISA ตรวจหาแอนติบอดี จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้น ที่สามารถนำมาพัฒนา ปรับปรุงรายละเอียดวิธีการต่อ เพื่อเพิ่มศักยภาพและปรับปรุงจนเข้าสู่จุดของ cost-effectiveness ในการนำมาใช้จริงในทางคลินิก และทางระบาดวิทยา

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต (Suggestions for Further Work)

1. **ทำการศึกษาวิจัยในกลุ่มผู้ป่วยจำนวนมากขึ้น** เพื่อเป็นการตรวจสอบยืนยันผลการศึกษานำร่องที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้ และเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการคลินิก และในทางระบาดวิทยาต่อไป

2. **ปรับปรุงเทคนิควิธีการทางห้องปฏิบัติการ** เพื่อพัฒนาความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของการตรวจให้ดียิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มพูนโอกาสที่การตรวจต่างๆ ดังกล่าว จะถูกพิจารณานำมาใช้ได้จริง

ส่วนอ้างอิง (References)

(1997a). Clinical Diagnosis, In Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, treatment, prevention, and control, W. H. Organization, ed. (Geneva), pp. 12-23.

(1997b). Laboratory Diagnosis, In Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, treatment, prevention, and control, W. H. Organization, ed. (Geneva), pp. 34-47.

Artimos de Oliveira, S., Rodrigues, C. V., Camacho, L. A., Miagostovich, M. P., Araujo, E. S., and Nogueira, R. M. (1999). Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. J Virol Methods *77*, 81-86.

Balmaseda, A., Guzman, M. G., Hammond, S., Robleto, G., Flores, C., Tellez, Y., Videa, E., Saborio, S., Perez, L., Sandoval, E., *et al.* (2003). Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. Clin Diagn Lab Immunol *10*, 317-322.

Blank, B. S., Meenhorst, P. L., Mulder, J. W., Weverling, G. J., Putter, H., Pauw, W., van Dijk, W. C., Smits, P., Lie, A. L. S., Reiss, P., and Lange, J. M. (2000). Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol *38*, 563-569.

Callahan, J. D., Wu, S. J., Dion-Schultz, A., Mangold, B. E., Peruski, L. F., Watts, D. M., Porter, K. R., Murphy, G. R., Suharyono, W., King, C. C., *et al.* (2001). Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. J Clin Microbiol *39*, 4119-4124.

Chen, M., Sonnerborg, A., Johansson, B., and Sallberg, M. (1997). Detection of hepatitis G virus (GB virus C) RNA in human saliva. J Clin Microbiol *35*, 973-975.

Chen, R. F., Yeh, W. T., Yang, M. Y., and Yang, K. D. (2001). A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. FEMS Immunol Med Microbiol *30*, 1-7.

Connell, J. A., Parry, J. V., Mortimer, P. P., and Duncan, J. (1993). Novel assay for the detection of immunoglobulin G antihuman immunodeficiency virus in untreated saliva and urine. J Med Virol *41*, 159-164.

Constantine, N. T., Zhang, X., Li, L., and Smialek, J. E. (1992). Detection of antibodies to hepatitis C virus in urine. Lancet *339*, 1607-1608.

Cuzzubbo, A. J., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Suntayakorn, S., Aaskov, J., and Devine, P. L. (1998). Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. J Clin Microbiol *36*, 3737-3739.

De Paula, S. O., Lima, D. M., and da Fonseca, B. A. (2002). Detection and identification of dengue-1 virus in clinical samples by a nested-PCR followed by restriction enzyme digestion of amplicons. J Med Virol *66*, 529-534.

De Paula, S. O., Nunes, C., Matos, R., de Oliveira, Z. M., Lima, D. M., and da Fonseca, B. A. (2001). Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation- negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. J Virol Methods *98*, 119-125.

Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., and Akahane, Y. (2000). Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. J Med Virol *62*, 531-537.

Elsana, S., Sikuler, E., Yaari, A., Shemer-Avni, Y., Abu-Shakra, M., Buskila, D., Katzman, P., Naggan, L., and Margalith, M. (1998). HCV antibodies in saliva and urine. J Med Virol *55*, 24-27.

Eugenia, Q. R., Ana, Q. R., and Carmen, M. (2001). Investigation of saliva, faeces, urine or semen samples for the presence of GBV-C RNA. Eur J Epidemiol *17*, 271-274.

Harris, E., Roberts, T. G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L. D., Valle, S., Sandoval, E., and Balmaseda, A. (1998). Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single- tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol *36*, 2634-2639.

Hashida, S., Hashinaka, K., Ishikawa, S., and Ishikawa, E. (1997). More reliable diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by detection of antibody IgGs to pol and gag proteins of HIV-1 and p24 antigen of HIV-1 in urine, saliva, and/or serum with highly sensitive and specific enzyme immunoassay (immune complex transfer enzyme immunoassay): a review. J Clin Lab Anal *11*, 267-286.

Henchal, E. A., Polo, S. L., Vorndam, V., Yaemsiri, C., Innis, B. L., and Hoke, C. H. (1991). 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 *45*, 418-428.

Houng, H. H., Hritz, D., and Kanesa-thasan, N. (2000). Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. J Virol Methods *86*, 1-11.

Houng, H. S., Chung-Ming Chen, R., Vaughn, D. W., and Kanesa-thasan, N. (2001). Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. J Virol Methods *95*, 19-32.

Innis, B. L., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P., and Hoke, C. H. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg *40*, 418-427.

Joshi, M. S., Chitambar, S. D., Arankalle, V. A., and Chadha, M. S. (2002). Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis a. Clin Diagn Lab Immunol *9*, 840-845.

Judd, A., Parry, J., Hickman, M., McDonald, T., Jordan, L., Lewis, K., Contreras, M., Dusheiko, G., Foster, G., Gill, N., *et al.* (2003). Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. J Med Virol *71*, 49-55.

Knutsson, M., and Kidd-Ljunggren, K. (2000). Urine from chronic hepatitis B virus carriers: implications for infectivity. J Med Virol *60*, 17-20.

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., and Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol *30*, 545-551.

Laue, T., Emmerich, P., and Schmitz, H. (1999). Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. J Clin Microbiol *37*, 2543-2547.

Martinez, P. M., Torres, A. R., Ortiz de Lejarazu, R., Montoya, A., Martin, J. F., and Eiros, J. M. (1999). Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingival-crevicular transudate, and urine samples. J Clin Microbiol *37*, 1100-1106.

Meiyu, F., Huosheng, C., Cuihua, C., Xiaodong, T., Lianhua, J., Yifei, P., Weijun, C., and Huiyu, G. (1997). Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. Microbiol Immunol *41*, 209-213.

Morgado de Moura Machedo, J. E., Kayita, J., Bakaki, P., Coulter, J. B., Ndugwa, C. M., Tindyebwa, D., and Hart, C. A. (2003). IgA antibodies to human immunodeficiency virus in serum, saliva and urine for early diagnosis of immunodeficiency virus infection in Ugandan infants. Pediatr Infect Dis J *22*, 193-195.

Murgue, B., Roche, C., Chungue, E., and Deparis, X. (2000). Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. J Med Virol *60*, 432-438.

Nigatu, W., Jin, L., Cohen, B. J., Nokes, D. J., Etana, M., Cutts, F. T., and Brown, D. W. (2001). Measles virus strains circulating in Ethiopia in 1998-1999: molecular characterisation using oral fluid samples and identification of a new genotype. J Med Virol *65*, 373-380.

Oelemann, W. M., Lowndes, C. M., Verissimo Da Costa, G. C., Morgado, M. G., Castello-Branco, L. R., Grinsztejn, B., Alary, M., and Bastos, F. I. (2002). Diagnostic detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in urine: a brazilian study. J Clin Microbiol *40*, 881-885.

Rodriguez Lay Lde, L., Larralde Diaz, O., Martinez Casanueva, R., and Gutierrez Moreno, A. (2003). Anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in urine samples for rapid diagnosis of outbreaks. Clin Diagn Lab Immunol *10*, 492-494.

Rota, P. A., Khan, A. S., Durigon, E., Yuran, T., Villamarzo, Y. S., and Bellini, W. J. (1995). Detection of measles virus RNA in urine specimens from vaccine recipients. J Clin Microbiol *33*, 2485-2488.

Roy, K. M., Bagg, J., McCarron, B., Good, T., Cameron, S., and Pithie, A. (1998). Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. J Med Virol *54*, 271-275.

Seah, C. L., Chow, V. T., Tan, H. C., and Can, Y. C. (1995). Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. J Virol Methods *51*, 193-200.

Sudiro, T. M., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Rothman, A. L., Raengsakulrach, B., Janus, J., Kurane, I., and Ennis, F. A. (1997). Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. Am J Trop Med Hyg *56*, 424-429.

Sudiro, T. M., Zivny, J., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Nisalak, A., Norman, J. E., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (2001). Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. J Med Virol *63*, 29-34.

Takahashi, S., Machikawa, F., Noda, A., Oda, T., and Tachikawa, T. (1998). Detection of immunoglobulin G and A antibodies to rubella virus in urine and antibody responses to vaccine-induced infection. Clin Diagn Lab Immunol *5*, 24-27.

ter Meulen, J., Grau, M., Lenz, O., Emmerich, P., Schmitz, H., Oh, F., Jaspert, R., and Niedrig, M. (2000). Isolation and partial characterization of dengue virus type 2 and 4

strains from dengue fever and dengue haemorrhagic fever patients from Mindanao, Republic of the Philippines. Trop Med Int Health *5*, 325-329.

Terada, K., Niizuma, T., Kataoka, N., and Niitani, Y. (2000). Testing for rubella-specific IgG antibody in urine. Pediatr Infect Dis J *19*, 104-108.

Urnovitz, H. B., Sturge, J. C., Gottfried, T. D., and Murphy, W. H. (1999). Urine antibody tests: new insights into the dynamics of HIV-1 infection. Clin Chem *45*, 1602-1613.

Vyse, A. J., Cohen, B. J., and Ramsay, M. E. (2001). A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children. Public Health *115*, 201-207.

Wacharapluesadee, S., and Hemachudha, T. (2002). Urine samples for rabies RNA detection in the diagnosis of rabies in humans. Clin Infect Dis *34*, 874-875.

Wang, W. K., Lee, C. N., Kao, C. L., Lin, Y. L., and King, C. C. (2000). Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. J Clin Microbiol *38*, 3306-3310.

Warrilow, D., Northill, J. A., Pyke, A., and Smith, G. A. (2002). Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. J Med Virol *66*, 524-528.

Wright, A. A., and Katz, I. T. (2006). Home testing for HIV. N Engl J Med *354*, 437-440.

Wu, S. J., Lee, E. M., Putvatana, R., Shurtliff, R. N., Porter, K. R., Suharyono, W., Watts, D. M., King, C. C., Murphy, G. S., Hayes, C. G., and Romano, J. W. (2001). Detection of dengue viral rna using a nucleic acid sequence-based amplification assay. J Clin Microbiol *39*, 2794-2798.

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

Zhang, X., Constantine, N. T., Li, L., Abdel-Hamid, M., Bansal, J., and Smialek, J. E. (1994). Application of commercial assays to detect IgG antibodies to hepatitis C virus in urine: a pilot study from autopsy cases. J Med Virol *44*, 187-191.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

Bronnert J, Malhotra C, Suavansri K, Hanvesakul R, **Kulwichit W**, Wilde H. Complete Ptosis Caused by Dengue Fever. *Lancet* 2005; 366: 1982.

Impact factor 2004 = 21.7

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)**

สกว. ได้จัดงานแถลงข่าวสื่อมวลชนประจำปี เมื่อพฤษภาคม 2548 โดยโครงการวิจัยนี้ เป็นหนึ่งในแปดโครงการที่ได้รับการคัดเลือกให้เสนอต่อสื่อมวลชน โดยได้รับการตีพิมพ์และออกอากาศอย่างแพร่หลาย และมีสถานีวิทยุและโทรทัศน์หลายแห่ง มาติดต่อขอให้ออกอากาศประชาสัมพันธ์เพิ่มเติม ทั้งเป็นรายการสดและบันทึกเทป นับว่าได้รับความสนใจในวงกว้างพอสมควร

- **เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)**

จากงานวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าเกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับ dengue diagnostics มากขึ้นอย่างมาก ทำให้มีการพัฒนารูปแบบของการสอนในหัวข้อดังกล่าว ต่อนิสิตแพทย์ แพทย์ประจำบ้าน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด นิสิตปริญญาโท และนิสิตปริญญาเอกที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยนำร่อง ได้ถูกนำไปเสนอในที่ประชุมวิชาการนานาชาติหลายครั้ง ผลงานหลายชิ้นได้รับรางวัลจากองค์กรในยุโรป ให้ยกเว้นค่าลงทะเบียนการประชุมเป็นกรณีพิเศษ (ดังรายละเอียดข้างล่าง)

แพทย์ประจำบ้าน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด และนิสิตปริญญาโท ที่สำเร็จการศึกษาจากงานวิทยานิพนธ์ที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้ มีดังนี้

-นพ.ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม จากงานวิจัยนำร่อง การตรวจวินิจฉัยโดยใช้หยดเลือดบนกระดาษกรอง (แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ ปี 2547)

-นพ.จักรพันธุ์ ภู่ไพบูลย์ จากงานวิจัยนำร่อง การตรวจวินิจฉัยโดยใช้หยดปัสสาวะบนกระดาษกรอง (แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ ปี 2547)

-นพ.พรเทพ สวนดอก จากงานวิจัยนำร่อง การตรวจวินิจฉัยโดยใช้ saliva (แพทย์ประจำบ้านต่อยอด กุมารเวชศาสตร์โรคติดเชื้อ ปี 2547)

-นพ.โอพาร พรหมาลิขิต จากงานวิจัยนำร่อง การตรวจวินิจฉัยโดยใช้ urine (แพทย์ประจำบ้านต่อยอด กุมารเวชศาสตร์โรคติดเชื้อ ปี 2547)

-นพ.จักรพันธุ์ ภู่ไพบูลย์ (แพทย์ประจำบ้านต่อยอด อายุรศาสตร์โรคติดเชื้อ และนิสิตปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2549)

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ สำหรับผลงานจากโครงการวิจัยนี้ มีดังนี้

3.1 **Kulwichit W***, Mekmullica J, Krajiw S, Prommalikit O, Yapom R, Intaraprasong P, Arunyingmongkol, Suandork P, Sittichai R, Sakdikul S, Mutirangura A, Pancharoen C, Thisyakorn U, and Nisalak A. Highly-sensitive Virologic Diagnosis of Dengue Infection by A Newly-Developed Protocol of Reverse Transcription-Nested Polymerase Chain Reaction (RT-nested PCR) of Serum/Plasma, Peripheral Blood Leukocyte (PBL), and Urine Specimens. The 41st Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. San Diego, CA, USA. October 9-12, 2003.

* = principal investigator

3.2 Suandork P, **Kulwichit W***, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Prommalikit O, Pancharoen C, Nisalak A, Thisyakorn U. Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin in Oral Fluid. 11th International Congress on Infectious Diseases. Cancun, Mexico. March 4-7, 2004.

* = principal investigator

3.3 Prommalikit O, **Kulwichit W***, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Suandork P, Pupaibool J, Jaimchariyatam N, Pancharoen C, Nisalak A, Thisyakorn U. Detection of Urinary Antibody as a Tool for Diagnosis of Dengue Infection. 11th International Congress on Infectious Diseases. Cancun, Mexico. March 4-7, 2004.

* = principal investigator

3.4 Pupaibool J, Jaimchariyatam N, Suandork P, Prommalikit O, Sittichai R, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-nested polymerase chain reaction from dried urine spots on filter paper. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. April 2-5, 2005.
* = principal investigator

3.5 Jaimchariyatam N, Pupaibool J, Krajiw S, Arungyingmongkol K, Suandork P, Prommalikit O, Sittichai R, Nisalak A, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay using whole blood stored on filter paper. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. April 2-5, 2005. **(oral presentation = scored at top 7% of approx. 2,400 submitted abstracts)**
* = principal investigator
ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Awards 2005 – Free registration for selected high-quality abstracts

3.6 Pupaibool J, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Nisalak A, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction from oral specimens. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice, France. April 1-4, 2006.
* = principal investigator
ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Awards 2006 – Free registration for selected high-quality abstracts

mixed cell lines are used for rapid identification of RV. During winter, duration of patient isolation is based on RV detection by cell culture. Failure to detect RV may lead to nosocomial infections due to early termination of isolation. Typically, SVC for RV are examined at days 2-3 and at 5-10. Information regarding optimum time for rapid RV detection using SVC is minimal. Our goal was to determine whether SVC with fluorescent antibody staining (FAS) was sensitive to detect ≥95% of detectable RV by day 2 of incubation. The viral culture logs of the Children's Hospital Microbiology Dept. of 3 winters, 2000-2003, were searched to identify RV detected by SVC from nasopharyngeal aspirates of children. Hep 2 and R-mix (mink lung and A 549) (Diagnostic Hybrids Inc. Athens, OH) cell lines with FAS (Bartels/Trinity Biotech, Co Wicklow, Ireland) were used to detect influenza (flu) A, and B, respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus (adeno), parainfluenza (para) 1, 2, 3, and 4 at 2 or 5 days post inoculation. 606 RV were identified during the study period: RSV-193, flu B-109, flu A-102, adeno-69, para3-66, para2-30, para1-29, para4-8. 503 (83%) of isolates were detected on day 2. The yield was consistent for each of the 3 yrs. The remaining 103 (17%) RV were detected on day 5: 39 RSV, 22 flu A, 15 flu B, 13 adeno, 6 para2, 4 para1, 3 para3 and 1 para4. This study demonstrates that SVC with FAS at day 2 failed to detect approximately 20% of all RSV, flu A, adeno, and para3 isolates. Also, approximately 14% of all isolates of flu B, para1 and 4 were undetected by day 2. Studies are needed to determine if RV detection with FAS of SVC at days 3 or 4 can increase detection to ≥95%.

342 Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Adenovirus in Patient Specimens

JIANGUO WU, PhD, CHARLES LE, NIKKI FREED, ANTHONY HAWKSWORTH, MARGARET RYAN and KEVIN RUSSELL, Naval Health Research Ctr., San Diego, CA

Background: Adenoviruses are endemic in the human population, which cause acute infections in respiratory epithelia. Severe systemic infections can also occur, especially in patients with underlying chronic disease. In the United States military, adenovirus serotypes 4 and 7 have been responsible for significant respiratory morbidity, especially in recruits. Surveillance for adenoviral illness has involved culture, neutralization assays, and restriction-enzyme analyses – all of which are labor-intensive. **Methods:** To address the inherent problems associated with classic adenovirus identification and typing methods, we used a rapid and specific multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay to identify adenoviruses in original samples from patients with febrile respiratory illness. Adenovirus strains (3, 4, 7, and 21) from the American Type Culture Collection were used to confirm specificity of the method. Clinical samples, with positive culture confirmation for serotypes 3, 4, 7, and 21, along with several infected tissue culture fluid samples were also tested. 7 original specimens from a recent outbreak at a military training center were tested by this assay. **Results:** Our multiplex PCR successfully identified adenovirus serotypes 3, 4, 7, and 21. The multiplex also identified a recent outbreak of illness as being due to adenovirus serotype 4. **Conclusion:** This multiplex PCR may be valuable in enhancing surveillance for adenoviral illness in both the military and civilian communities. It remains important to develop such new PCR testing techniques using original patient specimens.

343 Adenovirus Type 4 Viral Loads on Throat and Hand Specimens from Military Basic Trainees

TODD J. VENTO, MD, MPH, Walter Reed Army Institute of Research, Ft. Meade, MD; HUO-SHU S. HOUNG, PhD, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD; JOEL GAYDOS, MD, MPH, DoD Global Emerging Infections Surveillance and Response System (DoD-GEIS), Silver Spring, MD; WELLINGTON SUN, MD, ROBERT KUSCHNER, MD and LEONARD BINN, PhD, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD

Background: Acute Respiratory Disease (ARD) is a leading cause of morbidity in Military Basic Training (BT). Adenovirus Type 4 (Ad4) is the most common pathogen. With the loss of Ad vaccines, ARD rates in BT increased. ARD caused by Ad4 and other pathogens cannot be distinguished clinically and viral culture is not suited for decision making. Compared to culture, studies found 99% sensitivity and 100% specificity for PCR tests. We used a quantitative PCR test (TaqMan™ 7700, Perkin Elmer, Boston, MA) to study trainees with ARD. **Methods:** Throat and hand swabs of patients with cough or sore throat were tested for Ad4 by TaqMan®. Daily throat swabs were studied on trainees on ARD confinement. **Objectives:** To assess the value of viral loads in predicting clinical course by describing associations between pharyngeal viral loads, oral temperature and diagnosis of pneumonia; to obtain data for developing a hand washing policy by describing viral loads on patients' hands. **Results:** Volunteers (184) were enrolled over 6 weeks; 107 (58%) were men; mean age was 21 years. 110 (60%) were febrile at enrollment (mean temperature = 101.3 °F). PCR was done on 441 throat and 132 hand samples. Of the 184 enrollees, 54% were positive for Ad4 (65% of febrile and 28% of non-febrile patients). The mean viral load on enrollment was 130-million genome copies/throat swab. Viral load and initial oral temperature were significantly, positively associated; temperatures on other days were not. Most (58%) enrollees with pneumonia were positive for Ad4 (mean viral load = 8.9 million genome copies/throat swab). 27.5% of hand swabs were Ad4-positive. Ad4 on hands was associated with Ad4 presence on throat swabs; however, quantitative Ad4 loads were not associated. **Conclusions:** Ad4 was identified on patients' hands, supporting hand washing; however, more work is needed to determine the clinical importance of hand viral loads. Patients with Ad4 pneumonia had a lower viral load than other Ad4-positive patients. A positive association was found for initial temperature and pharyngeal Ad4 load. This finding may have clinical predictive value and implications for prevention of disease spread in this ARD-prevalent environment.

344 Performance Characteristics of a Real-Time RT-PCR Assay for Respiratory Syncytial Virus Detection

JANE KUYPERS, PhD, NANCY WRIGHT, BA and RHODA MORROW, PhD, Univ. of Washington, Seattle, WA

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of lower respiratory tract morbidity in young children and immunosuppressed patients. An assay that can accurately and rapidly detect and quantify RSV in clinical samples will facilitate an earlier diagnosis and improve patient management. Current detection methods rely on labor-intensive and time-consuming viral culture and antigen detection tests, which may lack sensitivity. We have developed a quantitative real-time RT-PCR assay for both RSV-A and RSV-B subtypes using primers for a consensus region of the matrix protein gene. An RNA control molecule (EXO) was added to each sample before RNA extraction to exclude false negative results due to sample inhibition. Specificity was high, with no amplification of ten RNA or eight herpes viruses. An RSV subtype-specific real-time RT-PCR assay, using primers that target the polymerase gene, was also developed. RT-PCR results of nasal wash samples submitted to the UW Virology Lab from January through March, 2003, for detection of respiratory viruses were compared to those of an RSV fluorescent antibody direct antigen assay (FA). Among 517 samples tested by both methods, RSV was detected in 228 (44%) by FA and in 241 (47%) by RT-PCR. The number of RSV ranged from 850 to over 1 billion copies per mL of nasal wash. Two (0.4%) samples were positive by FA and negative by RT-PCR. The 15 (2.9%) samples positive by RT-PCR and negative by FA were confirmed RSV positive with the subtyping assay. The median number of RSV in nasal wash samples that were positive by both FA and RT-PCR was 2.4×10^7 copies/mL versus a median of 4.2×10^4 copies/mL for samples positive by RT-PCR only ($P < .001$, Mann-Whitney U test). Among positive samples from this Seattle cohort, 54% were subtype A and 46% were B. This real-time RT-PCR assay provides a rapid, specific, and highly sensitive alternative for investigating RSV in clinical specimens. Combined with the RSV subtyping assay, it will, in future studies, provide a better understanding of the relationship between illness severity and the quantity and subtype of virus being shed.

345 Highly-Sensitive Virologic Diagnosis of Dengue Infection by a Newly-Developed Protocol of Reverse Transcription-Nested Polymerase Chain Reaction (RT-Nested PCR) of Serum/Plasma, Peripheral Blood Leukocyte (PBL), and Urine Specimens

WANLA KULWICHIT, MD, JUTARAT MEKMULLICA, MD, SUNISA KRAJIW, BS, OLARN PROMMALIKIT, MD, RATSUDA YAPOM, BS, PONGPHOB INTARAPRASONG, MD, KESINEE ARUNYINGMONGKOL, BS, PORNTEP SUANDORK, MD, RANGSUN SITTHICHAI, MD, SAIRUNG SAKDIKUL, BS, APIWAT MUTIRANGURA, MD, CHITSANU PANCHAROEN, MD, USA THISYAKORN, MD, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand and ANANDA NISALAK, MD, Armed Forces Research Institute of Medical Science, Bangkok, Thailand

Background In the past decade, dengue infection has turned itself from a tropical disease into the most important viral hemorrhagic fever worldwide. Various PCR protocols have been developed. A major limitation of currently available methods is the lack of sensitivity in the late febrile and postfebrile period, when some patients suffer from severe manifestations. Here, we report a sensitive RT-nested PCR for detection of the virus in both blood and urine specimens, in both febrile and convalescent periods. **Methods:** We have developed an RT-nested PCR, with primers targetting the conserved sequence of all four dengue serotypes in the 5'-nontranslated region, with the final product size of 102 base pairs. Outer primers were used in the reverse transcription reaction. Sensitivity of the protocol was determined to be 0.01-1.0 PFU/ml for all four serotypes. Diagnosis of dengue infection was made by standard serologic criteria (hemagglutination inhibition and/or ELISA). Specimens were obtained either in the late febrile (N = 17) or after defervescence (N = 38), and consisted of serum/plasma, PBL, and urine. 18 febrile patients from other causes served as negative controls. **Results & Discussion:** All negative controls yielded negative PCR results. Detection of dengue RNA by our RT-PCR protocol proved very sensitive in both febrile and convalescent periods of infection (Table below). Interestingly, the virus could be detected in urine as frequently as in blood (plasma/serum and PBL) specimens, making urine a good alternative for dengue virologic diagnosis, given the less invasiveness of specimen access especially for small children. This should be highly applicable in both clinical services and molecular epidemiologic studies.

Positive PCR/total PCR (%) in various specimens of dengue patients

	Urine	Plasma/serum	PBL	Patients with at least one +ve specimen type
Late Febrile	10/13 (76.9%)	12/14 (85.7%)	12/13 (92.3%)	16/17 (94.1%)
Postfebrile	30/35 (85.7%)	21/24 (87.5%)	21/24 (87.5%)	33/38 (86.8%)
Total	40/48 (83.3%)	33/38 (86.8%)	33/37 (89.2%)	49/55 (89.1%)

Contents

INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES

http://intl.elsevierhealth.com/journals/ijid/

The authors, editors, owners and publishers do not accept any responsibility for any loss or damage arising from actions or decisions arising from information contained in this publication; ultimate responsibility for the treatment of patients lies with the medical practitioner. The opinions expressed are those of the authors and the inclusion in this publication of material relating to a particular product, method or technique does not amount to an endorsement of its value or quality, or of the claims made by its manufacturers.

Abstracted/Indexed by:
MEDLINE

Also available on
SCIENCE DIRECT®
www.sciencedirect.com

PL = Plenary P = Poster Presentations S = Symposium

Friday, March 5, 2004

Session 1 Community-based Therapy for AIDS and Drug-resistant Tuberculosis in Resource-poor Settings (PL) . . . S1
Session 2 Genetic Susceptibility to Infectious Diseases: Genomic Approaches (PL) . . . S1
Session 3 Looking to the Future of RTI Treatment (S) . . . S1
Session 4 Innovative Research in Disease Prevention: A Vision for the Future Human Papillomavirus, Herpes Zoster (S) . . . S3
Session 5 Institutions as Amplification Systems for the Spread of Infectious Diseases (S) . . . S4
Session 6 Abstracts not received
Session 7 From the Genome to the Bedside (S) . . . S5
Session 8 Prosthetic-device Infections (S) . . . S6
Session 9 Antimicrobial Resistance I: Gram-positive Bacteria and Gram-negative Cocci (P) . . . S7
Session 10 Clinical Trials (P) . . . S17
Session 11 Epidemiology and Public Health I: Bacterial, Food-borne, and Surveillance (P) . . . S23
Session 12 HIV I: Diagnosis and Treatment . . . S29
Session 13 Host Defenses and Immunomodulators (P) . . . S37
Session 14 Microbiology and Diagnostics I: Viral, Mycotic, and Parasitic Infections (P) . . . S40
Session 15 Mycobacterial Infections (P) . . . S48
Session 16 Pediatric Infections (P) . . . S56
Session 17 Sexually Transmitted Diseases (P) . . . S64
Session 18 Vaccines I (P) . . . S68
Session 19 Critical Issues for Infection Control: Current Reflections (S) . . . S76
Session 20 Confronting Pediatric HIV/AIDS Globally (S) . . . S77
Session 21 Peritonitis (S) . . . S78
Session 22 Expected and Unexpected Disease Outbreaks: Implementing Appropriate Vaccination Strategies (S) . . . S79
Session 23 Dengue: A Challenge for Science and Public Health in the New Millennium (S) . . . S81
Session 24 Antimicrobial-resistant Pathogens: Problems and Solutions (S) . . . S81

Saturday, March 6, 2004

Session 25 Reverse Vaccinology: Using Genome Information to Develop New Vaccines (PL) . . . S83
Session 26 Cholera in Latin America: The Paradoxical Benefits of the Last Pandemic (PL) . . . S83
Session 27 Anatomy of an Outbreak: The SARS Story (S) . . . S83
Session 28 Innovative Research in Disease Prevention: A Vision for the Future Rotavirus, Human Immunodeficiency Virus (S) . . . S85
Session 29 Findings of the Global Pertussis Initiative (S) . . . S86
Session 30 Resistance Surveillance: Local Hot Spots, Global Strategies A Focus on Common RTI Pathogens (S) . . . S87
Session 31 Advances in Malaria (S) . . . S89
Session 32 New Concepts in Infectious Diseases (S) . . . S90
Session 33 Antimicrobial Resistance II: Gram-negative Bacilli (P) . . . S91
Session 34 Bacterial Infections I: Pneumonia, CNS, and Gram-negative Infections (P) . . . S99
Session 35 Emerging Infectious Diseases (P) . . . S109
Session 36 Epidemiology and Public Health II: Viral Infections and Education (P) . . . S118
Session 37 Microbiology and Diagnostics II: Bacterial Infections (P) . . . S127

Methods: The VP7 genes of G9 rotaviruses collected during 1999-2003 in Belgium were sequenced.To understand the rate at which genetic diversification occurs we performed exploratory root-to-tip linear regression between the time of sampling of each strain and the genetic distance from the root of the phylogenetic tree constructed. A more accurate estimate for the evolutionary rate was obtained under the maximum likelihood framework. The rate constancy assumption was tested using the likelihood ratio test.

Results: The estimated rate of accumulation of nucleotide changes in the rotavirus G9 VP7 gene was calculated to be 2.4 x 10-3 (confidence intervals 1.1 x 10-3 -5.3 x 10-3) nucleotide substitutions/site/year. The Molecular Clock Hypothesis (MCH) could not be significantly rejected.

Conclusion: The evolutionary rate we calculated for the rotavirus VP7 genes was in the same range of other rapidly evolving RNA viruses, like the HA gene of influenza B viruses (1.6 x 10-3 nucleotide substitutions/site/year) or the env gene of HIV (3.0 x 10-3 nucleotide substitutions/site/year). Our study reveals that rotaviruses evolve according to a molecular clock on a small time-scale and that their origin might be recent. Further evolutionary studies should be performed on a larger scale for tracing their more accurate date of origin.

14.016 Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin in Oral Fluid

P. Suandork[1], W.Kulwichit[1], K.Arunyingmongkol[1], S. Krajiw[1], O. Prommalikit[1], C. Pancharoen[1], A.Nisalak[2], U. Thisyakorn[1]. [1]Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; [2]Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand

Background: Dengue infection is an important mosquito-borne disease worldwide. Various tests have been developed for detection of anti-dengue immunoglobulin in the serum. The practical problem of serum usage includes difficulty of venipuncture especially in small children. Oral fluid, which includes whole saliva and gingival crevicular fluid (GCF)-the transudate from capillary bed of gum and teeth, is an alternative clinical specimen for various viral immunodiagnosis. We have evaluated whether oral fluid specimens could be used for the diagnosis of dengue virus infection.

Methods: Serum and oral fluid specimens were collected simultaneously from children aged between 5-15 years with suspected dengue virus infection at acute and convalescent periods. Oral fluid collection was divided into whole saliva and GCF, which were collected by Whatman paper and tested by IgG captured enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).Oral fluid IgG levels above the cutoff value were considered diagnostic. Standard diagnosis was based on serum IgM and IgG captured ELISA. Acute febrile patients with negative dengue serology served as a control group.

Results: Secondary dengue infection was diagnosed in 21 patients. IgG was detected in whole saliva and/or GCF in 20 cases, making an overall sensitivity of 95.24%.None of the control specimens (n=15) contained oral fluid IgG above the cutoff value, resulting in specificity of 100%.IgG levels detected in whole saliva and GCF correlated well with that in serum.

Conclusion: Oral fluid is a convenient and non-invasive alternative clinical specimen for the diagnosis of dengue infection.This should be of good value in epidemiologic studies.

14.017 Polymerase Chain Reaction Diagnosis for Fungemia

K.Etoh, T.Yoshimuta, J. Honda, M.Hirokawa, R.Fujiki, K.Noda, H. Aizawa. Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

Background: Invasive fungal infection has become a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. In this study, we attempted to identify causative agents of fungemia using polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed for diagnosis of fungemia on in vitro sepsis model.

Methods: In our group, Polymerase Chain Reaction(PCR) using 16SrRNA primers for the diagnosis of Bacterial Infection was established. Similarly, we produced in vitro fungemia modeland then the PCR using ITS primers (targeted to conserved sequences 18SrRNA and internal transcribed spacer(ITS)1and ITS2 region.) was performed for diagnosis of fungemia on in vitro fungemia model. Our fungi is used clincal isolates of Candida parapsolis. We designed fungemia model using healthy volunteer peripheral blood.Fungal dose was serial dilute 106 -102 organisms in 1ml of RPMI1640.Each 100 l of them were injected 7ml of the blood in EDTA-disodium spitz.Serial dilute fungemia model is completed.DNA extraction from the model was performed using the KingFisher®ml robotic magnetic particle processor (Thermo Labsystems Co.Ltd., Helsinki, Finland). PCR products were analyzed with an microchip electrophoresis (ME) instrument (model SV1200; Hitachi Electronics Engineering Co. Ltd., Tokyo, Japan). The stainings were performed on the same models. We compared the above examinations with PCR on characters and sensitivity.

Results and Conclusion: Comparison sensitivity in May-Giemsa staining and PCR, May-Giemsa staining detected the phagocytosis up to the ratio of 1000:1 (granulocyte:fungus).On the other hand, PCR was positive up to the ratio of 100000:1 (granulocyte:fungus).Therefore, we confirmed that PCR was 100 times more sensitive than May-Giemsa (or Gram) staining. Our results also demonstrated that PCR is highly specific, can be applied for clinical diagnosis of fungemia.

14.018 Detection of Urinary Antibody as a Tool for Diagnosis of Dengue Infection

O. Prommalikit[1], W.Kulwichit[2], K.Arunyingmongkol[2], S. Krajiw[2], P. Suandork[2], J. Pupaibool[2], N. Jaimchariyatam[2], C. Pancharoen[2], A.Nisalak[3], U. Thisyakorn[2]. [1]Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand; [2]Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; [3]Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand

Background: Routine diagnosis of dengue infection is based on clinical manifestations and antibody detection in serum. However, the collection of blood samples from young children could be problematic.This study was conducted in order to evaluate the potential of urine as an alternative specimen for diagnosis of dengue infection.

Methods: Patients who were clinically suspected as dengue infection and were admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital between August to October 2003 were enrolled. Diagnosis of dengue infection was based on the standard serum ELISA assay. Urine samples were collected on the first day of admission, the day of defervescence, and the day of follow-up (1-2 weeks after discharge).The presence of dengue IgG in urine was detected by an ELISA assay. Acute febrile patients with negative dengue serology served as a control group. The cutoff value of 20 ELISA units was based on IgG levels present in dengue and negative control specimens.

Results: We enrolled 22 pediatric and adult patients with secondary dengue infection.There were 10 males and 12 females. Urine dengue IgG over 20 ELISA units was detected in all dengue cases, making an overall sensitivity of 100% while no patients in the control group (n = 12) showed a significant elevation of urine dengue antibody (urinary dengue IgG less than 10 ELISA units), with the specificity of 100%.Detection of dengue by urine ELISA proved very sensitive in the day of defervescence and day of follow-up (94.12% and 100% respectively). Urinary IgG levels correlated well with serum ELISA titers.

Conclusion: Urine dengue antibody test is useful for the diagnosis of dengue infection.Urine specimen collection is convenient, and non-invasive.

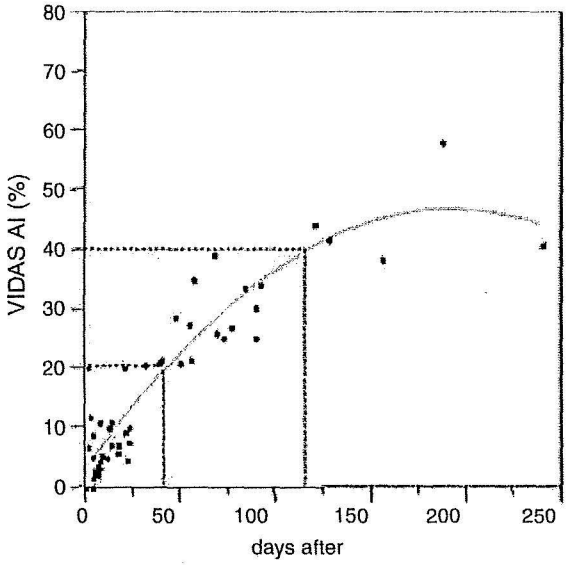
14.019 Detection and Monitorization of Active Cytomegalovirus (CMV) and Human Herpesvirus 6 (HHV-6) Infection by Antigenemia in Liver Transplantation Patients

A.Sampaio, S. Bonon, E. Patrocinio, M.Soki, R.Stucchi, F. Costa, V. Silva, L.Leonardi, **I.Santana Ferreira Boin**, S.C.B. Costa.Unicamp, Campinas, Brazil

Cytomegalovirus is the main pathogen of liver transplantation (LT) patients. During immunossuppression, the patients require rigorous clinical and laboratory monitoring to prevent or treat opportunist agents such as CMV and HHV-6. Rapid tests such as antigenemia and nested PCR are currently used for this purpose. The objective of this study was to monitor Liver Transplant patients for active CMV and HHV-6 infection after transplantation. Seventeen patients were monitored. The follow-up to detect active

tested: 35 control sera, 50 specimens from women with acute infection, 51 serum samples from women with recent vaccination, 100 serum samples with long persisting IgM, 5 sequential sera from a woman with preconceptional vaccination, 10 sera from women with reinfection in pregnancy after vaccination, and 50 serum samples without IgM from women with past infection or vaccination. To evaluate the performance of this novel VIDAS Rubella IgG avidity test we compared it with the diethylamine denaturation (DEA) procedure used in an in-house version of the laboratory Enders since 1998.

Results: Our results show that the bioMerieux test is easy to use, and that an avidity index higher than 40% allows the exclusion of a recent infection or vaccination: <20% indicates acute infection or recent vaccination during the last 2 months, 20–40% is considered borderline, and >40% indicates past infection or previous vaccination.



Conclusion: This new VIDAS rubella IgG avidity assay is a rapid (50 min), reproducible test with very good performance and is of considerable practical value for decision on the need of prenatal diagnosis, to avoid requesting too many follow up sera and, most important, in preventing unnecessary termination of pregnancy.

O142

Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in the blood of solid organ transplanted patients: comparison with end-point PCR and pp65-antigen assay

T. Allice, M. Enrietto, F. Pittaluga, S. Varetto, V. Ghisetti
(Turin, I)

Background: Cytomegalovirus (CMV) infection is an important cause of morbidity in solid organ recipients. Early markers to identify infection progress are required in order to apply a strategy of pre-emptive therapy whose efficacy relies on accurate laboratory tests to monitor CMV infection. The pp65-antigen test (antigenaemia) is the gold standard for the early identification of CMV infection but the technique is time-consuming with some pitfalls like long hands-on time and the need of a strong experience for the interpretation of the result. The evaluation of CMV DNA by quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) has been introduced for monitoring CMV infection but standardization of the techniques is essential for the clinical interpretation of its results. The recently introduced real-time PCR (RT-PCR) is aimed to offer a more reliable and standardized method than the end-point PCR (EP-PCR) for evaluating CMV dynamic.

Specific aim: The aim of the study was to compare the pp65-antigenaemia with two PCR systems working on peripheral blood leukocytes (PBL): the EP Cobas Amplicor Monitor (Roche, Brachburg, NY, US, detection limit: 100 copies/1 milion PBL) and the RT-PCR CMV (Amplimedical, Buttigliera, To, I, detection limit 100 copies/500,000 PBL). PCR results were referred as Log10/genome/500,000 cells. PBL ($n = 158$) from 32 solid organ transplanted patients (pts) with CMV infection (20/32 pre-emptive treated with ganciclovir and 12/32 not on therapy due level of pp65 < 30/200,000 PBL) were studied. A pannel of 58 negative specimens by a reference nested-PCR test (10 copies/500,000 PBL) was used to establish the specificity of the EP-and RT-PCRs.

Results: A good correlation was found between pp65 test and both EP-PCR ($R2 = 0.88$) and RT-PCR ($R2 = 0.87$) as well as between the two PCR methods ($R2 = 0.76$). A significantly higher DNA level was shown in pre-emptive treated pts (RT-PCR median value 3.8 Logs, EP-PCR 3.9 Logs) than in pts not on therapy (RT-PCR: 2.9 Logs, EP-PCR: 2.1 Logs: $p < 0.0001$ for both the two PCRs). Specificity was 98.3% for RT-PCR and 91.5% for the EP-PCR. Sensitivity of RT-PCR and EP-PCR were 100% and 29%, respectively, as tested with 10 copies of a known amount of the reference AD169 strain. In conclusion, our study shows that RT-PCR for CMV DNA quantitation is a highly sensitive and specific tool with a much lower turnaround time (3 hours) than EP-PCR (7 hours) allowing a rapid and early diagnosis of CMV infection in transplanted pts.

O143

Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay using whole blood stored on filter paper

N. Jaimchariyatam, J. Pupaibool, S. Krajiw,
K. Arunyingmongkol, P. Suandork, O. Prommalikit, R. Sittichai,
A. Nisalak, C. Pancharoen, U. Thisyakorn,
W. Kulwichit *(Bangkok, TH)*

Objectives: Dengue infection has emerged as a global public health problem. PCR and ELISA are used for diagnosis. We evaluated utilities of PCR and ELISA performed on dried blood spots on filter paper for dengue diagnosis in acute febrile patients.

Methods: A descriptive observational study was conducted in acute febrile pediatric and adult patients at King Chulalongkorn Memorial Hospital, between June 2003 to April 2004. Diagnosis of dengue infection was based on standard serum ELISA assay. Patients tested negative by serum ELISA served as controls. Whole blood (WB) was collected on the first day of admission and again 1–2 weeks after discharge. Dried blood spots were stored on filter paper which was kept at 4 degrees for at least 10 days before testing. Reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) and ELISA were performed on extracts from the spots. Blood spots with IgM over 40 units

and IgM/IgG ratio over 1.8 were considered primary infection cases. Spots with IgG over 100 units were considered secondary cases.

Results: We enrolled 102 patients with dengue infection (6 primary and 96 secondary cases) and 33 patients with other infectious diseases. Dried blood spots from 134 patients (101 cases and 33 controls) were tested by ELISA, and from 80 patients (65 cases and 15 controls) for RT-nested PCR. Positive RT-nested PCR was found in 43 of 65 dengue cases (4 in 5 of primary cases and 39 in 60 of secondary cases) and one of 15 control cases (sensitivity 80% and 65%, specificity 93.33% and 93.33%, positive predictive value (PPV) 97.5% and 97.73%, negative predictive value (NPV) 93.33% and 40% for primary and secondary cases, respectively). Positive ELISA was detected in all dengue and none of control cases (Table).

	Primary cases +ve/total (%)	Secondary cases +ve/total (%)	Controls +ve/total (%)
Blood spot ELISA	6/6 (100)	95/95 (100)	0/33 (0)
Blood spot PCR	4/5 (80)	39/60 (65)	1/15 (6.7)

Conclusions: RT-nested PCR and ELISA using dried blood spots on filter paper appear to be of diagnostic value for dengue infections. This would prove especially useful in certain areas where immediate laboratory testing is not available. In addition, molecular epidemiologic studies could also be performed in positive-PCR specimens.

O144

Shorter time to identification of pathogens in positive blood cultures by FISH in routine practice

R.P.H. Peters, P.H.M. Savelkoul, A.M. Simoons-Smit, S.A. Danner, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, M.A. van Agtmael *(Amsterdam, NL)*

Objectives: Evaluation of the effects on turnaround time and clinical management of routine implementation of fluorescent in situ hybridisation (FISH) for identification of pathogens from positive blood cultures.

Methods: FISH was performed on growth-positive blood culture fluids simultaneously to conventional identification. A selection of probes was used that should identify >95% of pathogens most commonly found in blood cultures. To determine the clinical impact of FISH identification, results and time points were compared between conventional identification and FISH.

Results: One-hundred and fifty blood cultures were included. FISH allowed identification of 117 pathogens (78%) at the species level (table 1). For pathogens identified at the genus level or with eubacterial probes no species specific probes are available, including *Enterobacter cloacae* and *Proteus mirabilis*. Identification was suboptimal in 3 cases: 2 with *Staphylococcus aureus* that were identified as Staphylococcus species and 1 with *Escherichia coli* that was identified as a lactose fermenting rod. In 8 cases no micro-organisms were found with Gram-stain and FISH. Average time to identification with FISH was 3.5 hours for gram-negative and 4 hours for gram-positive organisms. Compared to preliminary identification (coagulase, optochine, oxidase) FISH results were available 70 minutes earlier ($p < 0.001$); for definite conventional identification time gain was approximately 16 hours ($p < 0.001$).

Conclusion: Identification by FISH correlates well with conventional culture identification. In three cases identification with FISH was suboptimal because of difficult interpretation of fluorescence due to the presence of large amounts of protein and cells. The panel of probes should be extended to permit identification of >95% of pathogens; based on the results from our study probes for *Enterobacter cloacae* and *Proteus mirabilis* would be of interest. FISH allows faster identification compared to conventional methods in a routine setting. This can be especially useful for blood cultures that are growth-positive in the afternoon. For these, FISH results will be available the same day with treatment benefits for the patient, whereas conventional identification will require overnight incubation. If the turnaround time of the FISH procedure could be further decreased and the panel of probes extended, FISH would provide a valuable diagnostic improvement to the microbiological laboratory.

Table 1. Maximum level of identification of pathogens identified in culture (n = 148)

Pathogen in culture	Total	Species	Genus	Eubacterial
Gram-positive				
Coagulase negative staphylococci	71	71	-	-
Staphylococcus aureus	14	12	2	-
Streptococcus pneumoniae	2	2	-	-
Streptococcus pyogenes	1	1	-	-
Enterococcus faecalis	2	2	-	-
Enterococcus faecum	1	1	-	-
Other	11	-	8	3
Gram-negative				
Escherichia coli	14	13	-	1
Klebsiella pneumoniae	5	5	-	-
Pseudomonas aeruginosa	5	5	-	-
Enterobacter cloacae	6	-	-	6
Proteus mirabilis	4	-	-	4
Other	8	-	-	8
Yeast				
Candida albicans	3	3	-	-
Candida tropicalis	1	1	-	-
Total	148	116	10	22

NB. Two pathogens were identified in 6 blood cultures

O145

Detection of Salmonella antibodies by flagella-based ELISA has potential for diagnosis of acute gastroenteritis

T. Dalby, M. Strid, K.A. Krogfelt *(Copenhagen, DK)*

Objectives: Diagnosis of human gastrointestinal salmonellosis is traditionally done by fecal culturing and agglutination assays. An automatized ELISA is an obvious candidate for a more reliable, fast and easy method of diagnosis. An indirect ELISA employing repolymerized flagella antigens was developed and evaluated.

Methods: Two automatized indirect ELISAs employing re-polymerized *Salmonella flagella* were developed; H:[g,m] flagella respectively H:[i:1,2] flagella were used. Both IgA, IgM and IgG antibodies were detected. Sera from 153 Danish patients diagnosed with infection by *Salmonella enteritidis* (SE) and from 150 Danish patients diagnosed with infection by *Salmonella typhimurium* (ST) were obtained and analysed. Most patients delivered blood-samples at approximately one, three and six months after onset of salmonellosis. Cut-off values were determined as the 90 percentile when analysing sera from more than 100 healthy, Danish blood-donors.

Results: The developed ELISAs proved reliable, and at approx. one month after onset of salmonellosis, anti-flagella antibodies were detected with 70% of the SE-patients and 77% of the ST-patients; in comparison, a combined O- and H-agglutination assay detected only 44% of the SE-patients and 8% of the ST-patients. Three months after onset of salmonellosis, just 46%

P1619

An in vitro assay for flavivirus NS2B/NS3 serine protease

M. Bessaud, C.N. Peyrefitte, B. Pastorino, M. Grandadam, H.J. Tolou *(Marseille, F)*

Objectives: The genus Flavivirus comprises more than 70 viruses. Many of them cause severe human diseases. The genome of flavivirus, a single strand RNA molecule with positive polarity, is translated into a large polyprotein that is processed into structural and non-structural proteins by both viral and cellular proteases. The virus-encoded protease is a binary complex constituted by the NS3 protein and its co-factor, NS2B. As the viral protease plays a critical role in the virus replication cycle, it represents one of the main targets for antiviral therapy against members of the Flavivirus genus.The aim of this study was to develop an in vitro assay using the protease of several flaviviruses belonging to different groups in order to characterize their enzymatic properties, such as temperature, pH and salt-sensitivity and substrate specificity.
Methods: Sequences encoding the viral proteinase were located on the genome of 8 flaviviruses. NS2B/NS3 proteinase were expressed as hexahistidine-tagged recombinant proteins and then purified by immobilized-metal affinity chromatography. Their enzymatic properties were characterized in vitro using BAPNA, a chromogenic substrate for trypsin-like proteases.
Results: The protease moiety of the 8 flaviviruses were successfully produced and purified. 5 of them exhibited activity towards BAPNA. Effect of temperature, ionic strength and pH on enzymatic activity were determined. Our results suggest that the hydrophilic domain of NS2B is necessary for proteolytic activity.
Conclusion: The system we developed will allow us to establish a screening test so as to identify or to design inhibitors active as antiviral drugs against one or more pathogenic flaviviruses. The lack of activity of 3 of the 8 proteases we assayed could indicate slight differences in flaviviral proteases' selectivity and activity.

P1620

Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-nested polymerase chain reaction from dried urine spots on filter paper

J. Pupaibool, N. Jaimchariyatam, S. Krajiw, K. Arunyingmongkol, P. Suandork, O. Prommalikit, R. Sittichai, A. Nisalak, C. Pancharoen, U. Thisyakorn, W. Kulwichit *(Bangkok, TH)*

Objectives: Polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from serum are used for diagnosis of dengue infection. However, in certain areas of the world, these are not readily available. Storage of specimens on filter paper to be tested later at a centre is an attractive way to confirm a clinical diagnosis or for an epidemiologic study. We performed a pilot study to see if urine spots on filter paper can be used for dengue diagnosis.
Methods: Adults and children admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital suspected of dengue infection were enrolled. Final diagnosis of dengue infection was based on the standard serum ELISA assay. Patients with negative serology served as controls. Urine specimens were collected twice, 5 days to 3 weeks apart, spotted on filter paper and stored at 4 degrees for a minimum of 10 days before testing. RT-nested PCR and ELISA were performed on extracts from the spots. Our ELISA criteria for urine were single IgM > 10 units for primary dengue infection or single IgG > 10 units or 2-fold increase in IgG titer with the second titer >10 units for secondary dengue infection.
Results: 139 patients were enrolled. 64 and 71 specimens were analysed by RT-PCR and ELISA, respectively. The results are summarised in the Table:

	Patients					
Method	Adult	Children	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
RT-PCR	36	28	21/51 cases 41.18%	11/13 cases 84.62%	21/23 cases 91.30%	11/41 cases 26.83%
ELISA	25	46	49/60 cases 81.67%	10/11 cases 90.91%	49/50 cases 98.00%	10/21 cases 47.62%

If 3 primary dengue cases were excluded, the sensitivity of ELISA for secondary cases were 84.21%.
Conclusions: This is the first study using dried urine samples on filter paper for dengue diagnosis. In this study, fresh urine was spotted onto filter paper in the laboratory, and cross contamination was possible. Realistically, this process would be done on a near-patient basis with vastly lower likelihood of such contamination and thus better results of RT-PCR. Collection of urine is less invasive than that of blood and is especially suitable for children. This method would be highly applicable in epidemiologic studies, such as during dengue outbreaks. Due to a low number of primary cases in an endemic area such as Thailand, a study elsewhere is needed to assess the utility of urine spots in such cases.

P1621

A rapid sequencing based prototype assay for detection of high risk HPV strains in cervical samples

N. Marlowe, R. Bruce, M. Owens, T. White, M. Zoccoli *(Alameda, USA)*

Background: Human papillomavirus (HPV) is one of the most common causes of sexually transmitted diseases resulting in an estimated 288,000 deaths yearly from cervical cancer worldwide. Of more than 30 types found in the anogenital tract, at least 13 are considered high risk (HR), as they are significantly associated with progression to invasive cervical cancer. In an effort to accommodate high throughput screening for HR HPV types, we recently developed a prototype HPV assay using a Single Base Dye Primer Profiling (SBDPP) approach. In the present study, we evaluate prototype assay performance on 74 patient samples.
Objective: To evaluate SBDPP assay for the detection of HR HPV strains in cervical samples.
Methods: Genomic DNA purified from 74 retrospective cervical samples was used for this feasibility study. Fifty-four out of 74 were previously typed successfully with the Digene Hybrid Capture® 2 (HC2) assay. The remaining 20 samples yielded inconclusive results with the HC2 assay. Using consensus PCR primer sequences conserved among HPV types, a fragment of the L1 region was amplified in the presence of an intercalating dye. HPV-positive samples were identified by amplification Ct values and dissociation curve melting profiles, sequenced with a rapid SBDPP protocol and analysed on the ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. HR HPV types were identified by their unique single base distribution profiles.
Results: The presence of HR HPV types was determined in 28/74 clinical samples using the SBDPP assay. HPV types were

Episode 1: A pregnant woman with thirty-eight week of gestation was hospitalized in obstetrics clinic with the complaints of fever, malaise, and severe vaginal bleeding. On admission, white blood cell count was 6700/mm^3, haemoglobin was 11.5 g/L, platelet count was 8 000/mm^3. The level of AST was 591 IU, ALT 163 IU, lactate dehydrogenase 1079 IU, and creatinin phosphokinase 2132 IU. The baby was delivered by cesarean section. In serum CCHF IgM was positive by ELISA, and per oral ribavirin was administered after delivery. At the first day of delivery, the clinical and laboratory of findings of the baby were found to be normal. However, on his 5th day, he died because of massive bleeding. His CCHF IgM was found to be negative.

Episode 2: A pregnant woman with 19 week of gestation was admitted to the hospital. Her complaints were fever, malaise, headache, myalgia, nausea, vomiting, diarrhoea, and subconjuntival bleeding. In her laboratory investigation, white blood cell count was 3400/mm^3, haemoglobin level was 10.4 g/l and platelet count was 53000/mm^3. The level of AST was 813 IU, ALT 539 IU, and LDH 741 IU. In her serological analysis CCHF IgM and CCHF virus -PCR was found to be positive. At the twenty six week of gestation in obstetric ultrasound, fetal intraabdominal fluid was visualized and amniocentesis was performed. In serological analysis of amniotic fluid CCHFV-PCR was found to be negative. Intraabdominal fluid had increased and scrotal edema was visualized at thirty eighth weeks of the gestation. After her vaginal delivery, baby was severely ill and was operated with the diagnosis of necrotizing enterocolitis. His laboratory findings were normal except high white blood cell count. On his fifth day, thrombocytopenia occurred and he died because of massive bleeding. His CCHF IgM and PCR were negative.

Conclusion: To our knowledge, these are the first episodes of intrauterine CCHF infection. These episodes show that CCHFV can transmit through placenta. Obstetricians in endemic countries should consider CCHF infection among the patients with massive bleeding and thrombocytopenia.

P1666

The attack and the infection rate of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in an endemic region

O. Ergonul, H. Zeller, S. Menekse, A. Celikbas, S. Eren, N. Baykam, B. Dokuzoguz *(Ankara, TR; Lyon, FR)*

Objective: To detect the asymptomatic Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) infections in an endemic area, and calculate the attack and the infection rate.

Methods: The study was performed in a CCHF endemic region. The household members of the index cases were screened for CCHFV IgG and IgM by ELISA. The data related to risk exposure were obtained by a structured form.

Results: Eleven index cases were admitted to the clinic, 45 household members of these cases were screened. All the index patients had positive IgM or PCR for CCHFV. Among the household members, three individuals had IgG positivity (%), and only one patient had IgM positivity. None of the screened individuals had symptoms. The mean age was 28 (sd 17), and 52% of the subjects were female. Tick bite was detected a risk factor ($p = 0.040$) for CCHV infection, whereas patient care and contact with body fluids of the patients were not ($p > 0.05$). Eighteen patients had the history of tick bite, and 8 became infected (44%), and five (27%) became ill. Among the infected eight individuals, five became ill (63%).

Conclusion: Although we consider that some of the patients do not notice tick bite, we can still suggest that the infection rate of the virus is rather high compared to similar diseases. Tick bite is the major risk factor, in comparison to exposure to blood and body fluids of the infected cases.

P1667

Dengue virus infections in children and adolescents

B. Larrú Martínez, E. Quiroz, M. Castrejón de Wong, E. Castaño Guerra, J. Nieto, O. Saldana de Suman, D. Estripeaut Calderon, X. Sáez-Llorens *(Madrid, ES; Panama, PA)*

Objectives: Study the prevalence of dengue virus infection on children in Panama and describe their clinical features.

Methods: We reviewed all the reports of dengue virus infection from January 2000 to August 2005. Epidemiological and clinical dates were recorded. Diagnosis was made with positive IgM antibody test or increase in serum IgG, 5 days after onset of symptoms or culture of the virus in the first fifth days of illness.

Results: 457 children were included in our study. Distribution according sex was: 57.6% female and 42.4% male. Median of age was 13 years (IQR = 6). During the follow-up study we recorded 2 years when the number of cases increased. The distribution of cases among the study was: 8.4% in 2000, 33.9% in 2001, 20.9% in 2002, 6.6% in 2003, 7.0% in 2004 and 23.1% in 2005. The proportion of paediatric patients also varied from; 11.9% in 2000, 9.6% in 2001, 12.4% in 2002, 9.7% in 003, 7.8% in 2004 and 4.4% in 2005. In Panama City we recorded 65.3% of the infants. We detected an increase in the number of patients in the rain season, from May till November. The mean of days between the onset of symptoms and the first blood sample was 6.3 days (DS: 6.7) A second sample was obtained in 23.6% of our infants with an average time of 10.1 days (DS: 7.4). The frequency of classical symptoms related to dengue virus infection was: fever (95.2%), severe headache (74.2%), chill (65.9%) rash (63.5%), myalgia (51.9%), retro-orbital pain (51.6%), arthralgia (43.3%), gastrointestinal symptoms (37.4%), inflamed pharynx (26.7%), cough (26.5%), mild respiratory symptoms (18.6%) and diarrhoea (10.7%). In our infants the symptoms which were detected first were; fever, severe headache, chill, myalgia, retro-orbital pain, arthralgia, mild respiratory symptoms, cough and inflamed pharynx. We did not observed differences on clinical features between girls and boys. However, we detected detected significative differences among symptoms when we compared infants who were ≤5 years old with those who were older ($p < 0.005$). Four of our patients died because of dengue hemorrhagic fever.

Conclusion: Dengue is endemic in Panama as in most tropical countries and is one of the worlds major emerging infectious disease. More data about this illness are needed to elaborate sanitary programmes which contribute to control this infection.

P1668

Diagnosis of dengue infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction from oral specimens

J. Pupaibool, S. Krajiw, K. Arunyingmongkol, A. Nisalak, C. Pancharoen, U. Thisyakorn, W. Kulwichit *(Bangkok, TH)*

Objectives: Dengue fever is among one of the major emerging infectious diseases. Polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using non-blood samples are of diagnostic value for various infections including

dengue. Salivary ELISA has been shown by various investigators to be useful for dengue diagnosis. We sought to perform a pilot evaluation of diagnostic value of ELISA and PCR of oral brushes and saliva for dengue diagnosis in adults.
Methods: Adults with acute fever and suspected of dengue infection admitted to our university hospital were enrolled. Dengue diagnosis was made by standard ELISA using serum or plasma. Patients with negative ELISA served as controls. Buccal mucosal cells were collected for RT-PCR and saliva for both RT-PCR and ELISA at least twice, 7–14 days apart. Our ELISA criteria for saliva were single IgM > 20 units or single IgG > 60 units or 2-fold increase in IgG titre with the second titre >40 units for secondary dengue infection. Criteria for primary dengue infection were the same as secondary infection plus IgM:IgG ratio of over 1.8.
Results: 23 cases and 16 controls were enrolled. Our country is endemic for dengue and thus there was no primary dengue adult case in this study. As the study was performed in hospitalized patients, most of the first samples were collected one day before or on the day of defervescence. The specificities of either methods and the sensitivity of ELISA method for saliva were 100%. Sensitivities were approximately 32–33% for RT-PCR using buccal cells or saliva specimens. However, a combination of RT-PCR results for both types of oral specimens gave a sensitivity of 52%. The results are summarised in the table.

Methods / Specimens	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
RT-PCR using buccal mucosal cells	7/22 cases 31.82%	16/16 cases 100.00%	7/7 cases 100.00%	16/31 cases 51.61%
RT-PCR using saliva	7/21 cases 33.33%	14/14 cases 100.00%	7/7 cases 100.00%	14/26 cases 53.85%
RT-PCR using saliva and buccal cells	11/21 cases 52.38%	14/14 cases 100.00%	11/11 cases 100.00%	14/24 cases 58.33%
ELISA using saliva	23/23 cases 100.00%	16/16 100.00%	23/23 cases 100.00%	16/16 cases 100.00%

Conclusions: Collection of oral specimens is less invasive and may be more acceptable in certain situations. A single, acute specimen is adequate for diagnosis by RT-PCR. Our specimens, however, were collected late in the course of illness which affected the sensitivity of RT-PCR's. Earlier specimens may give a better yield. A study in paediatric patients is needed to assess the value of these methods for primary dengue infection.

P1669

Serologic evidence for Hantaviruses in the northern and eastern Tyrol (Austria) and the southern Tyrol (Italy)

G. Walder, A. Lanthaler, J. Simeoni, G. Morosetti, D. Schönitzer, O. Prinoth, M.P. Dierich, P. Kreidl *(Innsbruck, AT; Meran, Bozen, IT)*

Objective: The aim of this study was to assess the proportion of seropositives against Hantaviruses among healthy blood donors.
Methods: 1607 volunteer donors were recruited by the institute of transfusion medicine, representing the demographic situation in the Tyrol regarding gender and residence. Sera were tested for IgG with a commercially available ELISA. Positive samples were confirmed by a commercially available dot blot which was also used for identification of the serovar.
Setting: The study area comprises North Tyrol (Austria, north of the main ridge of the Alps), South Tyrol (Italy) and East Tyrol (Austria, both south of the main ridge of the Alps). South Tyrol belongs to the catchment area of the Etsch river, which drains into the Adriatic, while North- and East Tyrol are part of the catchment area of the Danube, which drains to the black sea.
Results: None of 617 samples from the Italian part of the study area yielded a positive result, wherein 7 of 988 donors of the Austrian part turned out to be seropositive. Two patients were positive for Hantaan, 3 patients were positive for Puumala, one patient was positive for Dobrava and one patient had antibodies against Hantaan and Dobrava. Only one of those patients reported extensive travelling abroad.
Conclusions: Evidence was found for the occurrence of Hantaviruses in the Austrian part of the region covering the catchment area of the Danube, but not in the Italian part of the study area covering the catchment area of the Etsch river. Seropositivity to Hantaviruses differs by hydrogeographic areas.

P1670

Molecular characterisation of a pantropic variant of canine coronavirus

N. Decaro, V. Martella, G. Elia, M. Campolo, C. Desario, M. Tempesta, C. Buonavoglia *(Valenzano, IT)*

Objectives: Canine coronavirus (CCoV) is an enveloped, single-stranded RNA virus, belonging to group I coronaviruses within the family Coronaviridae. Two different CCoV genotypes have been recognised, that are designated CCoVs type I and type II on the basis of their genetic relatedness to feline coronaviruses (FCoVs) type I and type II, respectively. CCoV is usually responsible for mild, self-limiting infections restricted to the enteric tract. We report the molecular characterisation of a pantropic variant of CCoV that caused fatal disease in pups.
Methods: CCoV type II strain CB/05 was isolated from an outbreak of fatal disease affecting seven dogs housed in a pet shop in Apulia region, Italy and characterised by fever, lethargy, inappetance, vomiting, haemorrhagic diarrhoea, neurological signs, and severe lesions in the parenchymatous organs. In all tissues, CCoV antigen was detected by immunoistochemistry and CCoV type II RNA was identified by genotype-specific real-time RT-PCR. The 3' end of the genome of strain CB/05 was determined by amplification of seven partially overlapping fragments. The PCR-amplified products were subjected to direct sequencing and the obtained nucleotide (nt) sequences were assembled and analysed using the BioEdit software package and the NCBI's and EMBL's analysis tools. GenBank accession number DQ112226 was assigned to the sequenced 8.7-kb fragment. The inferred amino acid sequences (aa) were compared to the analogous proteins available in the online databases.
Results: The structural proteins S, E, M, N of strain CB/05 displayed a high degree of aa identity to the cognate ORFs of CCoV type II, although the S protein showed the highest identity to type II FCoVs. While the nonstructural protein (nsp) 3a had the same length of known CCoVs, the nsp3b was 49-aa shorter than expected due to the presence of a 38-nt deletion at position 4704 and to a frame shift in the sequence downstream the deletion that introduced an early stop codon.
Conclusions: Association of strain CB/05 to a severe, fatal disease of dogs, together with virus isolation from organs with remarkable lesions, strongly suggests that this virus has changed the tropism, acquiring the ability to spread from the enteric tract to the internal organs. By sequence analysis of the viral genome, the only striking change was the truncated form of nsp3b, but the role of the deletion in the ORF3b in determining the patho-biological change deserves more in-depth investigation.

Complete ptosis caused by dengue fever

Jan Bronnert, Charan Malhotra, Ketchai Suavansri, Rekha Hanvesakul, Wanla Kulwichit, Henry Wilde

Lancet 2005; 366: 1982

German Naval Medical Institute, Kronshagen/Kiel, Germany (J Bronnert MD); BNH Hospital, Bangkok, Thailand (C Malhotra MD, K Suavansri MD, R Hanvesakul MD); Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (W Kulwichit MD); and Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand (Prof H Wilde FACP)

Correspondence to: Dr Jan Bronnert janbronnert@gmx.net

In March, 2005, a 56-year-old German expatriate living in Bangkok, was admitted because of a 1 day history of high fever with chills. He also noted that he could not open his right eye. He had just come back from a 2 week business trip to Sri Lanka. On examination he had a faint non-pruritic erythematous macular rash on his chest and back, a complete ptosis of the right eye (with pupil sparing), and minor weakness of his left hand grip (4/5). Over the next few days he developed recurrent fever with peaks up to 38·8°C, and had a pulse rate of 80 bpm, leucopenia ($1·69\times10^9$/L) with mild relative lymphocytosis, atypical lymphocytes, a slightly low platelet count (108×10^9/L), and slightly high concentrations of aspartate aminotransferase (83 U/L) and alanine aminotransferase (113 U/L).

ELISA on plasma taken during the acute phase and during convalescence showed significantly rising titres compatible with secondary dengue infection. Two reverse-transcription-nested PCR protocols for dengue virus were done on plasma samples from days 1 and 2 after admission; both samples showed dengue serotype 2. Tests for other infectious causes, such as HIV, Epstein-Barr virus, and scrub, murine, and tick typhus, were negative. MRI, magnetic resonance angiography, echocardiography, and electrocardiography also showed no abnormalities. We administered supportive treatment, and our patient improved rapidly. On discharge (7 days after admission) his clinical symptoms had almost disappeared. At the final follow-up, in May, 2005, abnormal physical signs were absent and laboratory results had completely normalised.

Dengue fever has become an important mosquito-transmitted viral infection during the past few decades with *Aedes aegypti* as the main vector. About 2·5 billion people are potentially at risk and 50 million people become infected each year. Most remain asymptomatic or have flu-like symptoms, and an estimated 500 000 need hospital admission.[1] The clinical features of dengue infection are broad and range from mild undifferentiated fever to a course with high fever, severe headache, myalgia, arthralgia, and rash. Because of the often severe myalgia, this disease was known as "breakbone fever" during World War II in India and Burma. Progression to dengue haemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) is probably triggered by a secondary infection with a different serotype of dengue virus.[2] DHF is characterised by plasma leakage, thrombocytopenia, and haemorrhagic events; it can culminate in DSS and result in death because of circulatory failure. In medical centres with experience of dengue fever, DHF has a fatality rate below 1%. There have been previous reports of rare neurological manifestations, including ophthalmoplegia, visual loss, and Guillain-Barré syndrome, associated with confirmed dengue fever;[3–5] our patient had complete ptosis, followed by rapid recovery. Dengue fever should therefore be included in the differential diagnosis of patients with obscure encephalopathy in endemic regions or with a history of travel to endemic countries.

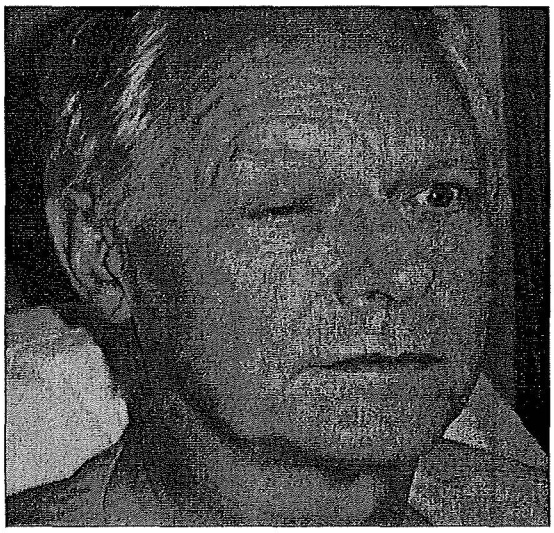


Figure: Photograph of our patient, taken 4 days after admission, showing partial recovery from the complete right-sided ptosis

Acknowledgments

WK's laboratory is supported by grants from the Thailand Research Fund, Faculty of Medicine, and Chulalongkorn University. We thank the Chulalongkorn Medical Research Center for providing core facilities. HW is a recipient of a Biotec-Thailand research grant. The funding sources had no involvement in the writing of the report or the decision to submit the paper.

References

1 WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *WHO fact sheet* 2002; 117: 1–3.

2 Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazques S, Morier L. Dengue haemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiological study. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 179–84.

3 Gaultier C, Angibaud G, Laille M, Lacassin F. Probable Miller Fisher syndrome during dengue fever type 2. *Rev Neurol* 2000; 156: 169–71.

4 Haritoglou C, Dotse SD, Rudolph G, Stephan CM, Thurau SR, Klauss V. A tourist with dengue fever and visual loss. *Lancet* 2002; 360: 1070.

5 Santos NQ, Azoubel ACB, Lopes AA, Costa G, Bacellar A. Guillain-Barré syndrome in the course of dengue. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; 62: 144–46.