ความชุกของไวรัสที่มาจากยุงในผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลัน ในประเทศไทย, 2558-2559

นางสาววริษฐา เพ็ชรสม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF MOSQUITO-BORNE VIRAL DISEASES IN PATIENTS WITH ACUTE FEBRILE ILLNESS IN THAILAND, 2015-2016

Miss Varittha Petchsom

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของไวรัสที่มาจากยุงในผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลันในประเทศไทย, 2558-2559
โดย	นางสาววริษฐาเพ็ชรสม
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์นายแพทย์ยงภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วริษฐาเพ็ชรสม : ความชุกของไวรัสที่มาจากยุงในผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลันในประเทศไทย, 2558-2559 (PREVALENCE OF MOSQUITO-BORNE VIRAL DISEASES IN PATIENTS WITH ACUTE FEBRILE ILLNESS IN THAILAND, 2015-2016) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยงภู่วรวรรณ, 66 หน้า.

ไข้เฉียบพลันหมายถึงมีอาการไข้โดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดอาการไข้เกิดขึ้นภายใน 1 สัปดาห์ตามคำจำกัดความการมีไข้หมายถึงมีอุณหภูมิของร่างกายเกิน 37.5 องศาเซลเซียสตามคำจำกัดความจะให้มีไข้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงดีไข้เฉียบพลันที่ไม่มีสาเหตุที่แน่ชัดหรือลักษณะอาการบ่งบอกที่แน่ชัดว่ามีสาเหตุจากอะไรพบได้บ่อย (ในรายที่มีไข้และรู้สาเหตุที่แน่ชัดเช่นเป็นฝีมีหนองการอักเสบของแขนและขาโรคทางเดินหายใจเช่นไข้หวัดใหญ่เราก็จะไม่เรียกว่าไข้เฉียบพลัน) ไข้เฉียบพลันในประเทศไทยจึงมีสาเหตุมาจากหลายอย่างแต่ที่พบบ่อยเกี่ยวกับโรคติดเชื้อไวรัสเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน (tropical) ซึ่งเป็นเขตที่มียุงชุกชุมเพราะมีสภาพแวดล้อมได้แก่มีป่าไม้แหล่งน้ำอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุงซึ่งยุงเป็นพาหะของโรคติดเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของไข้เฉียบพลันในประเทศไทยได้แก่ไวรัสเดงกี่ (dengue virus) ไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus) และไวรัสซิกา (Zika virus) โดยในการศึกษานี้จะศึกษาความชุกของไข้เลือดออกไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสซิกาในผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลันในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2558 – 2559*โดยการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่จากผู้ป่วยไข้เฉียบพลันทั้งหมด* 1,918 รายด้วยเทคนิค Semi-nested RT-PCR ตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกยา 1,753 รายและไวรัสซิกา 1,949 รายด้วย Real-time RT-PCR จากนั้นเลือกตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ทราบจำนวนวันเป็นไข้มาทั้งหมด 367 รายเพื่อมาตรวจหาโปรตีน NS1, IgM และ IgG antibodies (Dengue markers) ด้วย ELISA พบว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้งหมด 181 ราย (9.44%) ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสซิกาทั้งหมด 4 ราย (0.21%) และไม่พบการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและการทำ ELISA เพื่อตรวจหาโปรตีน NS1, IgM, IgG antibodies (dengue markers) ควบคู่ไปกับการตรวจด้วย semi-nested RT-PCR จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการในการตรวจจับไวรัสเดงกี่ได้เพิ่มขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

5874103330 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: ACUTE FEBRILE ILLNESS / DENGUE VIRUS / CHIKUNGUNYA VIRUS / ZIKA VIRUS / RT-PCR

VARITTHA PETCHSOM: PREVALENCE OF MOSQUITO-BORNE VIRAL DISEASES IN PATIENTS WITH ACUTE FEBRILE ILLNESS IN THAILAND, 2015-2016. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 66 pp.

Acute febrile illness fever with temperature more than 37.5 celsius is one of the most common presenting symptoms in Thai patients. Bacterial, viral or parasitic infection usually cause it. Arbovirus infections such as dengue virus, chikungunya virus and Zika virus infection are common. However, the prevalence is still unknown. The study tested sera samples for dengue virus by semi-nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT- PCR), and for chikungunya and Zika virus by real-time RT-PCR from Thai patients presenting with acute febrile illness between 2015-2016. The samples with days of fever data were selected to test for NS1 antigen, IgM and IgG antibodies by ELISA. There were a total of 1,918, 1,753 and 1,943 patients enrolled for Dengue, Chikungunya and Zika virus study, respectively. Dengue and Zika virus infection was detected in 9.44% and 0.21% of the patients, respectively. There was no chikungunya virus detected in the study. Dengue virus is the most common arboviruses found in patients with the acute febrile illness. Zika virus infection is rare whereas chikungunya virus is not detected. Using semi-nested RT-PCR with ELISA in order to better detect dengue virus in the samples.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Medical Science Student's Signature .....

Academic Year: 2017 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท และกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ต่อการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. สมพงษ์ วงศ์พันสวัสดิ์ ดร.นวรัตน์ โพธิ์สุวรรณ นางดวงนภา อินทรสงเคราะห์ และ นายจิระ จันท์แสนโรจ์ ที่ช่วยสอน ให้ความรู้ ชี้แนะแนวทาง ตลอดจน ให้ความช่วยเหลือต่างๆ จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาว หนึ่งฤทัย สุนทรวงศ์ นายฐานันดร ธนูสุวรรณศักดิ์ นางดวงนภา อินทรสงเคราะห์ นางสาวไอลดา ทองปาน และ นางสาว วัชพร ชูชาวนา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำ และเป็นเพื่อนที่ดี ให้กับผู้วิจัยตลอดการศึกษาต่อปริญญาโทในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยเหลือ และคอยประสานงานต่างๆ ตลอดจนให้คำแนะนำด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้า จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาเป็นอย่างยิ่ง ที่โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท รวมทั้งให้ความรักและกำลังใจ จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฎ

สารบัญแผนภาพ ..... ฒ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ณ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

วัตถุประสงค์ในงานวิจัย 4

สมมติฐานของการวิจัย 5

กรอบแนวความคิดของการวิจัย 5

ข้อจำกัดของการวิจัย 5

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 6

คำสำคัญ 6

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

บทที่ 2 8

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

การระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสซิคุนกุนยา และไวรัสซิกา 8

การติดต่อของเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสซิคุนกุนยา และไวรัสซิกา 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ลักษณะทางคลินิกของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส 12
การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ 12
การติดเชื้อไวรัสเดงชิคุนกุนยา 12
การติดเชื้อไวรัสซิกา 13
ไวรัสวิทยา 17
ไวรัสเดงกี่ และไวรัสซิกา 17
วัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสเดงกี่และไวรัสซิกา 18
ไวรัสชิคุนกุยา 20
วัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสชิคุนกุนยา 21
วิธีดำเนินการวิจัย 23
ประชากรที่ศึกษา และวิธีการ 23
ประชากรที่ศึกษา 23
1. จังหวัดขอนแก่น 23
2. จังหวัดกรุงเทพฯ 23
3. จังหวัดตรัง 24
สาเหตุที่ทำให้กลุ่มประชากรมีจำนวนที่แตกต่างกัน 24
จำนวนกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา 25
จำนวนกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษาไวรัสเดงกี่ 25
จำนวนกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษาไวรัสชิคุนกุนยา 25
จำนวนกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษาไวรัสซิกา 26
ตัวอย่างผู้ป่วย 26
1. ตัวอย่างเลือด 27
2. ตัวอย่างปัสสาวะ 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

การเก็บตัวอย่าง 27
การตรวจทางห้องปฏิบัติการ 28
การสกัดRNA ของไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา 28
การสกัดRNA จากตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ 28
การตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี่ 30
การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse transcription PCR 30
การตรวจหาไข้เลือดออก Dengue virus RNA ด้วยวิธี Semi-nested RT-PCR 30
การจำแนกชิ้น DNA ด้วยวิธี Gel eletrophoresis 32
การทำให้ DNA ของสารพันธุกรรมไวรัสเดงกีให้บริสุทธิ์ และการทำ sequencing 32
การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา 32
การตรวจไข้ปวดข้อยุงลาย Chikungunya virus RNA ด้วยวิธี Real-time RT-PCR 32
การตรวจหาเชื้อไวรัสซิกา 33
การตรวจหาไข้ไวรัสซิกาZika virus RNA ด้วยวิธี Real-time RT-PCR 33
ความไวและความจำเพาะในการตรวจ 34
ความไวและความจำเพาะในการตรวจไวรัสเดงกี่ 34
ความไวและความจำเพาะในการตรวจไวรัสชิคุนกุนยา 34
ความไวและความจำเพาะในการตรวจไวรัสซิกา 34
การตรวจหา Dengue markers คือ NS1 IgM และ IgGด้วยวิธี ELISA 35
การตรวจหาโปรตีน NS1 ของไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี ELISA 35
การตรวจหา dengue IgM antibody ด้วยวิธี ELISA 36
การตรวจหา dengue IgG antibody ด้วยวิธี ELISA 37
สถิติที่ใช้ในการศึกษา 38
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) 38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

บทที่ 4 40
ผลการศึกษา 40
ผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR 40
ผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิคุนกุนยา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR 43
ผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกาด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR 44
ผลการจำแนก serotypes ของไวรัสเดงกี่ 47
การตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค ELISA 48
บทที่ 5 52
สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 52
รายการอ้างอิง 61
ภาคผนวก 64
การเตรียมสารเคมี 65
การเตรียมสารสำหรับสกัด RNA 65
การเตรียมสารสำหรับ semi-nested RT-PCR 65
การเตรียมสารสำหรับใช้ในการ run gel electrophoresis 65
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 กลุ่มประเทศที่มีรายงานผู้ติดเชื้อ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 10

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ semi-nested-PCR ต่อ 1 reaction 30

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (primer) ที่ใช้ในการตรวจสอบและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสเดงกี่ ในการทำปฏิกิริยาของ PCR 31

ตารางที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 1st PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี่ 31

ตารางที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 2nd PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี่ 31

ตารางที่ 6 ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเดงกี่ serotype ต่างๆ 32

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (primer) และ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสชิคุนกุนยา ในการทำปฏิกิริยาของ Real-time RT-PCR 33

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (primer) และ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสซิกา ในการทำปฏิกิริยาของ Real-time RT-PCR 33

ตารางที่ 9 การตรวจพบ RNA ของไวรัสเดงกีไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสซิกาแจกแจงตามเพศ อายุและสถานที่ 46

ตารางที่ 10 จำแนกสายพันธุ์ (serotypes) ของไวรัสเดงกีที่พบในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2558-2559 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 แสดงภาพของยุงลายบ้าน และยุงลายสวน ที่เป็นพาหะนำโรค ที่เกิดจากไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา 11

รูปที่ 2 อาการของผู้ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา 13

รูปที่ 3 อาการของผู้ติดเชื้อไวรัสซิกา 13

รูปที่ 4 แสดงถึงศีรษะขนาดเล็กกว่าปกติเทียบกับศีรษะขนาดปกติของทารกหรือmicrocephaly ... 14

รูปที่ 5 กราฟแสดงการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR เปรียบเทียบกันระหว่างในตัวอย่างซีรัมและ ตัวอย่างจากปัสสาวะต่อระยะเวลาในการตรวจ 15

รูปที่ 6 แสดงการศึกษาของ Mansuyและคณะ โดยภาพทางขวามือแสดงถึงส่วนหัวของอสุจิจากการทำ immunohistochemistry จากการติดเชื้อไวรัสซิกาจากผู้ป่วย โดยใช้ brightfield microscopy และภาพทางซ้ายมือ เป็นกราฟแสดงการศึกษาการตรวจจับ RNA ของไวรัสซิกาต่อจำนวนวันที่เริ่มมีอาการไข้ 16

รูปที่ 7 องค์ประกอบของโปรตีนบนจีโนมของไวรัสเดงกี่และไวรัสซิกา 18

รูปที่ 8 viral genome ของไวรัสเดงกี่ และไวรัสซิกาและ polyprotein ภายหลังจากการ cleave 19

รูปที่ 9 วัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสตะกูลflaviviridaeสกุล flavivirus ในการศึกษานี้ได้แก่ ไวรัสเดงกี่ และไวรัสซิกา 20

รูปที่ 10 แสดงถึงองค์ประกอบของโปรตีนบนสารพันธุกรรมของไวรัสชิคุนกุนยา 21

รูปที่ 11 ภาพแสดงวัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสตระกูล Togaviridaeสกุล Alphavirus 22

รูปที่ 12 แสดงถึง serum และ plasma หลังจากการปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่อง centrifuge.....27

รูปที่ 13 ภาพตัวอย่างกระปุกปัสสาวะจากทางผู้ส่งตรวจ ส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 28

รูปที่ 14 จากโปรแกรม BLAST ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank 39

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 15 ภาพถ่ายจาก gel ภายหลังจากเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR 40

รูปที่ 16 แสดงถึงลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR แถบ DNA แถบที่ 1 ที่ได้รับกลับมาจากการตรวจสอบโดย WardMedic 41

รูปที่ 17 แสดงถึงลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR แถบ DNA แถบที่ 2ที่ได้รับกลับมาจากการตรวจสอบโดย WardMedic 41

รูปที่ 18 แสดงการนำลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ไป blast ใน GenBank..... 42

รูปที่ 19 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ใน GenBankของแถบ DNA แถบที่ 1 ที่ได้ส่ง sequencing 42

รูปที่ 20 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ใน GenBankของแถบ DNA แถบที่ 2 ที่ได้ส่ง sequencing 43

รูปที่ 21 แสดงผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยาด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR..... 44

รูปที่ 22 แสดงผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกาด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR 45

รูปที่ 23 แสดงขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการไข้เฉียบพลัน เพื่อนำมาตรวจหาไวรัสเดงกี่ และจำนวนตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 47

รูปที่ 24 การตรวจ Dengue markers ได้แก่ โปรตีน NS1, IgM และ IgG antibody ด้วยเทคนิค ELISA 48

รูปที่ 25 แสดงผลจากการตรวจสอบ ไวรัสเดงกี่ จาก Dengue markers ได้แก่ RNA ของไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR, โปรตีน NS1 และ IgM antibody ด้วยเทคนิค ELISA .. 49

รูปที่ 26 %positive ของ Dengue markers ในผู้ป่วยไข้เฉียบพลันต่อจำนวนวันที่เป็นไข้ 50

รูปที่ 27 %positive ของ IgG antibodies ต่อช่วงอายุ ของผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน 51

รูปที่ 28 แสดงถึงการพบ Dengue markers เปรียบเทียบกับจำนวนวันที่เป็นไข้ 54

รูปที่ 29 แสดงขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการไข้เฉียบพลันเพื่อนำมาตรวจหาไวรัสเดงกี่ ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 55

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 30 แสดงจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก ที่พบในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2560 (ค.ศ 2005-2017)..... 55

รูปที่ 31 แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในแต่ละเดือน ในช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 และค่าเฉลี่ยในการตรวจพบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2559 56

รูปที่ 32 การรายงานการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในประเทศต่างๆ จากการศึกษาของ Humphrey และคณะ 58

รูปที่ 33 แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560-2561..... 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
3’ UTR	3’ untranslated region
5’ UTR	5’ untranslated region
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DENV	Dengue virus
CHIKV	Chikungunya virus
Ct	Cycle Threshold
ZIKV	Zika virus
DF	Dengue fever
DHF	Dengue hemorrhagic fever
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DSS	Dengue shock syndrome
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
EtOH	Ethanol
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
$MgCl_2$	Magnesium dichloride
Ml	Milliliter
µl	Microliter
mM	Millimolar
NS1	Nonstructural protein 1
NS2A	Nonstructural protein 2A
NS2B	Nonstructural protein 2B
NS3	Nonstructural protein 3
NS4A	Nonstructural protein 4A
NS4B	Nonstructural protein 4B

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

NS5	Nonstructural protein 5
RNA	Ribonucleic acid
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน (tropical zone) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการแพร่ขยายพันธุ์ของยุง เช่น ป่าไม้ แหล่งน้ำ อุณหภูมิ และความชื้น เป็นต้น โดยยุงเป็นพาหะของโรคติดเชื้อจากไวรัส เช่น ไวรัสเดงกี่ (dengue virus) ไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus) และ ไวรัสซิกา (Zika virus) เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัสทั้งสามชนิดนี้ จะมีอาการคล้ายคลึงกัน คือการมีผื่น ปวดข้อ ปวดกล้ามเนื้อ และมีอาการไข้เฉียบพลัน โดยไข้เฉียบพลัน หมายถึง ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงดี มีอาการไข้ โดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด มีอุณหภูมิของร่างกายมากกว่า 37.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาไม่เกิน 1 หรือ 2 สัปดาห์ และถ้าเกินกว่า 2 สัปดาห์ไปแล้วยังหาสาเหตุไม่ได้ว่ามีไข้จากอะไร ก็จัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า Fever of unknown Origin หรือ FUO ที่จะต้องหาสาเหตุแตกต่างกันไป ส่วนในรายที่รู้สาเหตุที่แน่ชัด เช่นเป็นฝี มีหนองการอักเสบของแขนและขา หรือโรคทางเดินหายใจ เช่น ไข้หวัดใหญ่ จะไม่เรียกว่า ไข้เฉียบพลัน) โดยไวรัสทั้งสามชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคได้ทุกช่วงอายุ และทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีอาการไม่รุนแรงจนถึงแก่ชีวิต ในประเทศไทยมียุงเป็นพาหะในการก่อให้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา โดยมีลักษณะ ดังนี้

1. ไวรัสเดงกี่ เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ (serotypes) ได้แก่ DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4(1)

ไวรัสเดงกี่เป็น enveloped virus มีรูปร่างทรงกลม อยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* สกุล *Flavivirus* มีขนาดของอนุภาคไวรัส ประมาณ 50 nm ลักษณะของสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดสายบวก (positive single-stranded RNA, +ssRNA) รหัสพันธุกรรม (genome) ของไวรัสจะสามารถสร้างโปรตีนได้ทั้งหมด 10 โปรตีน แบ่งโปรตีนออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1.) โปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ประกอบด้วยโปรตีน capsid (C), envelope (E) และ pre-membrane (prM)/ membrane (M)

2.) โปรตีนที่ทำหน้าที่อื่น (non-structural protein/NS) ประกอบด้วยโปรตีน NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และNS5

โดยส่วนต้นและปลายสุดของสารพันธุกรรมไวรัสประกอบด้วย untranslated region (UTR) ประกอบด้วย 5'UTR และ 3'UTR ตามลำดับ

เมื่อติดเชื้อจะมีอาการแสดงของโรคแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (2) ได้แก่

1.) Dengue without warning signs มีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดข้อ ปวดกล้ามเนื้อ (myalgia) มีผื่น (maculopapular rash)

2.) Dengue with warning signs อาการจะเหมือนกลุ่มแรกแต่มีอาการที่รุนแรงกว่า โดยมีเลือดออกตามผิวหนัง หรือตามอวัยวะต่างๆ ซึ่งเกิดจากการรั่วของพลาสมา ออกนอกเส้นเลือด (Plasma Leakage)

3.) Severe dengue เกิด plasma leakage ที่รุนแรงขึ้น มีเลือดออกมากขึ้น ทำให้มีภาวะแทรกซ้อนของโรคต่างๆ ตามมา จนทำให้ร่างกายเกิดภาวะช็อกและเป็นสาเหตุให้เกิดความล้มเหลวของระบบต่างๆ ในร่างกาย

ในประเทศไทยมีการรายงานการระบาดของโรคไข้เลือดออกนานกว่า 50 ปี โดยโรคไข้เลือดออก เริ่มมารายงานในประเทศไทยปี พ.ศ. 2501 และเกิดเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขสำหรับประชากรไทยเรื่อยมา มีการระบาดเกิดขึ้นทุกๆ 2-3 ปี(3) จนกระทั่งเกิดการระบาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2530 และ พ.ศ. 2541 ในปัจจุบันการกระจายของโรคจะเปลี่ยนแปลงไปตามพื้นที่ตลอดเวลาทุกปี หรือ 1-3 ปี และสามารถพบไวรัสเดงกี่ทุกสายพันธุ์ในประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2. ไวรัสชิคุนกุนยา

ไวรัสชิคุนกุนยาเป็น enveloped virus มีรูปร่างทรงกลมและมี spike มีขนาดประมาณ 65-70 nm อยู่ในวงศ์ *Togaviridae* สกุล *Alphavirus* มี 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ West African สายพันธุ์ East Central and South Africa (ECSA) และ สายพันธุ์ Asian โดยมีลักษณะของสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดสายบวกมีขนาดประมาณ 11kb โดยรหัสพันธุกรรมของไวรัสมีทั้งหมด 2 open reading frames (ORFs) (4) ดังนี้

1.) ORF1 ต้นแบบของ non-structural polyprotein ได้เป็น 4 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน NSP1, NSP2, NSP3 และ NSP4

2.) ORF2 ต้นแบบของstructural polyprotein ได้เป็น 5 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน envelope (E) คือ โปรตีน E1, E2, E3 , capsid protein (C) และ โปรตีน 6k

โดยส่วนต้นและปลายสุดของสารพันธุกรรมไวรัสประกอบด้วยuntranslated region (UTR) ประกอบด้วย 5'UTR และ 3'UTR ตามลำดับ

ไวรัสชิคุนกุนยาเป็นสาเหตุของโรคไข้ปวดข้อยุงลาย อาการของโรคจะคล้ายกับอาการของโรคไข้เลือดออก แต่จะพบอาการปวดข้อและตาแดงได้บ่อยกว่า ไม่พบภาวะเลือดออกและภาวะช็อค โดยมียุงลาย มี 3 สายพันธุ์ (lineages) ได้แก่ สายพันธุ์ West African, East Central and South-African และ Asian(5)

มีการรายงานในประเทศไทยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 ในพื้นที่จังหวัดกรุงเทพฯ และต่อมาได้มีการระบาดของโรค เป็นระยะๆ ในหลายพื้นที่ ได้แก่

พ.ศ. 2531 จังหวัดสุรินทร์

พ.ศ. 2534 จังหวัดขอนแก่น และปราจีนบุรี

พ.ศ. 2538 จังหวัดเลย นครศรีธรรมราช และหนองคาย

พ.ศ. 2551 จังหวัดนราธิวาส

พ.ศ.2552 บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

พ.ศ. 2556 จังหวัดบึงกาฬ(6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ดังนั้นโรคไข้ปวดข้อยุงลายนับเป็นโรคอุบัติซ้ำ (Reemerging infectious disease) ถึงแม้ทิ้งช่วงห่างของการระบาดเป็นระยะเวลา 13 ปี แต่ก็ยังมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง

3. ไวรัสซิกา

ไวรัสซิกาเป็น enveloped virus มีรูปร่างทรงกลม อยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* สกุล *Flavivirus* มีลักษณะของสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดสายบวกมีขนาดของอนุภาคไวรัสประมาณ 50 nm จีโนมของไวรัสจะสามารถสร้างโปรตีนได้ทั้งหมด 10 โปรตีน แบ่งโปรตีนออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1.) โปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ประกอบด้วยโปรตีน capsid (C), envelope (E) และ pre-membrane (prM)/membrane (M)

2.) โปรตีนที่ทำหน้าที่อื่น (non-structural protein/NS) ประกอบด้วยโปรตีน NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และNS5

โดยส่วนต้นและปลายสุดของสารพันธุกรรมไวรัสประกอบด้วยuntranslated region (UTR) ประกอบด้วย 5'UTR และ 3'UTR ตามลำดับ(7)

ไวรัสซิกาเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อไวรัสซิกา ซึ่งค้นพบเพียงมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ African และ Asian อาการของโรคจะคล้ายคลึงกับโรคไข้เลือดออกและโรคไข้ปวดข้อยุงลาย แต่จะพบการมีผื่นได้บ่อยกว่า ไม่พบภาวะเลือดออก และภาวะช็อก แต่มีการรายงานว่าโรคติดเชื้อไวรัสซิกา มีความสัมพันธ์กับการผิดปกติของสมองตั้งแต่อยู่ในครรภ์ หรือการที่ทารกมีขนาดของศีรษะที่ผิดกว่าปกติ

โรคติดเชื้อไวรัสซิกา หรือไข้ออกผื่น มีรายงานการพบภูมิคุ้มกันของไวรัสซิกาครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2506 ที่กรุงเทพฯ และมีการรายงานพบการติดเชื้อไวรัสซิกาอีกครั้ง ในปี พ.ศ. 2556 จากนักท่องเที่ยวชาวแคนาดา และเยอรมัน พบการติดเชื้อที่จังหวัดศรีษะเกษ 8 ราย และที่จังหวัดลำพูน 21 รายและพบการติดเชื้อต่อเนื่องมาในปี พ.ศ. 2557 ที่จังหวัดเพชรบูรณ์ 20 ราย และที่จังหวัดสมุทรสาคร 5 ราย จากนั้นเริ่มมีการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทยและขยายอย่างเป็นระบบจนถึงปัจจุบัน(8) และมีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัย เฝ้าระวัง ให้มีความไวและความครอบคลุมมากขึ้น

ดังนั้นไข้เลือดออก ไข้ปวดข้อยุงลาย และไข้ติดเชื้อไวรัสซิกา ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยไม่ว่าจะเป็นเด็กหรือผู้ใหญ่ จึงเป็นปัญหาในเวชปฏิบัติ ในการหาสาเหตุของโรค แนวทางการรักษา และการป้องกันต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ในงานวิจัย

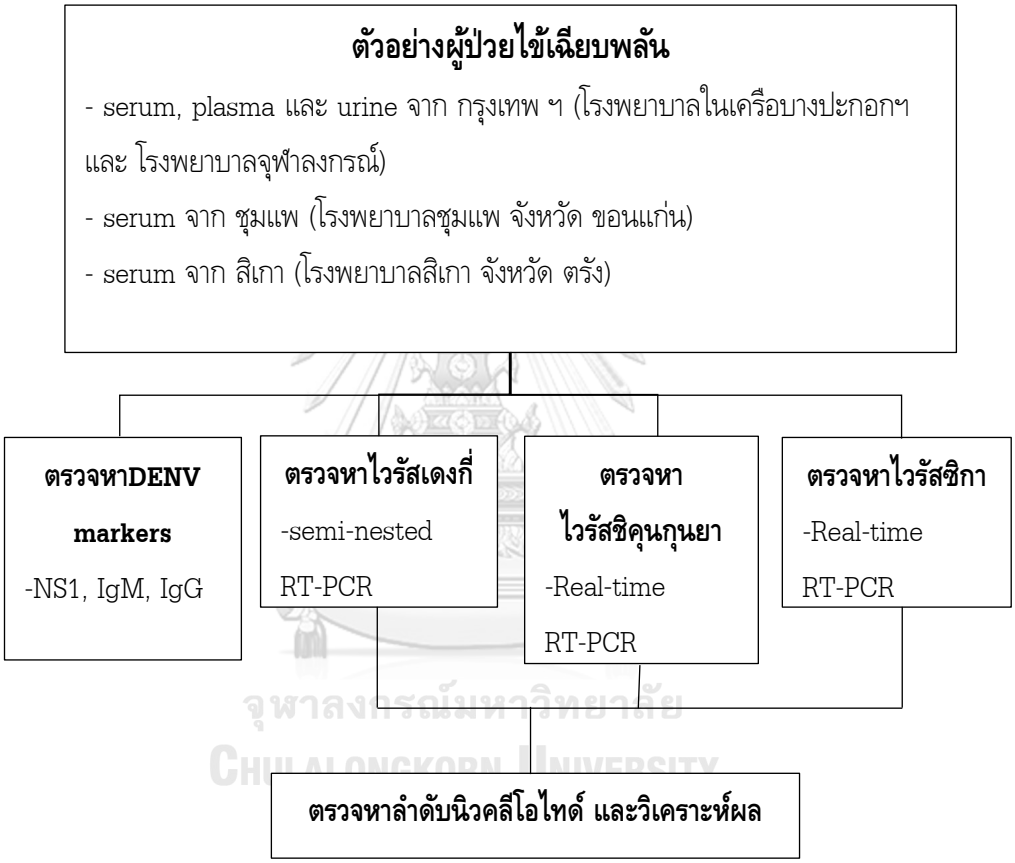
เพื่อศึกษาความชุก อุบัติการณ์ที่เกิดขึ้น ของไข้เฉียบพลันที่นำโดยยุง ได้แก่ ไข้เลือดออก ไข้ปวดข้อยุงลาย และไข้ติดเชื้อไวรัสซิกา ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สมมติฐานของการวิจัย

เนื่องจากมีการพบความชุกของไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ในหลายๆ ประเทศ จึงน่าจะพบความชุกในประเทศไทยด้วย

กรอบแนวความคิดของการวิจัย



แผนภาพที่ 1กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitations)

-ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างที่ได้รับมาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลในเครือบางปะกอกฯ (จังหวัดกรุงเทพฯ) โรงพยาบาลชุมแพ (ชุมแพเป็นอำเภอหนึ่งในจังหวัดขอนแก่นซึ่งมีอาณาเขตติดกับอีก 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเลยและจังหวัดชัยภูมิ) และโรงพยาบาลสิเกา (จังหวัดตรัง) ซึ่งอาจยังไม่ครอบคลุมทั้งประเทศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

-ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน มีความเป็นไปได้ยากในการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ เมื่อหายจากอาการป่วยแล้ว จะไม่กลับมาโรงพยาบาลเพื่อเก็บตัวอย่างครั้งที่สองอีก

-การเก็บข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาไม่ครบถ้วน ได้แก่ จำนวนวันที่เป็นไข้ ทำให้มีตัวอย่างเพียงส่วนน้อย ที่มีข้อมูลจำนวนวันที่เป็นไข้ เนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยส่วนใหญ่มาจากต่างจังหวัด ต้องใช้ระยะเวลาในการขนส่งตัวอย่าง และส่งข้อมูลยังห้องปฏิบัติการ ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบข้อมูลเพื่อที่จะขอให้เก็บข้อมูลเพิ่มเติมได้ทัน

-การมี viral load ที่ต่ำของไวรัสทั้ง 3 ชนิด ทำให้มีการตกหล่นของการตรวจหาไวรัส กล่าวคือ ไม่สามารถส่งไปตรวจยืนยันได้ ว่าเป็นไวรัสที่เราต้องการศึกษาหรือไม่ เนื่องจาก แถบแบน PCR product ในขั้นตอน gel electrophoresis ไม่ชัดเพียงพอที่จะตัดเจล ทำได้แค่การเทียบขนาด PCR product กับแถบ DNA marker เท่านั้น หรือ ไม่สามารถตรวจยืนยันได้ว่า DNA ที่ส่ง sequence ไป ใช่สารพันธุกรรมของไวรัสที่เราศึกษาหรือไม่ เนื่องจากพอส่ง sequence ไปแล้ว sequence ที่ส่งกลับมามีขนาดของ nucleotides ที่สั้นเกินไป ทำให้ไม่พบว่ามี nucleotides ที่ใกล้เคียง เมื่อนำ nucleotides ไป blast ใน GenBank

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Serotype คือ การแบ่งกลุ่มของไวรัสเดงกี่ ตามคุณสมบัติความจำเพาะของแอนติเจน และแอนติบอดี้ต่อไวรัส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำสำคัญ

Acute febrile illness, mosquito-borne virus, Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, semi-nested RT-PCR, real-time RT-PCR และ ELISA

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Benefits of study)

สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ไปปรับใช้ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการตามความเหมาะสม

1. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ไปปรับใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพื่อลดความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นและ รักษาได้ทันเวลา

2. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปติดตามการระบาดของโรคในแต่ละปี และสามารถคาดการณ์การระบาดของโรคในแต่ละปีได้

3. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาปรับใช้ในการเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของโรคได้

4. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา สามารถบอกความชุกของไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ในช่วงปี พ.ศ. 2558-2559 ในประเทศไทยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา

1. การระบาดของไวรัสเดงกี่

มีการระบาดครั้งแรกของไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever, DHF) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเดงกี่ในปี พ.ศ. 2322-2323 ในทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาเหนือ และมีการระบาดอย่างต่อเนื่องเรื่อยมา โดยเฉพาะภายหลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 มีการขนส่งสินค้าทางเรือ และทำให้ยุงติดตามมาพร้อมเรือขนส่งสินค้า ส่งผลให้เกิดการระบาดของไข้เลือดออกเพิ่มขึ้นอย่างกว้างขวาง เช่น การระบาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2497 ในประเทศฟิลิปปินส์ ปัจจุบันมักพบโรคไข้เลือดออก ทั้งในแถบประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น (tropical and subtropical) ได้แก่ ในทวีปอเมริกา ทวีปแอฟริกา ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แปซิฟิก และเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก

ในประเทศไทยพบผู้เป็นโรคไข้เลือดออกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2492 และพบการระบาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2501 การระบาดของเชื้อไวรัสเดงกี่มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยจะระบาดปีเว้นปีหรือทุกๆ 2-3 ปี ผู้ป่วยติดเชื้อส่วนใหญ่คือผู้ป่วยวัยเด็ก ช่วงอายุ 0-14 ปี การติดเชื้อในเพศหญิงและเพศชายมีจำนวนใกล้เคียงกัน และสามารถพบผู้ป่วยได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. การระบาดของไวรัสชิคุนกุนยา

พบการรายงานของไวรัสชิคุนกุนยาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2495 ในแทนซาเนีย ทวีปแอฟริกา ต่อมาได้มีการรายงานการติดเชื้อในประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย และในปี พ.ศ. 2548 ได้มีการระบาดใหญ่ที่ประเทศโคโมรอส และอินเดีย จากนั้นเริ่มกระจายตัวสู่ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย สิงคโปร์ เวียดนาม พม่า และกัมพูชา เป็นต้น อุบัติการณ์ของโรคเป็นไปตามการแพร่กระจายของยุงซึ่งเป็นพาหะของโรค

พบการรายงานการติดเชื้อในประเทศไทย ดังนี้

1.) พ.ศ. 2501 พบการติดเชื้อครั้งแรกในประเทศไทย ในจังหวัดกรุงเทพฯ

2.) พ.ศ. 2531 จังหวัดสุรินทร์

3.) พ.ศ. 2534 จังหวัดขอนแก่นและปราจีนบุรี

4.) พ.ศ. 2538 จังหวัดเลย นครศรีธรรมราช และ หนองคาย

5.) พ.ศ. 2551 เป็นการระบาดใหญ่ที่จังหวัดนราธิวาส

6.) พ.ศ. 2556 ที่จังหวัดบึงกาฬ

โดยผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาส่วนใหญ่ พบได้ทุกช่วงวัยและพบมากในช่วงฤดูฝน

3. การระบาดของไวรัสซิกา

ไวรัสซิกาพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2490 ในลิงวอกที่อาศัยอยู่ในป่าซิกา ประเทศยูกันดา ทวีปแอฟริกา ในปีต่อมาสามารถสกัดไวรัสออกมาจากยุง *Aedesafricanus* จากป่าซิกาเช่นเดียวกัน และพบว่าไวรัสที่สกัดออกมาได้ เป็นไวรัสตัวเดียวกับที่พบเมื่อปี พ.ศ. 2490

การติดเชื้อไวรัสซิกาในมนุษย์ มีรายงานดังต่อไปนี้

1.) พ.ศ. 2495 มีการตรวจพบไวรัสซิกาจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์

2.) ช่วงปี พ.ศ. 2512-2526 เริ่มมีรายงานการติดเชื้อไวรัสซิกานอกเขตทวีปแอฟริกา

3.) พ.ศ. 2550 พบการระบาดที่หมู่เกาะแยป (Yap state)

4.) พ.ศ. 2558 พบผู้ป่วยรายแรกที่ติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศบราซิล และเป็นการระบาดครั้งใหญ่ของเชื้อไวรัสซิกา โดยมีการรายงานจากองค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ว่าพบผู้ป่วยที่เป็นไข้ พร้อมกับมีผื่นขึ้นกว่า 7,000 ราย และภายหลังตรวจพบว่าเป็นการติดเชื้อไวรัสซิกา ซึ่งแพร่กระจายไปยังประเทศในแถบละตินอเมริกา อเมริกากลาง และกลุ่มประเทศในแถบคาริเบียน

5.) พ.ศ. 2559 มีการระบาดในหลายๆ เกาะของประเทศเฟรนช์โปลินีเซีย (French Polynesia) ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ระบาดในหมู่เกาะแยป ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้มีการรายงานว่าการติดเชื้อไวรัสซิกามีความสัมพันธ์กับการเกิด microcephaly และความผิดปกติทางสมองในเด็กแรกเกิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตั้งแต่ พ.ศ. 2550 ประเทศที่มีรายงานการพบผู้ติดเชื้อไวรัสซิกา โดยมียุงลายเป็นพาหะ มีทั้งหมด 84 ประเทศ แบ่งได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มประเทศที่มีการรายงานพบผู้ป่วยในพื้นที่ใหม่หรือมีการพบผู้ป่วยอย่างต่อเนื่องมีทั้งหมด 60 ประเทศ

- กลุ่มที่ 2 เป็นประเทศที่มีการรายงานพบผู้ป่วยก่อนปี พ.ศ. 2559 ประกอบด้วย 18 ประเทศ

- กลุ่มที่ 3 เป็นประเทศที่หยุดการแพร่เชื้อ แต่ยังคงมีโอกาสในการติดต่อของเชื้อไวรัสซิกา ในอนาคตมีเพียง 6 ประเทศ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 1

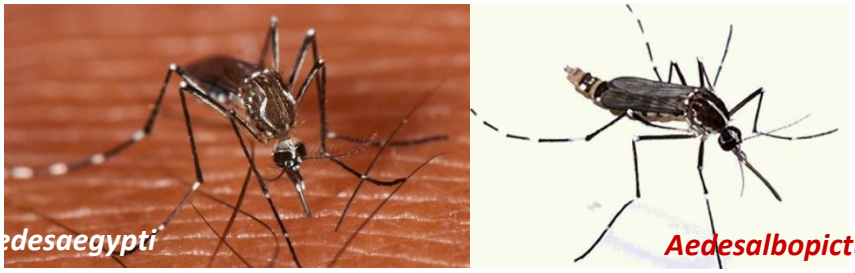
ตารางที่ 1 กลุ่มประเทศที่มีรายงานผู้ติดเชื้อ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 (ข้อมูลจาก สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค, 2016)(8)

	ประเทศ/หมู่เกาะ
กลุ่มที่ 1 ประเทศที่มีรายงานพบผู้ป่วยในพื้นที่ใหม่หรือมีการพบผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง (60 ประเทศ)	แองกัวลา, กาบูเวร์ดี, กินี-บิสเซา, แองกวิลลา, แอนติกาและบาร์บูดา ,อาร์เจนตินา ,อารูบา, บาฮามาส, บาร์เบโดส, เบลีซ, โบลิเวีย, โบแนเรอ, ซินต์เอิสตาซีย์ส, บราซิล, หมู่เกาะบริติชเวอร์จิน, หมู่เกาะเคย์แมน, โคลอมเบีย, คอสตาริกา, คิวบา, กือราเซา, ดอมินีกา, โดมินิกัน, เอกวาดอร์, เอลซัลวาดอร์, เฟรนช์เกียร์นา, เกรเนดา, กัวเดอลูป, กัวเตมาลา, กายอานา, ฮอนดูรัส, จาไมกา, มาร์ตินีก, แม็กซิโก, มอนต์เซอร์รัต, นิคารากัว, ปานามา, ปารากวัย, เปรู, เปอร์โตริโก, แซ็ง-บาร์เตเลมี,เซนต์คิตส์และเนวิส, เซนต์ลูเซีย, เซนต์มาร์ติน, เซนต์วินเซนต์และเกรนาดีน, ซินต์มาร์เติน, ซูรินาเม, ทรินิแดดและโตเบโก, เติกส์และเคคอส, สหรัฐอเมริกา, หมู่เกาะเวอร์จิน, เวเนซูเอลา, มัลดีฟ, , ฟิจิ, หมู่เกาะมาแชล, ไมโครนีเซีย, ปาเลา, ปาปัวนิวกินี,ซามัว, หมู่เกาะโซโลมอน, สิงคโปร์, ตองกา
กลุ่มที่ 2 ประเทศที่มีรายงานพบผู้ป่วยก่อนปี 2559 (18 ประเทศ)	บูร์กินาฟาโซ, บุรุนดี, แคเมอรูน, สาธารณรัฐแอฟริกากลาง, โกตดิวัวร์, กาบอง ,ไนจีเรีย ,เซเนกัล, อูกานดา, เฮติ, บังคลาเทศ, อินโดนีเซีย , ไทย, , กัมพูชา,ลาว , มาเลเซีย, ฟิลิปินส์, เวียดนาม
กลุ่มที่ 3 ประเทศที่หยุดการแพร่เชื้อแต่ยังคงมีโอกาสเกิดการติดต่อของเชื้อไวรัสซิกาในอนาคต (6 ประเทศ)	ชิลี , อเมริกันซามัว, หมู่เกาะคุก , เฟรนช์โพลินีเซีย, นิวแคลิโดเนีย, วานูอาตู

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การติดต่อของเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา

ไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ติดต่อจากคนสู่คน โดยมียุงเป็นพาหะนำโรค (mosquito-borne viruses) ได้แก่ ยุงในสกุล *Aedes* โดยเฉพาะยุงลายบ้าน (*Aedesaegypti*) และยุงลายสวน (*Aedesalbopictus*)



รูปที่ 1 แสดงภาพของยุงลายบ้าน และยุงลายสวน ที่เป็นพาหะนำโรค ที่เกิดจากไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา (ภาพจาก https://www.cdc.gov/dengue/resources/30jan2012/aegyptifactsheet.)

1.) ยุงลายบ้าน

เป็นยุงขนาดเล็ก มีสีดำ มีเกล็ดสีขาวหุ้มบริเวณรยางค์ปาก จะพบอยู่ในบ้าน หรือบริเวณรอบๆ บ้าน มีระยะบินไกล 50 เมตร ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในการนำไวรัสเดงกี่ได้ดีกว่า

2.) ยุงลายสวน

เป็นยุงขนาดเล็ก มีสีดำ และเกล็ดสีดำที่รยางค์ปาก บริเวณแถบด้านหลังของส่วนอกจะมีแถบสีขาว พบมากในเขตสวนและชนบท มีบทบาทหลักในการนำไวรัสชิคุนกุนยาโดยปกติยุงทั้งเพศผู้และเพศเมีย จะดูดน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ น้ำผลไม้ หรือน้ำตาลจากพืช จะมีเพียงยุงเพศเมียเท่านั้น ที่จะดูดเลือดเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไข่

เมื่อยุงลายเพศเมียกัด และดูดเลือดจากผู้ป่วยติดเชื้อในระยะที่มีไข้ ซึ่งคือระยะที่มีการฟักตัวของไวรัสเป็นเวลา8-12 วัน ไวรัสจะเพิ่มจำนวนในตัวยุง และเดินทางเข้าสู่ต่อมน้ำลาย เพื่อพร้อมที่จะส่งผ่านไวรัสไปยังคนต่อไป ที่ถูกกัดและทำให้ติดเชื้อได้

ไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา สามารถติดต่อจากแม่สู่ทารกในครรภ์ได้ในระยะตั้งครรภ์ แต่ยังไม่พบการติดเชื้อจากแม่สู่ลูกโดยการให้น้ำนม จึงยังมีการรณรงค์ให้มีการให้น้ำนมบุตรต่อไปในพื้นที่ที่มีการระบาดของไวรัส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ลักษณะทางคลินิกของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส

การติดเชื้อไวรัสเดงกี่

ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ จะมีระยะฟักตัวประมาณ 2-7 วัน โดยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2552 ทาง CDC (Central for Dissease Control and Prevention) ได้แบ่งการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. Dengue without warning signs

เริ่มแรกผู้ติดเชื้อจะมีอาการไข้ร่วมกับอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีผื่น ปวดหรือเจ็บตามร่างกาย หรือการมีเม็ดขาวต่ำ

2. Dengue with warning signs

อาการของผู้ติดเชื้อจะหนักขึ้น มีอาการเจ็บ บริเวณท้อง อาเจียนไม่หยุด เริ่มเกิด plasma leakage ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ของโรคไข้เลือดออก (DHF) ทำให้มีอาการบวมตามร่างกาย เนื่องจากมีของเหลวมาสะสมบริเวณต่างๆ ตามร่างกาย

3. Severe Dengue

มี plasma leakage ที่รุนแรงขึ้น จึงทำให้เกิดอาการต่างๆ เหล่านี้ตามมา ได้แก่ อาการช็อก มีการสะสมของของเหลวตามร่างกายมากขึ้น จึงทำให้มีการหายใจที่ผิดปกติ มีเลือดออกตามบริเวณต่างๆ ตามร่างกายเพิ่มขึ้น จนเป็นผลให้เกิดการล้มเหลวของระบบต่างๆ ภายในร่างกายตามมา

การติดเชื้อไวรัสเดงชิคุนกุนยา

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาส่วนใหญ่ จะมีอาการหลังจากถูกยุงกัดไปแล้วประมาณ 3-7 วัน โดยอาการหลักๆ ได้แก่ การมีไข้ และการปวดข้อ ซึ่งอาจพบอาการอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น อาการข้อบวม ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ และการมีผื่น โดยผู้ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา จะพบอาการปวดข้อมากกว่าผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีอาการดีขึ้นภายใน 1 สัปดาห์ แต่ในผู้ป่วยบางราย จะมีอาการปวดข้อยาวนานถึง 1 เดือน และยังไม่มีการรายการถึงการตายจากผู้ที่ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 2 อาการของผู้ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา
(ภาพจาก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก)

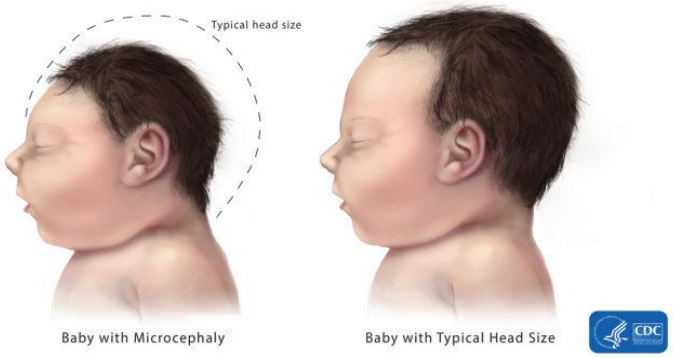
การติดเชื้อไวรัสซิกา

โดย 80% ของผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาจะไม่แสดงอาการของโรค หรือมีอาการแบบ mild symptom ได้แก่ การมีไข้ การมีผื่น ปวดเมื่อยตามร่างกาย และเยื่อบุตาอักเสบ ซึ่งอาการเหล่านี้สามารถหายเองได้ภายใน 1อาทิตย์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่าการติดเชื้อไวรัสซิกา มีความสัมพันธ์กับการมีศีรษะที่เล็กผิดปกติของทารก หรือความผิดปกติทางสมอง อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์ หรือการแท้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
N UNIVERSITY

รูปที่ 3 อาการของผู้ติดเชื้อไวรัสซิกา
(ภาพจาก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก)

ไวรัสซิกา สามารถส่งผ่านไวรัสจากแม่สู่ลูกได้ในระยะตั้งครรภ์ เป็นผลทำให้ลูกมีศีรษะที่เล็กผิดปกติ (microcephaly) หรือมีความผิดปกติทางสมอง



รูปที่ 4 แสดงถึงศีรษะขนาดเล็กกว่าปกติเทียบกับศีรษะขนาดปกติของทารก หรือ microcephaly (ภาพจากการศึกษาของMaldarelli และคณะ, 2016)(9)

ยังไม่มีการรายงานการส่งผ่านไวรัสซิกาจากการให้นมบุตร จากการศึกษาในคู่แม่ลูกที่ติดเชื้อซิกาในประเทศ French Polynesia พบว่าสามารถตรวจจับไวรัสซิกา ได้ในน้ำนมของแม่ผู้ติดเชื้อ แต่ไม่สามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของไวรัสซิกาในน้ำนม จึงยังไม่มีข้อห้ามสำหรับแม่ที่ต้องให้นมลูกในพื้นที่ที่มีไวรัสซิการะบาด

นอกจากนี้ไวรัสซิกา ยังสามารถถูกส่งผ่านจากคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งได้โดยผ่านการให้เลือดหรือการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ จากการศึกษาการให้เลือดในประเทศ French Polynesia พบว่าในช่วงระยะเวลาทั้งหมด 3 เดือน (พฤศจิกายน 2556 – กุมภาพันธ์ 2557) สามารถตรวจจับไวรัสซิกาในเลือดได้คิดเป็น 3% ของผู้ให้เลือด (blood donor) ทั้งหมด โดยผู้ให้เลือดทุกคน จะไม่มีอาการของการติดเชื้อไวรัสซิกา ในช่วงระยะเวลาที่ให้เลือด และไวรัสซิกาสามารถติดต่อได้ทางเลือด ปัสสาวะ อสุจิ น้ำลาย สารคัดหลั่งจากอวัยวะสืบพันธุ์ น้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลังน้ำคร่ำ โดยไม่ว่าผู้ติดเชื้อจะมีอาการหรือไม่ ก็สามารถส่งผ่านไวรัสไปยังอีกคนหนึ่งได้ซึ่งการตรวจพบ RNA ของไวรัสซิกาในตัวอย่างชนิดต่างๆ มีระยะเวลาการพบเจอที่แตกต่าง ดังนี้

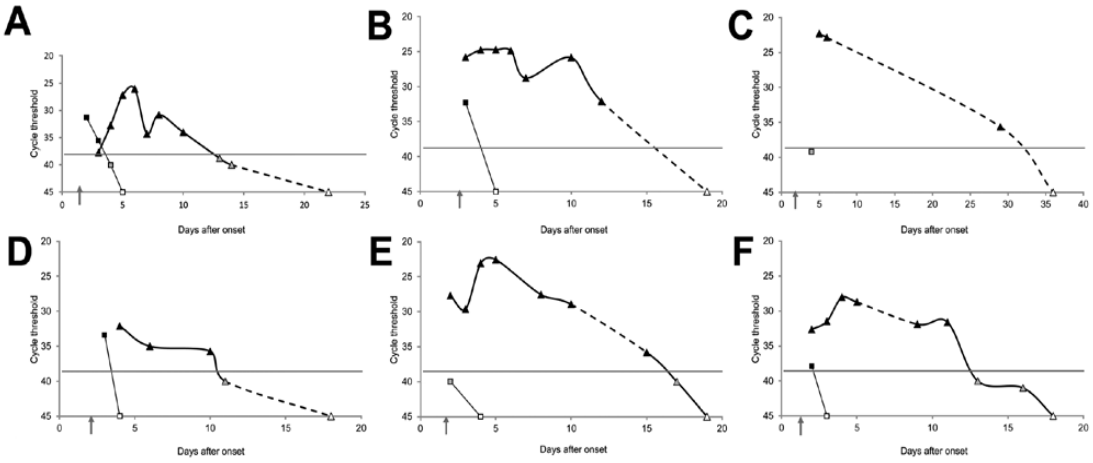
1.) ตัวอย่างเลือด

ในเลือดผู้ป่วยที่ไม่ตั้งครรภ์ การตรวจจับไวรัสซิกาทำได้โดยการตรวจ RNA ของไวรัสจากการเก็บตัวอย่างเลือดหรือซีรัม (serum) ซึ่งไวรัสจะอยู่ในเลือดได้ 5-7 วัน ภายหลังจากมีอาการป่วย

ส่วนในผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์จะตรวจ RNA ของไวรัสจากการเก็บตัวอย่างเลือดหรือซีรัมเช่นเดียวกัน แต่ไวรัสจะสามารถอยู่ในเลือดได้นานกว่าถึง 10 สัปดาห์ ภายหลังจากมีอาการป่วย

2.) ตัวอย่างปัสสาวะ

ในปัสสาวะสามารถตรวจไวรัสซิกาได้ยาวนานกว่าในเลือด โดยหลังจากที่มีอาการของการติดเชื้อ จะสามารถตรวจจับไวรัสได้ยาวนานกว่า 30 วัน



รูปที่ 5 กราฟแสดงการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR เปรียบเทียบกันระหว่างในตัวอย่างซีรัมและ ตัวอย่างจากปัสสาวะต่อระยะเวลาในการตรวจ (ภาพจากการศึกษาของ Gourinat และคณะ, 2015)(10)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการศึกษาของ Gourinat รายงานว่าในตัวอย่างปัสสาวะ จะมีปริมาณของไวรัส (viral load) ไวรัสซิกาสูงกว่าและพบในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าในซีรัม(10) ดังนั้นตัวอย่างปัสสาวะจึงเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจในการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกา

3.) ตัวอย่างน้ำลาย

ส่วนในน้ำลาย RNA ของไวรัสซิกาจะสามารถตรวจจับได้ถึงวันที่ 5-7 ภายหลังจากมีอาการป่วย จากการศึกษาในประเทศ French Polynesia พบว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน สามารถตรวจจับไวรัสซิกาในน้ำลายได้ดีกว่าในเลือด (11)

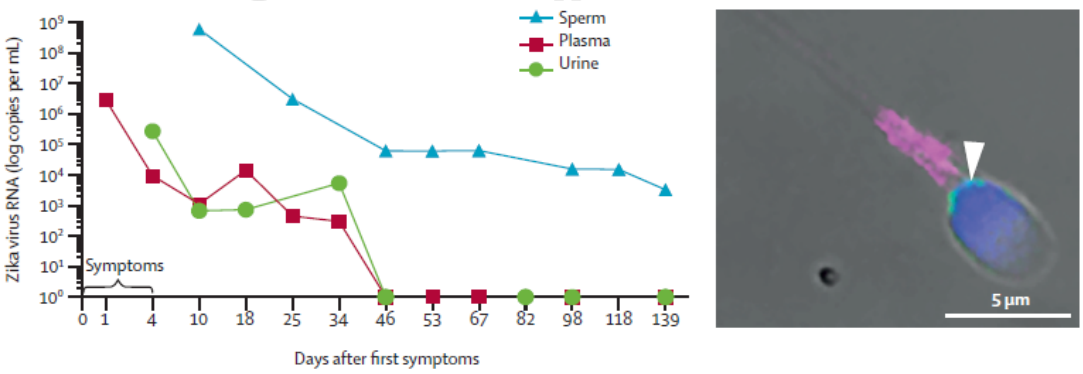
4.) ตัวอย่างเยื่อเมือก

ส่วนสารคัดหลั่งจากอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศหญิงที่บริเวณเยื่อเมือก (cervical mucus) โดย RNA ของไวรัสสามารถตรวจได้ในช่วงที่มีอาการจนกระทั่งภายหลังจากมีอาการไปแล้ว 11 วัน

5.) ตัวอย่างอสุจิ

มีการรายงานว่าไวรัสซิกา สามารถส่งผ่านทางเพศสัมพันธ์ได้ จากการศึกษา Musso และคณะพบไวรัสซิกาในตัวอย่างอสุจิ แต่ไม่พบในตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยในรายเดียวกัน(12) และจากการศึกษาของ Mansuy และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยเพศชายวัย 32 ปี ที่มีไข้ มีผื่น ปวดกล้ามเนื้อและปวดข้อ ซึ่งเดินทางกลับจากประเทศ เฟรนช์เกียนา (French guiana) ตรวจพบไวรัสซิกาจากตัวอย่างเลือดพาสมา (plasma) และในปัสสาวะในวันที่ 2 ของการเป็นไข้ และได้ทำการศึกษาอีกครั้ง โดยเก็บตัวอย่าง หลังจากที่ผู้ป่วยมีอาการแล้ว 141 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างอสุจิ เลือดและปัสสาวะ พบว่าสามารถตรวจพบ RNA ของไวรัสซิกา ในตัวอย่างอสุจิในขณะที่ไม่พบ RNA ของไวรัสซิกาในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะภายหลังจากที่มีอาการ 141 วัน และพบว่าในอสุจินั้น ไวรัสซิกาจะอยู่ได้ยาวนานที่สุดถึง 6 เดือนหลังจากมีอาการ(13) กล่าวคือจะสามารถตรวจจับไวรัสในอสุจิได้ในขณะที่ไม่สามารถที่จะตรวจจับไวรัสในเลือดและปัสสาวะได้ และหากผู้ป่วย มีเพศสัมพันธ์กับผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาจะสามารถส่งผ่านจากผู้ติดเชื้อไปยังอีกคนได้ จึงมีคำแนะนำสำหรับผู้ที่เดินทาง จากพื้นที่ที่มีไวรัสระบาด กลับมาในประเทศของตนให้หลีกเลี่ยงการมีเพศสัมพันธ์เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงการศึกษาของ Mansuy และคณะ โดยภาพทางขวามือแสดงถึงส่วนหัวของอสุจิจากการทำ immunohistochemistryจากการติดเชื้อไวรัสซิกาจากผู้ป่วย โดยใช้ brightfield

microscopy และภาพทางซ้ายมือ เป็นกราฟแสดงการศึกษาการตรวจจับ RNA ของไวรัสซิกา ต่อจำนวนวันที่เริ่มมีอาการไข้(13)

ไวรัสวิทยา

ไวรัสเดงกี่ และไวรัสซิกา

ไวรัสเดงกี่และไวรัสซิกาเป็น enveloped virus มีรูปร่างทรงกลม อยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* สกุล *Flavivirus* มีลักษณะของสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดสายบวก (positive single-stand RNA, +ssRNA) มีขนาดของอนุภาคไวรัส ประมาณ 50 nm จีโนมของไวรัสจะสามารถโปรตีนออกมาได้ทั้งหมด 10 โปรตีน แบ่งโปรตีนออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

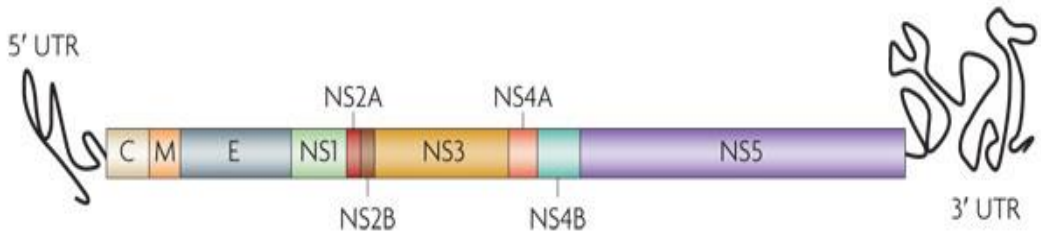
1.) โปรตีนโครงสร้าง (structural protein)ประกอบด้วย โปรตีน capsid (C), envelope (E) และ pre-membrane (prM)/membrane (M)

2.) โปรตีนที่ทำหน้าที่อื่น (non-structural protein/NS) ประกอบด้วยโปรตีน NS1 จะเป็นโปรตีน soluble ซึ่งทำหน้าที่เป็น ตัว promote การ replication, โปรตีน NS2A เป็น IFN inhibitor, โปรตีน NS2B เป็น cofactor ของ NS3, โปรตีน NS3 เป็น serine protease, โปรตีน NS4A เป็น IFN inhibitor และเป็น cofactor ของ NS5, โปรตีน NS4B เป็น IFN inhibitor และโปรตีน NS5 ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RdRp ที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัส

โดยส่วนต้นและส่วนปลายของสารพันธุกรรมไวรัสจะมี untranslated region (UTR) ประกอบด้วย 5’UTR และ 3’UTRตามลำดับ

ไวรัสเดงกีสามารถแบ่งได้เป็น 4 serotypes ได้แก่ serotype1, serotype2, serotype3 และ serotype4 โดยแต่ละ serotype จะมีความแตกต่างกันของ amino acid sequence ประมาณ 30-35%

ไวรัสซิกา แบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ African ซึ่งแบ่งได้เป็น West African กับ East African และ สายพันธุ์ Asian



รูปที่ 7 องค์ประกอบของโปรตีนบนจีโนมของไวรัสเดงกี่และไวรัสซิกา (ภาพจากการศึกษาของ Mukhopadhyayet และคณะ, 2005)(14)

วัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสเดงกี่และไวรัสซิกา

เนื่องจากทั้งสองไวรัส เป็นไวรัสในตระกูลเดียวกัน จึงมีวิธีการเข้าสู่เซลล์และการจำลองตัวเองเหมือนกัน โดยมีขั้นตอนหลัก ดังนี้

1. การยึดติด (attachment)

   Envelope ของไวรัสจะไปจับกับ receptor บนพื้นผิวของ target cellอย่างจำเพาะ

2. การเข้าสู่เซลล์ (penetration)

   เมื่อไวรัสจับกับ target cell แล้วจะเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ receptor mediated endocytosis โดย membrane ของ target cell จะฟอร์มตัวรวมกันเป็น endosome และพาไวรัสเข้าสู่เซลล์

3. การถอดเปลือกหุ้ม (uncoating)

   ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ ในรูปของ endosome ภายใน endosome มีค่า pH ที่ต่ำทำให้โปรตีน envelope ของไวรัส เกิด conformation change ไปรวมตัวกับ endosome membrane และปลดปล่อยไวรัสออกจากเซลล์สู่ cytoplasm

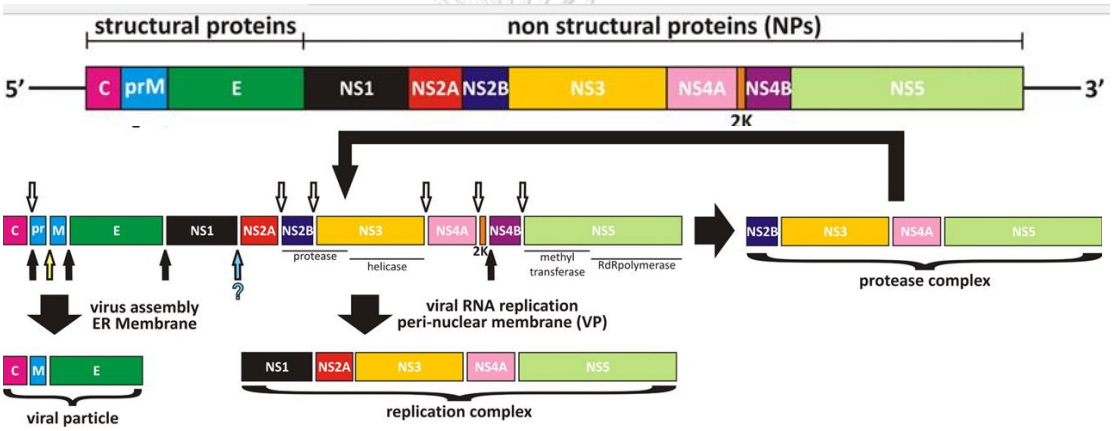
4. การสังเคราะห์ RNA (biosynthesis)

   เมื่อไวรัสล่องลอยอยู่ใน cytoplasm โปรตีน capsid จะสลายไป เหลือเพียง viral genome ที่ล่องลอยอยู่ใน cytoplasm โดย viral genome จะเคลื่อนตัวไปสู่ rough ER viral protein ซึ่งอยู่ในรูปของ polyprotein สายยาวทั้งหมด 1 open reading frame (ORF) จะถูกตัดออกเป็นโปรตีนแต่ละชนิด โดย structural proteins แต่ละตัวเมื่อถูกตัดออกมา จะเกิดเป็น viral particle ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน C, M และ E ในส่วนของ non-structural proteins แต่ละตัวจะมาประกอบกันเป็น viral complex ได้แก่ protease complex และ replication complex ที่เป็น immature

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

complex โดย protease complex จะประกอบด้วย โปรตีน NS2B, NS3, NS4 และ NS5 ส่วน replication complex จะประกอบไปด้วย โปรตีน NS1, NS2A, NS3, NS4A และ NS5 ซึ่ง โปรตีน NS5 จะทำหน้าที่เป็น RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) โดยนำ +ssRNA เป็นต้นแบบในการสร้าง -ssRNAเพื่อเป็นของ RNA ต้นแบบ (RNA template) ในการ replication เพิ่มจำนวน +ssRNAของไวรัสให้มากขึ้น(15)

ซึ่ง viral genome ที่มีความเป็น +ssRNA อยู่แล้ว ส่วนหนึ่งจะเป็นต้นแบบในการtranslate เป็น polyprotein สายยาวโดยโปรตีน NS3 ของไวรัส มีคุณสมบัติเป็น protease จะทำหน้าที่ในการ activate โปรตีนตัวอื่นและเพิ่มปริมาณโปรตีนของไวรัสให้มากขึ้น



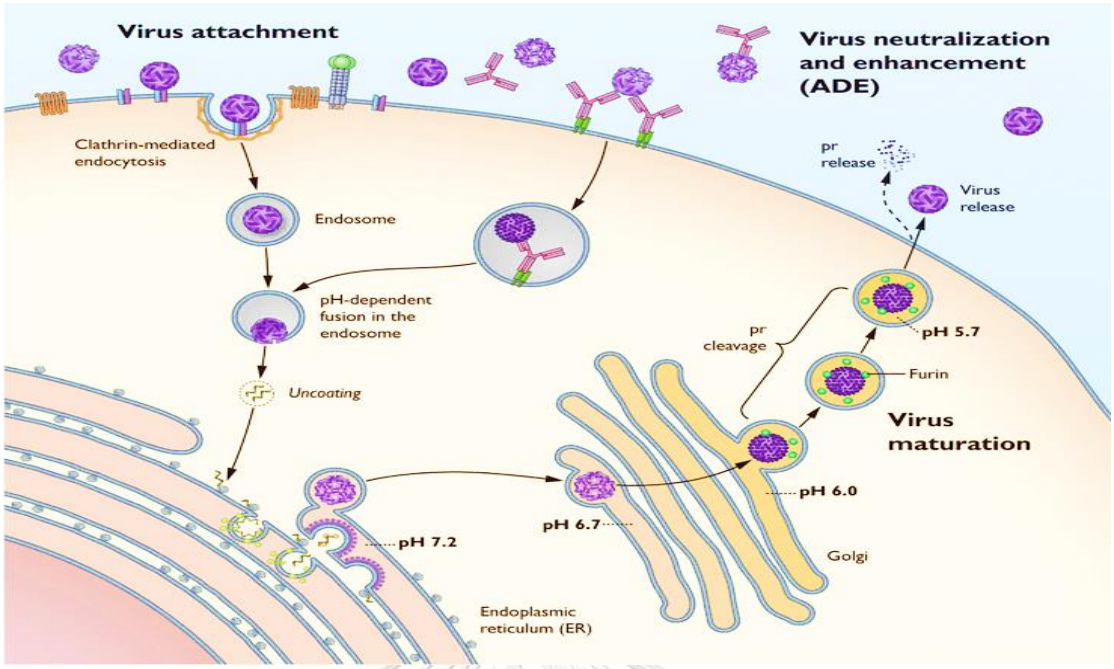
รูปที่ 8 viral genome ของไวรัสเดงกี่ และไวรัสซิกาและ polyprotein ภายหลังจากการ cleave(ภาพจากการศึกษาของ Assenberg และคณะ)(15)

5. การรวมองค์ประกอบ (assembly)

เมื่อจำลองตัวจนได้โปรตีนที่มากพอ โปรตีนในส่วนของ viral complex และ viral particle จะประกอบรวมกันเป็นไวรัสตัวใหม่

6. การปลดปล่อยออกจากเซลล์ (release)

เมื่อโปรตีนทุกตัวประกอบรวมกันแล้ว จะเกิดการ budding ออกจาก ER ในรูปของ immature virus และเดินทางไปยัง Glogi apparatus เกิดการ budding ออกมากจาก Glogi apparatus ในรูปของ mature virus และเดินทางไปยังพื้นผิวของ target cell เพื่อทำการ exocytosis ออกจากเซลล์ พร้อมที่จะ infect เซลล์ต่อๆ ไป



รูปที่ 9 วัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสตระกูล *flaviviridae* สกุล *flavivirus* ในการศึกษานี้ ได้แก่ ไวรัสเดงกี่ และไวรัสซิกา(16)

ไวรัสชิคุนกุยา

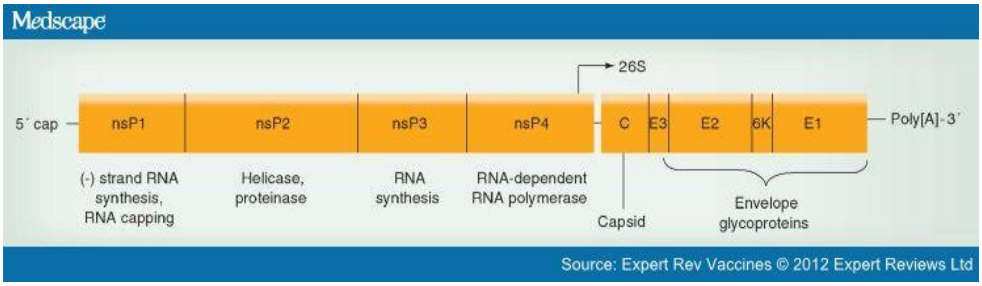
ไวรัสชิคุนกุนยาเป็น enveloped virus มีรูปร่างทรงกลมและมี spike เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 65-70 nm อยู่ในวงศ์ *Togaviridae* สกุล *Alphavirus* มี 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ West African สายพันธุ์ East Central and South Africa (ECSA) และ สายพันธุ์ Asian โดยมีลักษณะของสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิดสายบวก (positive single-stranded RNA, +ssRNA) มีขนาดประมาณ 11 kb โดยสารพันธุกรรมของไวรัสมีทั้งหมด 2 open reading frames (ORFs) ดังนี้

1.) ORF1 เป็นต้นแบบในการสร้าง non-structural polyprotein ได้เป็น 4 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน NSP1, NSP2, NSP3 และ NSP4

2.) ORF2 เป็นต้นแบบในการสร้าง structural polyprotein ได้เป็น 5 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน envelope (E) คือ โปรตีน E1, E2, E3 , capsid protein (C) และ โปรตีน 6k

และส่วนต้นและส่วนปลายของสารพันธุกรรมจะมี untranslated region (UTR) ประกอบด้วย 5’UTR และ 3’UTR ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 10 แสดงถึงองค์ประกอบของโปรตีนบนสารพันธุกรรมของไวรัสชิคุนกุนยา (ภาพจากการศึกษาของ Weaver และ คณะ, 2012)(17)

วัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสชิคุนกุนยา

การจำลองตัวของไวรัสชิคุนกุนยามีขั้นตอน ดังนี้

1. การยึดติด (attachment)

   เริ่มจาก envelope ของไวรัส จะไปจับกับ receptor บนผิวเซลล์อย่างจำเพาะ

2. การเข้าสู่เซลล์ (penetration)

   เมื่อโปรตีน envelope จับกับ receptor บนพื้นผิวของ target cell แล้ว จะเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis รับเอาไวรัสเข้าสู่เซลล์ ในรูปของ endosome โดย membrane ของ target cell จะฟอร์มตัวเป็น endosome membrane เพื่อรับเอาไวรัสเข้าสู่เซลล์

3. การถอดเปลือกหุ้ม (uncoating)

   ภายใน endosome จะมี pH ที่ต่ำ ทำให้โปรตีน E1-E2 เกิด conformation change ทำให้โปรตีน E1 หลุดออกจากโปรตีน E2 โปรตีน E1 จะไปรวมกับ endosome membrane และปลดปล่อย nucleocapsid สู่ cytoplasm

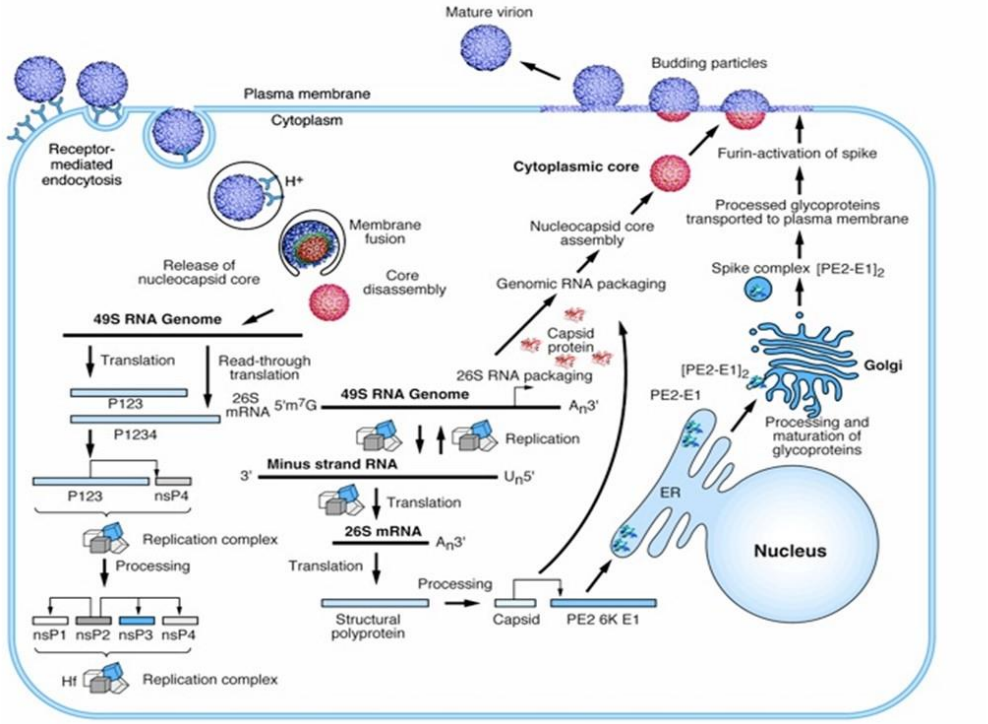
4. การสังเคราะห์ RNA และรวมองค์ประกอบ (biosynthesis and assembly)

   Nucleocapsid จะมีปฏิสัมพันธ์กับ ribosome ทำให้ nucleocapsid สลายไป เหลือเพียงแต่ viral genome ล่องลอยอยู่ใน cytoplasm จาก 2 open reading frames (ORFs) ของ viral RNA จะถูก translate เป็น non-structural polyprotein กับ structural polyprotein โดยจะเริ่ม translate ในส่วนของ non-structural polyprotein ก่อน ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีน P1, P2, P3 และ P4 โปรตีน P4 จะถูกตัดแยกออกมาก่อนเป็นโปรตีน nP4 และ polyprotein คือ P1 P2 และP3 จับรวมกันเป็น replication complex (P123) ที่ยังไม่ stable เพื่อไปทำหน้าที่ replicate +ssRNA ให้เป็น –ssRNA เพื่อเป็น template ในการเพิ่มจำนวน +ssRNA ต่อไป จากนั้น

non-structural protein ที่เหลืออยู่ทั้งหมด จะถูกตัดแยกออกจาก P123 เป็น nsP1, nsP2, nsP3 และ nsP4 โดย nsP1234 จะรวมตัวอีกครั้ง เป็น replication complex ที่ stable และทำหน้าที่ไป replicate –ssRNA ให้เป็น +ssRNA ต่อไปในส่วนของ structural RNA โปรตีน capsid จะถูกตัดออกก่อน โดยโปรตีน capsid ส่วนหนึ่งจะไปประกอบรวมกับ viral genome และ exocytosis ออกจากเซลล์โปรตีน capsid อีกส่วนจะเดินทางไปยัง ER โดยโปรตีน E3 จะส่งสัญญาณให้โปรตีนที่เหลือเดินทางไปยัง ER โปรตีน 6k จะส่งสัญญาณให้ โปรตีน E1 จับกับโปรตีน pE2 เป็น heterodimer เคลื่อนไปยังพื้นผิวของ Glogi apparatus โปรตีน pE2 จะถูกตัดให้เป็น E2 เกิดเป็น mature E1-E2 โปรตีน capsid จะทำปฏิกิริยากับโปรตีน E2 เหนี่ยวนำให้เกิดการ budding ออกจาก Glogi apparatus โปรตีน E1-E2 จะไปล้อมรอบ nucleocapsid ที่บรรจุไว้ด้วย viral genome

5. การปลดปล่อยออกจากเซลล์ (release)

ไวรัสจะออกจากเซลล์ด้วยกระบวนการ expcytosis โดยจะได้รับ host cell membrane ออกมาด้วย



รูปที่ 11 ภาพแสดงวัฏจักรการจำลองตัวของไวรัสตระกูล *Togaviridae* สกุล *Alphavirus* (ภาพจากhttps://www.bio.purdue.edu/lab/kuhn/research.html)(18)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรที่ศึกษา และวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบตัดขวาง (cross sectional) โดยทำการศึกษาทั้งหมด 2,116 ตัวอย่าง จากการเก็บตัวอย่างเลือด และตัวอย่างปัสสาวะที่เหลืออยู่จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการจากงานบริการ และ/หรือในผู้ป่วยที่สมัครใจให้มีการตรวจเพิ่มเติมซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงเฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ โดยผู้ป่วยที่มีไข้สูงแบบเฉียบพลัน คือผู้ป่วยที่แข็งแรงดีมาก่อนไม่มีโรคเรื้อรัง และมีไข้สูงเกิน 37.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาไม่เกิน 7 วัน โดยไม่มีโรคเรื้อรังอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดอาการไข้ ซึ่งเข้ารับการรักษาเป็นผู้ป่วยนอก หรือผู้ป่วยในโดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น กรุงเทพฯ และตรังในช่วงปี พ.ศ. 2558-2559

การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB 070/60) โดยผลการศึกษาจะรายงานเป็นภาพรวม และตัวอย่างที่ส่งตรวจจะเป็นนิรนาม ไม่มีการบ่งบอกแสดงรายชื่อหรือข้อมูลต่างๆ ของผู้ป่วย ที่จะสามารถสืบถึงผู้ป่วยได้

ประชากรที่ศึกษา

กลุ่มประชากรที่มีอาการไข้สูงเฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ ในการศึกษานี้พบในผู้ป่วยช่วงทุกอายุ มีรายละเอียดดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. จังหวัดขอนแก่น

ผู้ป่วยที่มารับการรักษาด้วยอาการของไข้สูงแบบเฉียบพลัน เป็นผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในของโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 จำนวน 1,708 ตัวอย่าง สำหรับการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ และ 1,702 ราย สำหรับการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา

2. จังหวัดกรุงเทพฯ

ผู้ป่วยที่มีไข้สูง และส่งตัวอย่างมาตรวจ ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้ป่วยทั้งหมด เป็นผู้ที่มีที่อาศัยอยู่ใน เขตกรุงเทพฯ

และปริมณฑลในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ เดือน มกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 จำนวนทั้งสิ้น 358 ตัวอย่าง

3. จังหวัดตรัง

ผู้ป่วยที่มีอาการไข้สูงแบบเฉียบพลัน จากโรงพยาบาลชุมชน อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ในช่วงเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2558 จำนวน 50 ตัวอย่าง

สาเหตุที่ทำให้กลุ่มประชากรมีจำนวนที่แตกต่างกัน

จากทั้งสามพื้นที่การศึกษา มีตัวอย่างรวมทั้งหมด 2,116 ตัวอย่าง เนื่องจากในแต่ละพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษา มีจำนวนผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ต่างกัน จึงทำให้จำนวนของตัวอย่างที่ส่งตรวจแตกต่างกัน นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างสำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการเก็บเฉพาะผู้ป่วยไข้เฉียบพลันไม่ทราบสาเหตุในช่วงเวลาที่สนใจ ดังนั้นจึงไม่ได้กำหนดจำนวนของตัวอย่างในการศึกษาที่แน่นอน โดยเฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯ ผู้ทำการศึกษาได้ตรวจวินิจฉัยตามการส่งตรวจของแพทย์ซึ่งได้วินิจฉัยตามอาการของผู้ป่วย โดยตัวอย่างจากกลุ่มประชากรศึกษาจากจังหวัดกรุงเทพฯ ส่วนใหญ่ หนึ่งตัวอย่างตรวจเพียง 1 เชื้อไวรัสเท่านั้น มีเพียงบางตัวอย่างที่ตรวจมากกว่า 1 เชื้อไวรัส และในการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกา ในกลุ่มประชากรกรุงเทพฯ ผู้ป่วยบางราย อาจถูกส่งตัวอย่าง เลือด หรือปัสสาวะมาตรวจเพียงตัวอย่างเดียว หรือ ผู้ป่วยบางราย มี 2 ตัวอย่างที่ส่งมาตรวจวินิจฉัย ได้แก่ ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้จำนวนตัวอย่างที่ได้รับมาจากแต่ละแหล่งตัวอย่างการศึกษาแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้นี้มีจำนวนที่มากกว่าจำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้ ตามสมการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาความชุก โดยจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาหาความชุกสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{Sample size} = \frac{Z^2*(p)*(1-p)}{C^2}$$

โดย z= z value กำหนดให้ที่ 95% confidence level = 1.96

p= ค่าความชุกของการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าความชุกของการติดเชื้อไวรัส

c= ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ กำหนดให้เท่ากับ 5% หรือ 0.05

จำนวนกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

จำนวนกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษาไวรัสเดงกี่

แทนค่า p = ความชุกของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่เท่ากับ 70% หรือ 0.70

$$\text{Sample size} = \frac{1.96^2*(0.70)*(1-0.70)}{0.05^2}$$

$$= 322.69$$

ดังนั้นจะต้องใช้กลุ่มตัวอย่างในการศึกษาความชุกของไวรัสเดงกี่อย่างน้อย 322.69 ตัวอย่าง ข้อมูลในการศึกษาถึงจำมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างประมาณ 1,918 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯ 160 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น 1,708 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากจังหวัดตรัง 50 ตัวอย่าง รวมในการศึกษานี้ ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาการตรวจวินิจฉัยเดงกี่มีทั้งหมด 1,918 ตัวอย่าง

จำนวนกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษาไวรัสชิคุนกุนยา

แทนค่า p = ความชุกของการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเท่ากับ 30% หรือ 0.30

$$\text{Sample size} = \frac{1.96^2*(0.30)*(1-0.30)}{0.05^2}$$

$$= 322.69$$

ดังนั้นจะต้องใช้กลุ่มตัวอย่างในการศึกษาความชุกของไวรัสชิคุนกุนยาอย่างน้อย 322.69 ตัวอย่าง ข้อมูลในการศึกษาถึงจำมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างประมาณ 1,753 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น 1,702 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากจังหวัดตรัง 50 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จำนวนกลุ่มประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษาไวรัสซิกา

ปัจจุบันยังไม่มีประวัติการระบาดของไวรัสซิกาในประเทศไทยจึงยังไม่สามารถที่จะคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่จะต้องใช้ในการศึกษาจากความชุกที่ปีที่ผ่านมาได้ ดังนั้นในการศึกษานี้ จะใช้ตัวอย่างในการศึกษาทั้งหมด 1,949 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯ 197 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากจังหวัดชุมแพทั้งหมด 1,702 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากจังหวัดตรัง ทั้งหมด 50 ตัวอย่าง

ตัวอย่างผู้ป่วย

ตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ โดยจะต้องเป็นบุคคลที่มีสุขภาพแข็งแรงดี ไม่ป่วยเป็นโรคเรื้อรัง ที่ส่งมาเพื่อรับบริการการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุของโรค เข้ารับการรักษาด้วยอาการไข้เฉียบพลันที่โรงพยาบาล และเพื่อตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา หรือไวรัสซิกา

เนื่องจากในระหว่างทำการศึกษา มีการรายงานการติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย และมีการศึกษารายงานภายหลังว่า สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสซิกาในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสซิกา โดยตรวจพบว่ามีปริมาณไวรัส (viral load) ที่สูงกว่า และตรวจพบได้ในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าในซีรัม[6] ดังนั้นตัวอย่างปัสสาวะจึงเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ทางผู้ศึกษาจึงได้ทำการขอให้ทางผู้ส่งตรวจเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ต้องสงสัยว่าจะติดเชื้อไวรัสซิกามาทำการวิเคราะห์ด้วย ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความน่าจะเป็นในการตรวจพบเชื้อไวรัสซิกา ดังนั้นตัวอย่างปัสสาวะจึงเป็นหนึ่งในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเช่นกัน

ในการส่งตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยไวรัสแต่ละชนิด เนื่องจากไม่ได้มีการกำหนดว่า ตัวอย่างที่ส่งจะต้องมาทั้งตัวอย่างเลือดและตัวอย่างปัสสาวะ ทางผู้ส่งตรวจจึงส่งตัวอย่างมาตรวจต่างกัน จึงเป็นสาเหตุให้จำนวนตัวอย่างเลือด และตัวอย่างปัสสาวะมีจำนวนตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยตัวอย่างจากผู้ป่วยจะถูกส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัยนำไปเก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และดำเนินการตรวจเร็วที่สุด (ภายใน 72 ชั่วโมง) ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้

1. ตัวอย่างเลือด(serum หรือ plasma)

ตัวอย่างซีรัม (serum) หรือพาสมา (plasma) ทั้งหมด 2,013 ตัวอย่าง

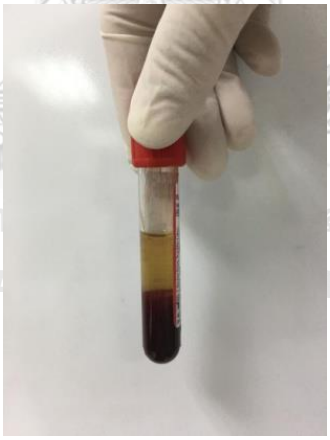
2. ตัวอย่างปัสสาวะ (urine)

ตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด 103 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่าง

1.) การเก็บตัวอย่างเลือด

การตรวจวินิจฉัย โรคไข้เลือดออก โรคไข้ปวดข้อยุงลาย และโรคไข้ไวรัสซิกา ผู้ส่งตรวจจะส่งตัวอย่างซีรัม (serum) หรือพาสมา (plasma) มาที่ศูนย์เชี่ยวชาญไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการศึกษานี้จะเริ่มจากการนำตัวอย่างซีรัม หรือพาสมา โดยปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที ให้ของเหลวแยกชั้น และเก็บเฉพาะของเหลวใสส่วนบน

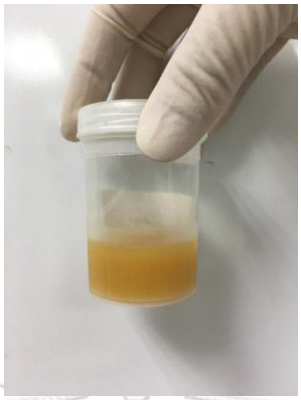


รูปที่ 12 แสดงถึง serum และ plasma หลังจากการปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่อง centrifuge (ภาพจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก)

2.) การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

การตรวจวินิจฉัย โรคไข้ไวรัสซิกา ตรวจจากตัวอย่างปัสสาวะควบคู่กับตัวอย่างซีรัมหรือพาสมา โดยผู้ส่งตรวจจะส่งตัวอย่างปัสสาวะบรรจุมาในกระปุก ผู้ทำการศึกษาจะทำการย้ายปัสสาวะส่วนหนึ่งลงใน microcentrifuge tube 1.5ml เพื่อให้ง่ายต่อการทำการศึกษา

ต่อไป อีกส่วนหนึ่งจะเก็บไว้ในกระปุกที่ทางผู้ส่งตรวจส่งมาดังเดิม และพันรอบฝาด้วย parafilm เพื่อป้องกันตัวอย่างปัสสาวะหกออกจากกระปุก



รูปที่ 13 ภาพตัวอย่างกระปุกปัสสาวะจากทางผู้ส่งตรวจ ส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาพจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก)

ตัวอย่างที่ส่งตรวจทั้งหมดถูกส่งมาเก็บรักษา ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาสาเหตุของไวรัสที่นำโดยยุง ได้แก่ ไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา โดยจะทำการตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ดังนี้

การสกัดRNA ของไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา

การสกัดRNA จากตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ

สกัดสารพันธุกรรม RNA จากตัวอย่างซีรัมหรือพาสมาและปัสสาวะด้วยวิธีเดียวกันคือ ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RibospinvRD II (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea) ตามรายละเอียดของชุดสกัด ดังนี้

การเตรียม carrier RNA

ละลาย carrier RNA ลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มใส ที่บรรจุอยู่ในหลอดด้วย nuclease-free water 370 μl แล้ว vortex ให้เข้ากัน

ขั้นตอนการสกัด

1. แบ่ง carrier RNA ที่เตรียมไว้ ลงใน microcentrifuge tube 1.5ml หลอดละ 7 μl
2. เติม NVL bufferปริมาตร 300 μl
3. ใส่ตัวอย่างซีรัมหรือพาสมา ปริมาตร 150 μl
4. Vortex ให้สารทุกอย่างเข้ากัน และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
5. เติม RB1 bufferปริมาตร 350 μl และ vortex ให้เข้ากัน
6. ย้ายสารละลายทั้งหมดด้วยปริมาตร 750 μl ลงใน spin column
7. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,500 xg หรือ 1,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และ เทสารละลายในส่วนของ collection tube ทิ้ง
8. ใส่ RBW buffer ปริมาตร 500 μl
9. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,500 xg หรือ 1,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และเทสารละลายในส่วนของ collection tube ทิ้ง
10. ใส่ RNW buffer ปริมาตร 500 μl
11. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,500 xg หรือ 1,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และ เทสารละลายในส่วนของ collection tube ทิ้ง
12. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifugeอีกครั้งที่ 1,500 xg หรือ 1,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
13. ย้าย spin column ใส่ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml
14. เติม nuclease-free water ปริมาตร 50 μl ลงกลาง spin column และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
15. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,500 xg หรือ 1,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
16. ทิ้ง spin column และเก็บ RNA ไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี่

การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse transcription PCR

นำ RNA ที่ได้จากการสกัดแล้ว เปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยการทำ Reverse transcription PCR โดย ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) ด้วย random hexamer primers โดยมีวิธีการดังนี้

1. เติม 10 nM Random hexamer ปริมาตร 1 μl ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml และเจือจางด้วย DEPC (Diethypyrocarbonate) ปริมาตร 5 μl
2. ใส่ RNA ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 3 μl
3. บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. บ่มในน้ำแข็ง 5 นาที
5. ใส่ Impromp II (Promega, Madison, WI, USA) ปริมาตร 7.5 μlและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา5 นาที
6. บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. บ่มต่อที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา
8. นำไปปั่นตก และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจหาไข้เลือดออก Dengue virus RNA ด้วยวิธี Semi-nested RT-PCR

มีการเตรียมสารและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไวรัสเดงกี่ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ semi-nested-PCR ต่อ 1 reaction

สารเคมี	ปริมาตร (μl)
2X mastermix (AmpMaster™ HS-Taq, GeneAll®)	5
10 μM forward primer	0.3
10 μM reverse primer	0.3
DEPC treated water	5
cDNA	2
Total volume	12.6

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์(primer) ที่ใช้ในการตรวจสอบและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสเดงกี่ ในการทำปฏิกิริยาของ PCR(19)

Primer	Name	PCR cycle	nucleotide sequence 5′→3′
Forward primer	DenF10019-10038	1st, 2nd	GTSTGGAAYAGRGTKT GGAT
Reverse primer	DenUTR_R2	1st	GAGACAGCAGGATCT GTGG
Reverse primer	DenR10442-10464	2nd	GGCWGCACRGYTTRCT CAA

หมายเหตุ: N= A/G/C/T, D= A/G/T, H= A/C/T, S= C/G, Y= C/T, K= G/T, W= A/T

ตารางที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 1stPCR เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี่

Cycle	Temperature (°C)	Time (min)	
Initial denaturation	95	2	
Denaturaion	95	0.25	40 cycles
Annealing	50	0.35	
Extension	72	1	
Final extension	72	5	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 2nd PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี่

Cycle	Temperature (°C)	Time (min)	
Initial denaturation	95	2	
Denaturation	95	0.25	40 cycles
Annealing	53	0.35	
Extension	72	1	
Final extension	72	5	

โดยการทำ PCR ทั้งสองครั้งนั้นด้วยเครื่อง thermal cycler (veriti™, Applied Biosystems, United State of America)

การจำแนกชิ้น DNA ด้วยวิธี Gel eletrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปจำแนกขนาดของ DNA ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาทีซึ่งจะตรวจสอบขนาด DNA ด้วย 1,000bp DNA ladder และเปรียบเทียบผลจาก positive control และ negative control หลังจากนั้นนำ gel ไปส่องดูภายใต้แสง UV จะได้ผลดังนี้

ตารางที่ 6 ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเดงกี่ serotype ต่างๆ

Serotype	Product size (bp)
1	450
2	419
3	429
4	350

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทำให้ DNA ของสารพันธุกรรมไวรัสเดงกีให้บริสุทธิ์ และการทำ sequencing

ตัด gel ตามขนาดในตารางที่ 6 แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Expin Combo GP (GeneAll Biotechnology, Seoul, South Korea) และส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการ First BASE (Seri Kembangan, Selangor, Malaysia) และนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสด้วย nucleotide Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

การตรวจไข้ปวดข้อยุงลาย Chikungunya virus RNA ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

ภายหลังจากการสกัด RNA นำไปเพิ่มจำนวนด้วย Real-time RT-PCR ด้วยเครื่อง Real-time (ViiA™ 7, Singapore) ด้วยไพร์เมอร์และ probe ดังนี้

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (primer) และ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสชิคุนกุนยา ในการทำปฏิกิริยาของ Real-time RT-PCR(20)

Primer	Name	nucleotide sequence 5′→3′
Forward primer	CHIKV6856	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA
Reverse primer	CHIKV6981	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC
Probe	CHIKV6919-FAM	AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG

และแปรผลที่ได้ โดยค่า Ct (cycle threshold/ crossing point) <38 ถือว่า positive

การตรวจหาเชื้อไวรัสซิกา

การตรวจหาไข้ไวรัสซิกาZika virus RNA ด้วยวิธี Real-time RT-PCR

ภายหลังจากสกัด RNA นำไปเพิ่มจำนวนด้วย Real-time RT-PCR ด้วยเครื่อง Real-time (ViiA™ 7, Singapore) ด้วยไพร์เมอร์และ probe ซึ่งครอบคลุมบริเวณยีน NS5 ของไวรัสซิกา ดังนี้

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์(primer) และ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสซิกา ในการทำปฏิกิริยาของ Real-time RT-PCR(21)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Primer	Name	nucleotide sequence 5′→3′
Forward primer	ZIKV1086	CCGCTGCCCAACACAAG
Reverse primer	ZIKV1162	CCACTAACGTTCTTTTGCAGAC AT
Probe	ZIKV1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA

และแปรผลที่ได้ โดยค่า Ct (cycle threshold/ crossing point) <38 ถือว่าให้ผล positive

ความไวและความจำเพาะในการตรวจ

ความไวและความจำเพาะในการตรวจไวรัสเดงกี่

จากการศึกษาโดยการนำตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ทั้ง 4 serotypes มา cloning และ ทำ 10 fold-Serial dilution เพื่อตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ DenF10019-38, DenUTR_R2 และ DenR10442-10464 ที่มีความจำเพาะในบริเวณยีน NS5 ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR พบว่าสามารถตรวจจับไวรัสได้ ในตัวอย่างที่มี viral load ต่ำเพียง 0.01 copies/ml และพบว่าไพรเมอร์ทั้งสาม มีความจำเพาะต่อบริเวณยีน NS5 ของไวรัสเดงกี่เท่านั้น โดยได้ทำการทดสอบด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR กับตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี่ และไวรัสชิคุนกุนยา พบว่า ไพรเมอร์ทั้งสาม สามารถตรวจจับได้เฉพาะไวรัสเดงกี่ แต่ไม่สามารถ ตรวจจับไวรัส ชิคุนกุนยาได้(19)

ความไวและความจำเพาะในการตรวจไวรัสชิคุนกุนยา

จากการศึกษาของ Lanciotti และคณะพบว่าการตรวจหาไวรัสชิคุนกุนยาโดยใช้ไพรเมอร์ CHIKV6856, CHIKV6981 และprobe ด้วย CHIKV6919-FAMprobe ซึ่งมีความไวในการตรวจคือ 0.9 PFU จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยมีความจำเพาะต่อไวรัสชิคุนกุนยา และไม่มีความจำเพาะต่อไวรัส o'nyong-nyongvirus(ONNV), Ross River virus, Mayaro virus, Semliki Forest virus, Sindbis(SINV) virus, western equine encephalitis virus, equine encephalitis และ Venezuelan equine encephalitis สายพันธุ์ 1AB, 1C, 1D และ 1E(20)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความไวและความจำเพาะในการตรวจไวรัสซิกา

จากการศึกษาของ Lanciotti และคณะพบว่าการตรวจหาไวรัสซิกา ด้วยไพรเมอร์ ZIKV1086, ZIKV1162 และprobe ด้วยZIKV1107-FAMprobe โดยทดสอบความไวของการตรวจจับ RNA ของ ไวรัสซิกา คือ 25 copies/ml และมีความจำเพาะต่อไวรัสซิกาเท่านั้น ไม่สามารถตรวจจับ dengue virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4), West Nile virus, St. Louis encephalitis virus, yellow fever virus, Powassan virus, o'nyong-nyongvirus (ONNV), Semliki Forest virus, chikungunya virus และ spondweni virus ได้(21)

การตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR เพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอ เนื่องจากตัวอย่างเลือด ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นเพียงตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยเพียงครั้งเดียว (single samples) หากเป็นการเก็บตัวอย่างแบบสองครั้ง คือเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่ผู้ป่วยมาตรวจ และเก็บตัวอย่างครั้งที่สอง ภายหลังจากที่หายจากอาการป่วยแล้ว หรือที่เรียกว่า การเก็บแบบ paired samples จะเป็นการเก็บตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพมากกว่า แต่ปัจจุบันยากที่จะเป็นไปได้เนื่องจากข้อจำกัดในการศึกษาหลายๆ อย่างดังนั้นในการศึกษานี้ จึงตรวจ dengue markers ตัวอื่นๆ เพิ่มเติมได้แก่ โปรตีน NS1, IgM และ IgG antibodies เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ดังนั้นจึงทำการตรวจหา NS1 IgM และ IgG ด้วยวิธี ELISA ต่อไป

การตรวจหา Dengue markers คือ NS1 IgM และ IgGด้วยวิธี ELISA

จากการตรวจหาไวรัสเดงกี่ทั้งหมด 1,918 ราย เลือกตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลันมาทั้งหมด 367 ตัวอย่าง (ตัวอย่างทั้งหมดที่เลือกมาจะเป็นตัวอย่างที่มีข้อมูลจำนวนวันที่เป็นไข้ของผู้ป่วย) มาตรวจหาโปรตีน NS1, IgM และ IgG antibodies (Dengue markers) ด้วย ELISA

การตรวจหาโปรตีน NS1 ของไวรัสเดงกี่ด้วยวิธี ELISA

1. นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด
2. Sample dilution

ทำให้ตัวอย่างซีรัมเจือจางลงด้วย sample buffer เป็นอัตราส่วน 1:2 โดยใส่ตัวอย่างคนไข้ 200 μl และ sample buffer 400 μl ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml. vortex ให้เข้ากัน

3. Sample incubation

ใส่ diluted samples, calibrator, positive, negative controls อย่างละ 100 μl ลงในแต่ละ microplate well ที่ถูกเคลือบพื้นผิวด้วย Monoclonal mouse anti-dengue virus NS1 ปิดทับด้วย แผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

4. นำแผ่นฟรอยด์ที่ปิดไว้ออก และทำการ wash ที่เครื่องอัตโนมัติ โดยตั้งค่าให้ล้างด้วย wash buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 450 μl ต่อ microplate well

5. Conjugate incubation

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ใส่ enzyme conjugate (peroxidase-labelled antibody) ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well ปิดทับด้วย แผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดด ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

6. นำแผ่นฟรอยด์ที่ปิดไว้ออก และทำการล้างด้วยเครื่องอัตโนมัติ โดยตั้งค่าให้ล้างด้วย wash buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 450 μl ต่อ microplate well

7. Substrate incubation

ใส่ chromogen/substrate solution ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well ปิดทับด้วย แผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

8. ขั้นหยุดปฏิกิริยา

ใส่ stop solution ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well

9. การวัดค่า

อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายในเวลา 30 นาที

การตรวจหา dengue IgM antibody ด้วยวิธี ELISA

1. นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด

2. Sample dilution

ทำให้ ตัวอย่างซีรัมเจือจางลงด้วย sample buffer เป็นอัตราส่วน 1:101 โดยใส่ตัวอย่างคนไข้ 100 μl และ sample buffer 1,000 μl ลงใน microcentrifuge tube 1.5 mlและ vortex ให้เข้ากัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. Sample incubation

ใส่ diluted samples, calibrator, positive, negative controls อย่างละ 100 μl ลงในแต่ละ microplate wellที่ถูกเคลือบพื้นผิวด้วย dengue virus antigens ปิดทับด้วยแผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

4. นำแผ่นฟรอยด์ที่ปิดไว้ออก และทำการล้างด้วยเครื่อง อัตโนมัติโดยตั้งให้ล้างด้วย wash buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 450 μl ต่อ microplate well

5. Conjugate incubation

ใส่ enzyme conjugate (peroxidase-labelled antibody) ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well ปิดทับด้วย แผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

6. นำแผ่นฟรอยด์ที่ปิดไว้ออก และทำการล้างด้วยเครื่อง อัตโนมัติโดยตั้งให้ล้างด้วย wash buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 450 μl ต่อ microplate well

7. Substrate incubation

ใส่ chromogen/substrate solution ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well ปิดทับด้วย แผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

8. ขั้นหยุดปฏิกิริยา

ใส่ stop solution ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well

9. การวัดค่า

อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายในเวลา 30 นาที

การตรวจหา dengue IgG antibody ด้วยวิธี ELISA

1. นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด

2. Sample dilution

ทำให้ ตัวอย่าง serum เจือจางลงด้วย sample buffer เป็นอัตราส่วน 1:101 โดยใส่ตัวอย่างคนไข้ 100 μl และ sample buffer 1,000 μl ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml vortex ให้เข้ากัน

3. Sample incubation

ใส่ diluted samples, calibrator, positive, negative controls อย่างละ 100 μl ลงในแต่ละ microplate well ที่ถูกเคลือบพื้นผิวด้วย highly purified virus particles of dengue virus type 2 ปิดทับด้วยแผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

4. นำแผ่นฟรอยด์ที่ปิดไว้ออก และทำการล้างด้วยเครื่อง อัตโนมัติโดยตั้งให้ล้างด้วย wash buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 450 μl ต่อ microplate well

5. Conjugate incubation

ใส่ enzyme conjugate (peroxidase-labelled antibody) ลงไป 100 μl ในแต่ละ microplate well ปิดทับด้วยแผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

6. นำแผ่นฟรอยด์ที่ปิดไว้ออก และทำการล้างด้วยเครื่อง อัตโนมัติโดยตั้งให้ล้างด้วย wash buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 450 μl ต่อ microplate well

7. Substrate incubation

ใส่ chromogen/substrate solution ลงไป 100 µl ในแต่ละ microplate well ปิดทับด้วยแผ่นฟรอยด์ เพื่อปกป้องจากแสงแดดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

8. ขั้นหยุดปฏิกิริยา

ใส่ stop solution ลงไป 100 µl ในแต่ละ microplate well

9. การวัดค่า

อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายในเวลา 30 นาที

สถิติที่ใช้ในการศึกษา

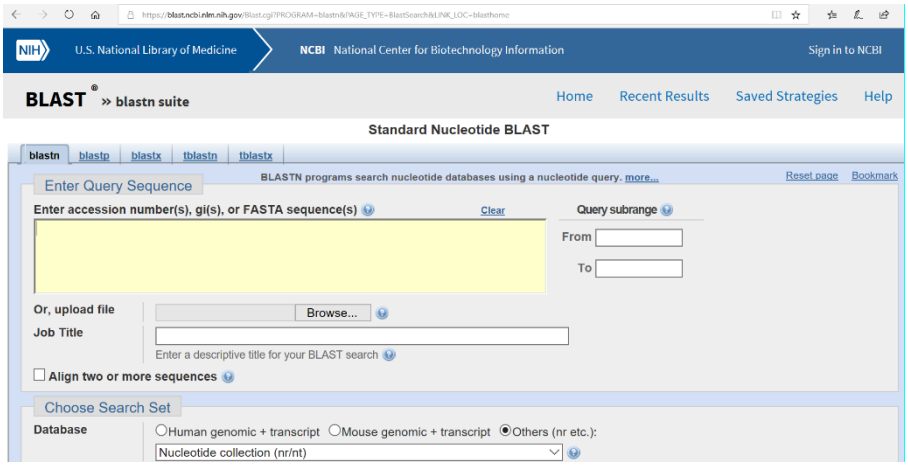
การศึกษานี้เป็นการศึกษาในเชิงพรรณนา ดังนั้นข้อมูลที่แสดงจะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เท่านั้น

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

การวิเคราะห์ทางโมเลกุลในตัวอย่างที่มีการตรวจพบว่ามีการติดเชื้อไวรัส

-ทำการยืนยันการวิเคราะห์การตรวจวินิจฉัย การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ หลังจากการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทำ DNA sequencing ที่จะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (Genbank)จากโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จาก https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 14 จากโปรแกรม BLAST ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

-จากการตรวจวินิจฉัย การติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา และ ไวรัสซิกา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR จะวิเคราะห์จากค่า Ct (cycle threshold) โดยค่า Ct ที่ต่ำกว่า 38 จะให้ผล positive หรือแปลว่า ตรวจพบเชื้อไวรัสดังกล่าว

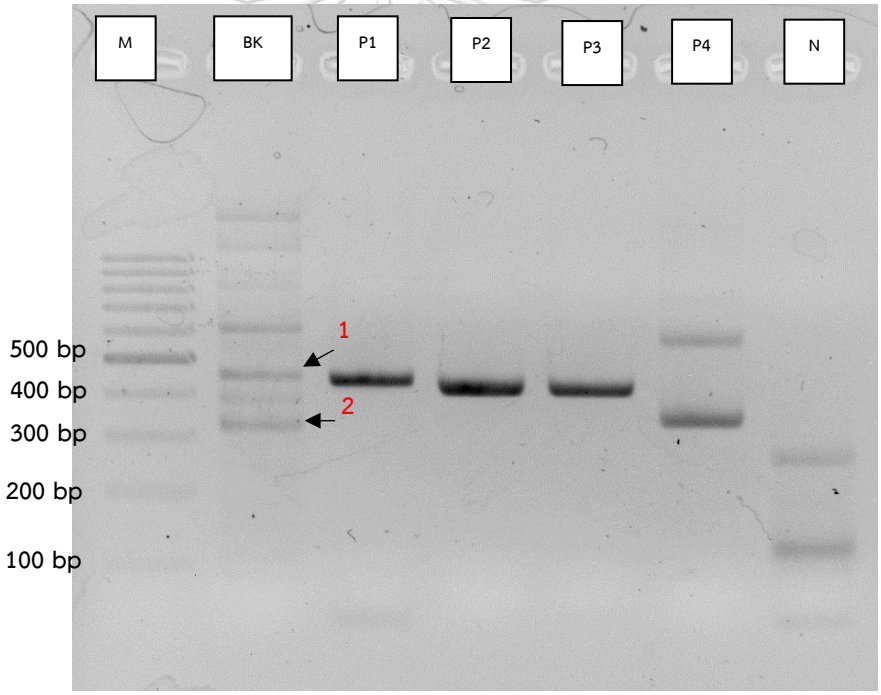
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR

จากการนำตัวอย่างซีรัม (serum) และพาสมา (plasma) ของผู้ป่วยแบบ Single specimens ที่มีการเก็บเฉพาะในช่วง Acute febrile phase จำนวน 1,918 ตัวอย่าง มาตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณยีน NS5 ของไวรัสเดงกี่ (ตารางที่3) หลังจากการตรวจสอบขนาดจะได้ผลดังรูปที่ 15

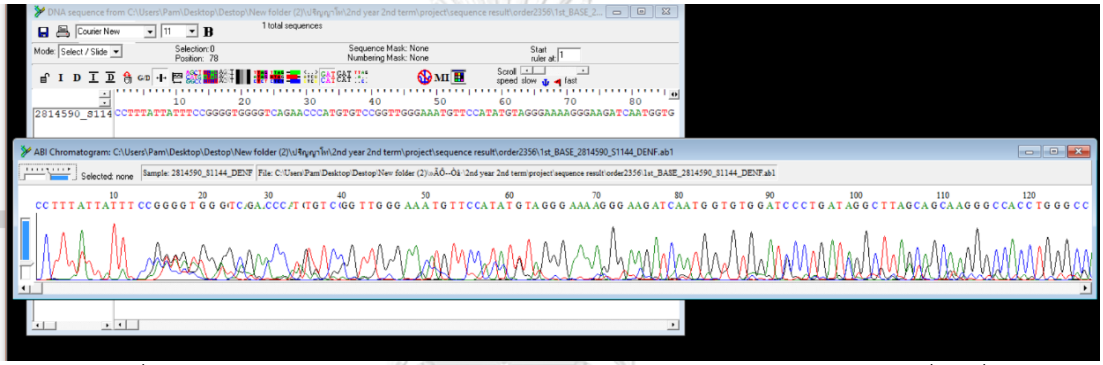


รูปที่ 15 ภาพถ่ายจากgel ภายหลังจากเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR

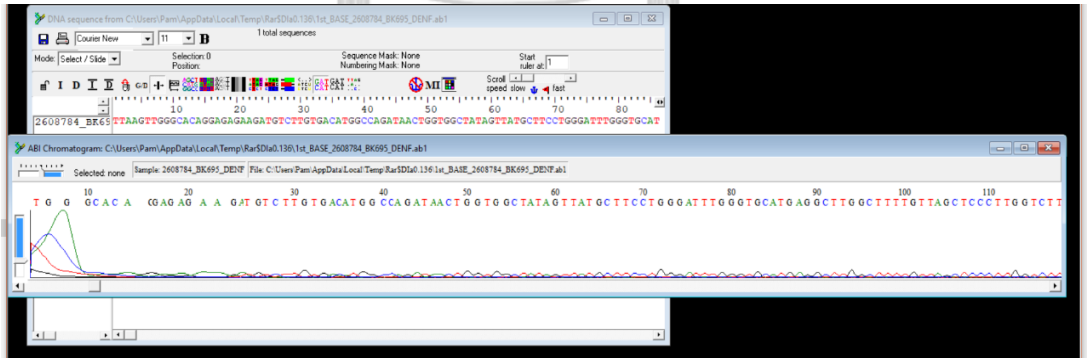
โดย M คือ DNA ladder marker, BK คือ ตัวอย่างของผู้ป่วย,P1 คือ positive control ไวรัสเดงกี่ สายพันธุ์ 1 (DENV-1), P2 คือ positive control ไวรัสเดงกี่ สายพันธุ์ 2 (DENV-2),

P3 คือ positive control ไวรัสเดงกี่ สายพันธุ์ 3 (DENV-3), P4 คือ positive controlไวรัสเดงกี่ สายพันธุ์ 1 (DENV-4), N คือ Negative control, เลข 1 คือแถบ DNA แถบที่ 1 ที่ตัดไปส่ง sequence และเลข 2 คือแถบ DNA แถบที่ 2 ที่ตัดไปส่ง sequence

เนื่องจากมี แถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ positive control ทั้งหมด 2 แถบ โดย แถบ DNA ที่ 1 มีขนาดใกล้เคียงกับ P1 และ แถบ DNA ที่ 2 มีขนาดใกล้เคียงกับ P4 จึงทำการตัดเจล ที่มี DNA ทั้ง 2 แถบนี้ไปส่ง sequencing เพื่อตรวจสอบลำดับ nucleotides ต่อไป โดยลำดับ nucleotides ที่ได้รับกลับมาจะมีลักษณะดังรูป 16 และ 17 ตามลำดับ



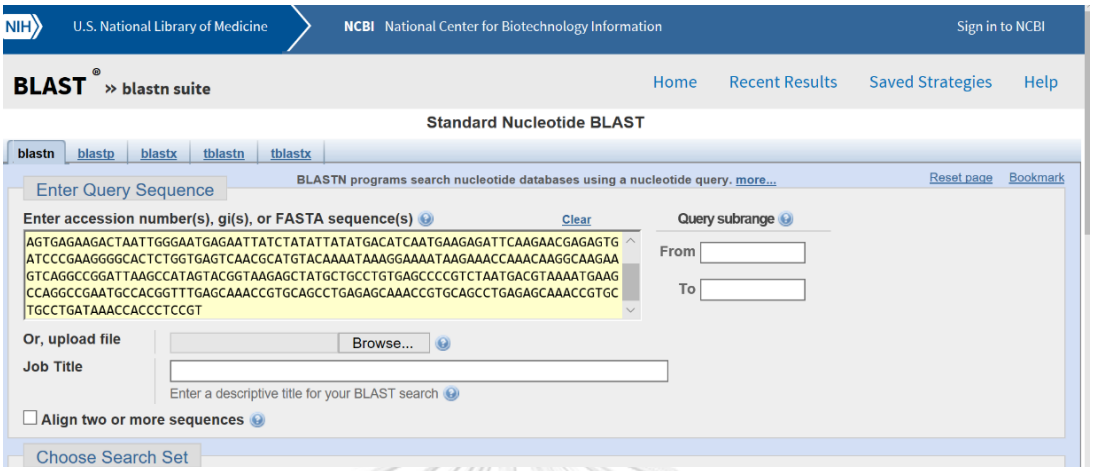
รูปที่ 16 แสดงถึงลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR แถบ DNA แถบที่ 1 ที่ได้รับกลับมาจากการตรวจสอบโดย WardMedic (http://www.wardmedic.com/contactus.html))



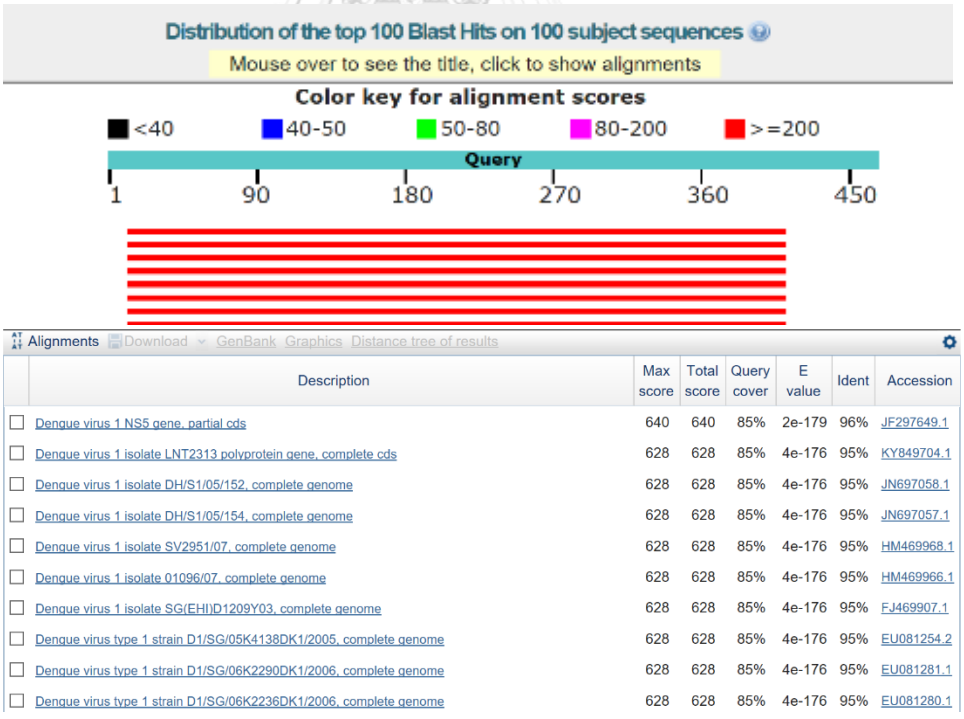
รูปที่ 17 แสดงถึงลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR แถบ DNA แถบที่ 2 ที่ได้รับกลับมาจากการตรวจสอบโดย WardMedic (http://www.wardmedic.com/contactus.html)

นำลำดับ nucleotides ที่ได้จากการ sequencing ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน

GenBank(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) เพื่อเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ที่มีความใกล้เคียงกับลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR ของการศึกษานี้

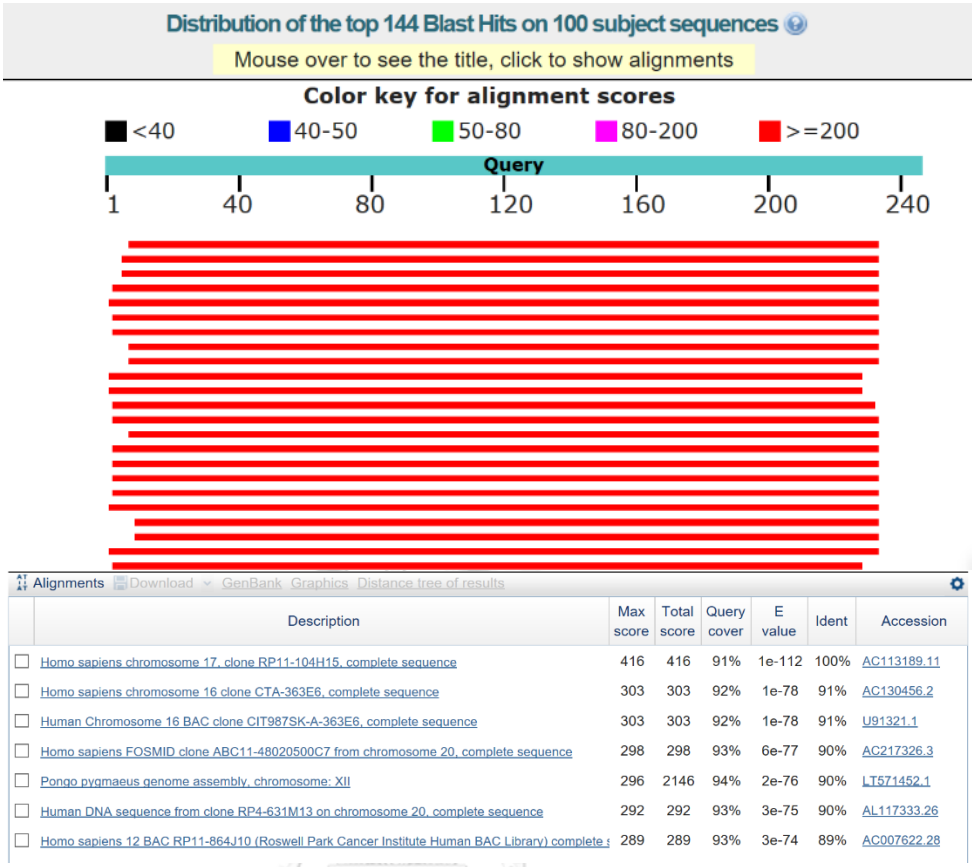


รูปที่ 18 แสดงการนำลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ไป blast ใน GenBank



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Dengue virus 1 NS5 gene, partial cds	640	640	85%	2e-179	96%	JF297649.1
Dengue virus 1 isolate LNT2313 polyprotein gene, complete cds	628	628	85%	4e-176	95%	KY849704.1
Dengue virus 1 isolate DH/S1/05/152, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	JN697058.1
Dengue virus 1 isolate DH/S1/05/154, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	JN697057.1
Dengue virus 1 isolate SV2951/07, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	HM469968.1
Dengue virus 1 isolate 01096/07, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	HM469966.1
Dengue virus 1 isolate SG(EHI)D1209Y03, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	FJ469907.1
Dengue virus type 1 strain D1/SG/05K4138DK1/2005, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	EU081254.2
Dengue virus type 1 strain D1/SG/06K2290DK1/2006, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	EU081281.1
Dengue virus type 1 strain D1/SG/06K2236DK1/2006, complete genome	628	628	85%	4e-176	95%	EU081280.1

รูปที่ 19 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ใน GenBank ของแถบ DNA แถบที่ 1 ที่ได้ส่ง sequencing

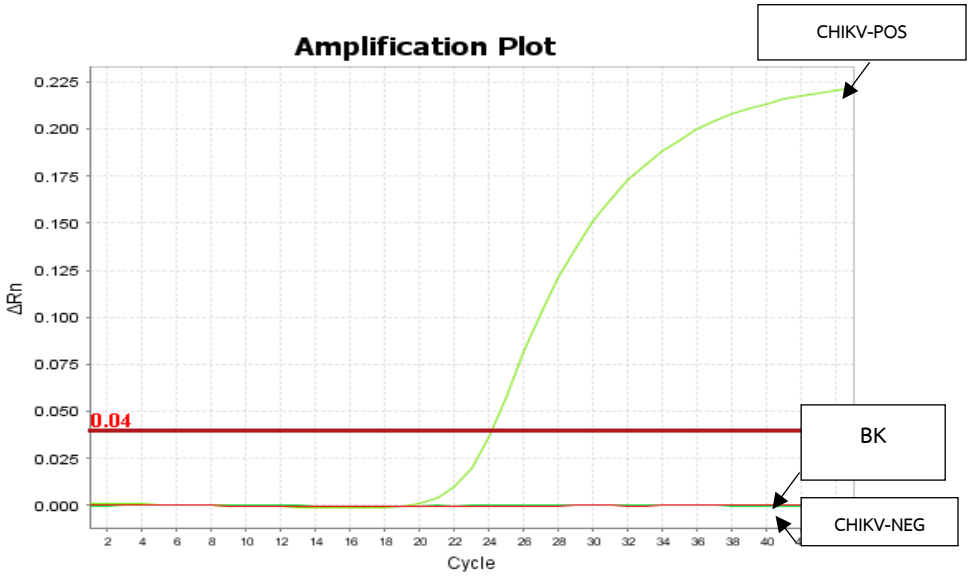


รูปที่ 20 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ใน GenBankของแถบ DNA แถบที่ 2 ที่ได้ส่ง sequencing

ผลจากการนำลำดับ nucleotides ของผลิตภัณฑ์ PCR ไปเปรียบเทียบใน GenBank พบว่า ลำดับ nucleotides ของแถบ DNA แถบที่ 1 มีความใกล้เคียงกับ DENV-1 บริเวณยีน NS5 96% ดังรูปที่ 9 และลำดับ nucleotides ของแถบ DNA แถบที่ 2 มีความใกล้เคียง 100% กับลำดับ nucleotides ของโครโมโซมที่ 17 ของคน ดังรูปที่ 20

ผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

จากการนำตัวอย่างซีรัม (serum) และพาสมา (plasma) ของผู้ป่วยแบบ Single specimens ที่เก็บเฉพาะในช่วง Acute febrile phase จำนวน 1,753 ตัวอย่าง มาตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR บริเวณ NSP4 gene จะได้ผลดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยาด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

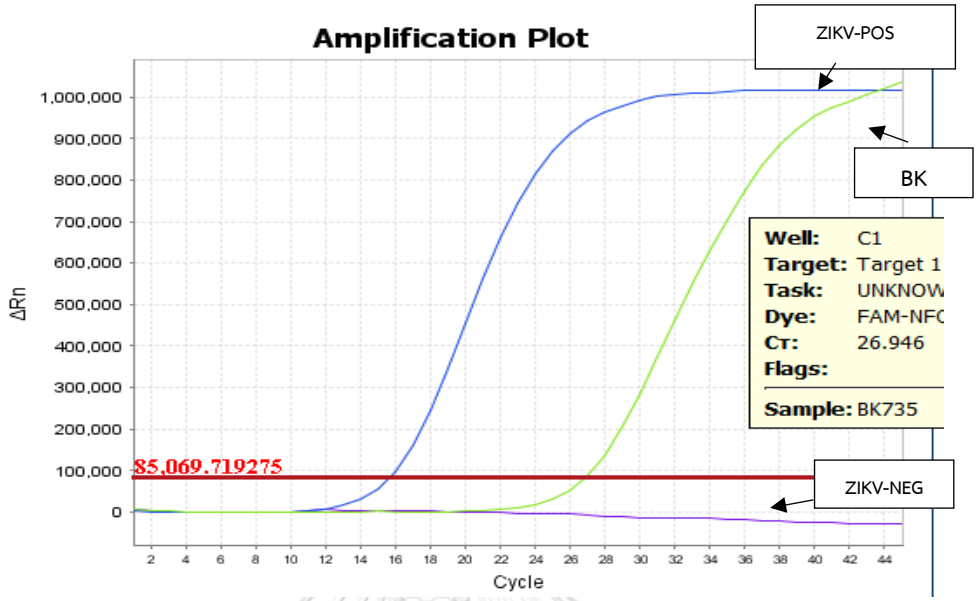
โดย BK แทนเส้นกราฟของตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน, CHIK-POS แทนเส้นกราฟ positive control ของไวรัสชิคุนกุนยา และ CHIK-NEG แทน negative control ของไวรัสชิคุนกุนยา

จากผลการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยาพบว่าจากตัวอย่าง ทั้งหมด 1,753 ตัวอย่าง ไม่พบการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน จากกราฟแสดงถึงเส้นกราฟของตัวอย่างผู้ป่วย ซึ่งไม่สามารถอ่านค่า Ct ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิกาด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

จากผลการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิกา จากตัวอย่างซีรัม พาสมา และปัสสาวะในระยะ Acute febrile phase จากผู้ป่วยไข้เฉียบพลันทั้งหมด 1,949 ตัวอย่างด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR บริเวณ NSP4 gene จะได้ผลดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงผลจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกาด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

โดย BK แทนเส้นกราฟของตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน, ZIKV-POS แทนเส้นกราฟ positive control ของไวรัสซิกา และ ZIKV-NEG แทน negative control ของไวรัสซิกา

จากผลการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกา พบว่าจากทั้งตัวอย่างซีรัม พาสมา และปัสสาวะ ในระยะ Acute febrile phase จากผู้ป่วยไข้เฉียบพลันทั้งหมด 1,949 ตัวอย่าง ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสซิกาทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยตรวจพบจากตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะเท่านั้นซึ่งผลการตรวจพบ จะเป็นไปตามกราฟดังรูปที่ 22 โดยพบว่าค่า Ct มีค่าต่ำกว่า 38

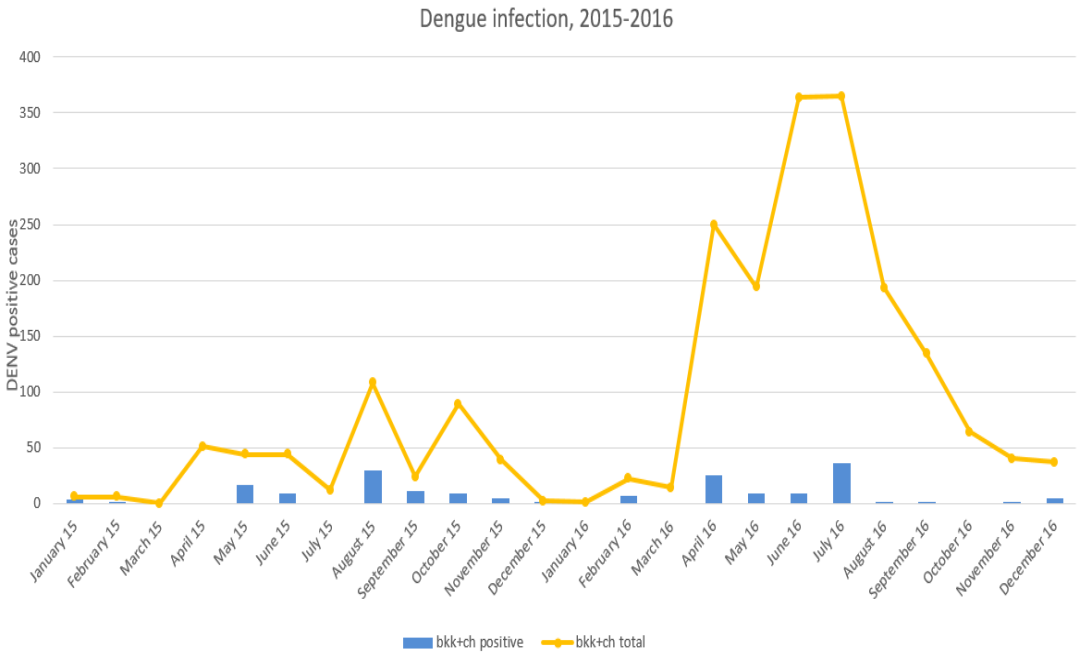
ตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ จากจังหวัดกรุงเทพฯ จังหวัดขอนแก่น และจังหวัดตรัง เป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยทุกเพศ และทุกวัย ซึ่งจากการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี่ 1,918 ตัวอย่างพบ RNA ของไวรัสเดงกี่ 181 ตัวอย่าง (9.4%) ตรวจหาไวรัสซิกาทั้งหมด 1,949 ตัวอย่าง พบ RNA ของไวรัสซิกาทั้งหมด 4 ตัวอย่าง (0.2%) และไม่พบ RNA ของไวรัสชิคุนกุนยาจากการตัวอย่างทั้งหมด1,753 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การตรวจพบ RNA ของไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกาแจกแจงตามเพศ อายุ และสถานที่

	Dengue Virus		**Chikungunya Virus**		**Zika Virus**	
	No. (%)	+ ve (%)	No. (%)	+ ve (%)	No. (%)	+ ve (%)
Gender						
Male	1,009 (52.6)	106 (5.5)	922 (52.6)	0	995 (51.1)	2 (0.1)
Female	858 (44.7)	75 (3.9)	780 (44.5)	0	898 (46.1)	2 (0.1)
Unknown	51 (2.7)	0	51(2.9)	0	56 (2.9)	0
Total	1,918 (100)	181 (9.4)	1,753 (100)	0	1,949 (100)	4(0.2)
Age (yrs)						
0-2	215 (11.2)	20(1.0)	203 (11.6)	0	212 (10.9)	0
3-5	277 (14.4)	21(1.1)	270 (15.4)	0	275 (14.1)	1 (0.1)
6-12	491 (25.6)	48 (2.5)	473 (27)	0	475 (24.4)	0
13-18	188 (9.8)	23(1.2)	180 (10.3)	0	196 (10.1)	0
>19	623 (32.5)	53 (2.8)	577 (32.9)	0	701 (36)	3 (0.2)
Unknown	124 (6.5)	16 (0.8)	50 (2.9)	0	90 (4.6)	0
Total	1918 (100)	181 (9.4)	1753 (100)	0	1949 (100)	4 (0.2)
Location						
Bangkok	160 (8.3)	45 (2.4)	1 (0.1)	0	197 (10.1)	4 (0.2)
KhonKaen (Chumphae)	1708 (89.1)	136 (7.1)	1702 (97.1)	0	1702 (87.3)	0
Trung (Sikao)	50 (2.6)	0	50 (2.9)	0	50 (5.6)	0
Total	1,918 (100)	181 (9.4)	1,753 (100)	0	1,949 (100)	4 (0.2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2559



รูปที่ 23 แสดงขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการไข้เฉียบพลัน เพื่อนำมาตรวจหาไวรัสเดงกี่ และจำนวนตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2559

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการจำแนก serotypes ของไวรัสเดงกี่

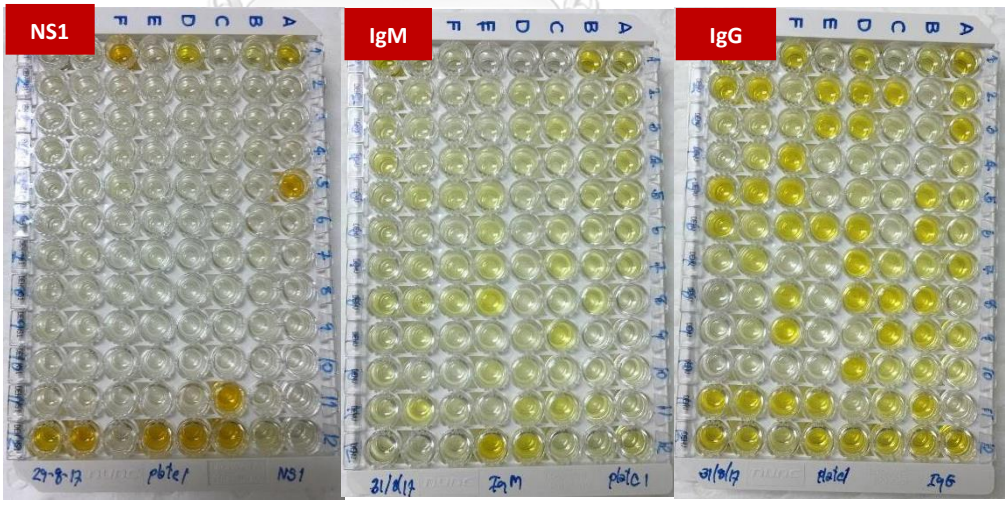
จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ในผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน 1,918 ตัวอย่าง พบ RNA ของไวรัสเดงกี่ในตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ทั้งหมด 181 ตัวอย่าง และหลังจากนั้นส่งตัวอย่างไป sequencing ทำให้เราทราบถึง serotype ของตัวอย่างที่ positive ได้ โดยพบว่า จากตัวอย่างทั้งหมด 181 ตัวอย่าง พบ DENV-1 ทั้งหมด 59 ตัวอย่างคิดเป็น 32.6% DENV-2 ทั้งหมด 21 ตัวอย่างคิดเป็น 11.6% DENV-3 ทั้งหมด 25 ตัวอย่างคิดเป็น 13.81% และ DENV-4 ทั้งหมด 76 ตัวอย่างคิดเป็น 41.99% ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 จำแนกสายพันธุ์ (serotypes) ของไวรัสเดงกี่ ที่พบในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2558-2559

Dengue virus Serotype	No. (%)
DENV-1	59 (32.6)
DENV-2	21 (11.6)
DENV-3	25 (13.8)
DENV-4	76 (42)
Total	181 (100)

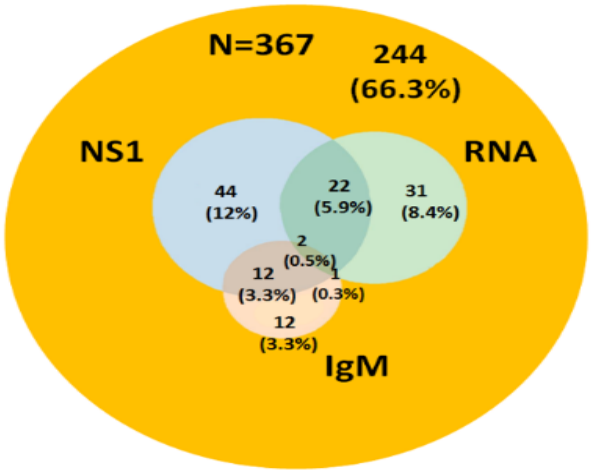
การตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ด้วยเทคนิค ELISA

หลังจากการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR ทั้งหมด 1,918 ราย เลือกตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลันมาทั้งหมด 367 ราย (ตัวอย่างที่ถูกเลือกมาทั้งหมด จะต้องเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน และมีข้อมูลจำนวนวันที่เป็นไข้ของผู้ป่วย) มาตรวจหา Dengue markers เพิ่มเติม ได้แก่ โปรตีน NS1, IgM และ IgG antibodies ด้วย ELISA



รูปที่ 24 การตรวจ Dengue markers ได้แก่ โปรตีน NS1, IgM และ IgG antibody ด้วยเทคนิค ELISA

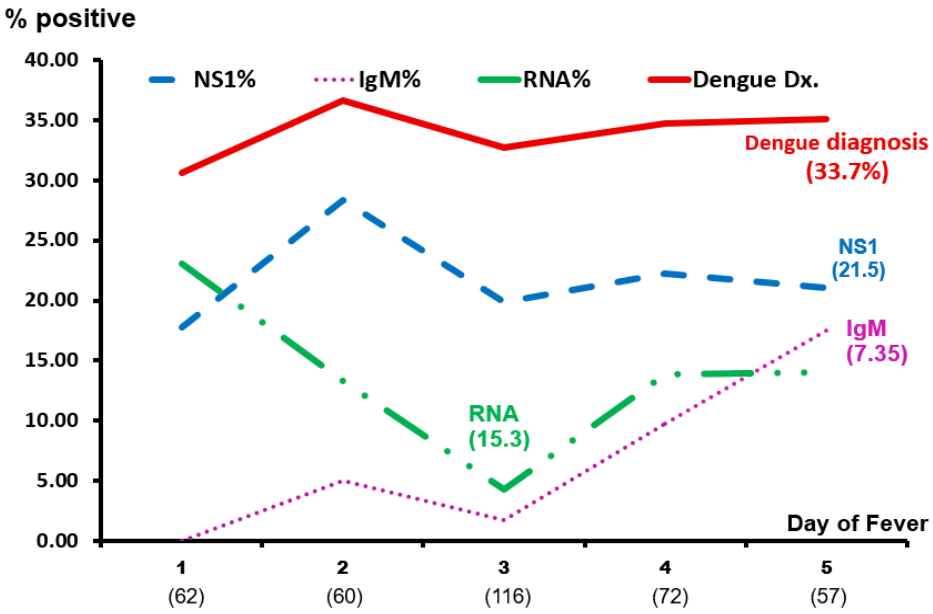
	number	%
NS1	44	12
NS1+IgM	12	3.3
IgM	12	3.3
NS1+RNA	22	5.9
NS1+IgM+PCR	1	0.3
IgM+RNA	2	0.5
RNA	31	8.4
negative	244	66.3
positive	124	33.7



รูปที่ 25แสดงผลจากการตรวจสอบ ไวรัสเดงกี่ จาก Dengue markers ได้แก่ RNA ของไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR, โปรตีน NS1 และ IgM antibody ด้วยเทคนิค ELISA

เนื่องจากกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาเป็นกลุ่มประชากรผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ในการพิจารณาอาการของผู้ป่วยไข้เฉียบพลันในระยะ Acute febrile phase คือ ช่วงวันที่ 1-7 หลังจากที่ผู้ป่วยแสดงอาการไข้ จะพิจารณาที่ Dengue markers เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี่สามารถติดได้มากกว่า 1 ครั้ง Dengue markers ที่ใช้ในการพิจารณาสำหรับผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ได้แก่ viral RNA, โปรตีน NS1 และ IgM antibody ซึ่ง Dengue markers ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะสามารถตรวจพบได้ในช่วงวันแรกๆ ของอาการไข้ ถึงแม้ว่าจะติดเชื้อไวรัสเดงกี่มาก่อนหน้านั้นก็ตาม

แต่ถ้าพิจารณา IgG antibody การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ครั้งแรก จะสามารถตรวจพบ IgG antibody ได้ช้ากว่า dengue markers ตัวอื่นๆ นั่นคือจะพบได้ในช่วงวันหลังๆ ของอาการไข้ แต่จะยังคงอยู่ในร่างกายของผู้ป่วยไปตลอด ถึงแม้ว่าจะหายจากอาการป่วยแล้วก็ตาม และเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ซ้ำ การตรวจพบ IgG antibody จะตรวจพบได้เร็วกว่าการติดเชื้อครั้งแรก เนื่องจาก IgG antibody นั้นถูกกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี่อีกครั้งหนึ่งทำให้ตรวจพบ IgG antibody ในช่วงวันแรกๆ ของอาการเป็นไข้ และเมื่อพิจารณาผลของการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ของ markers ทั้ง 3 ร่วมกับจำนวนวันเป็นไข้ จะได้ผลดังรูปที่ 26

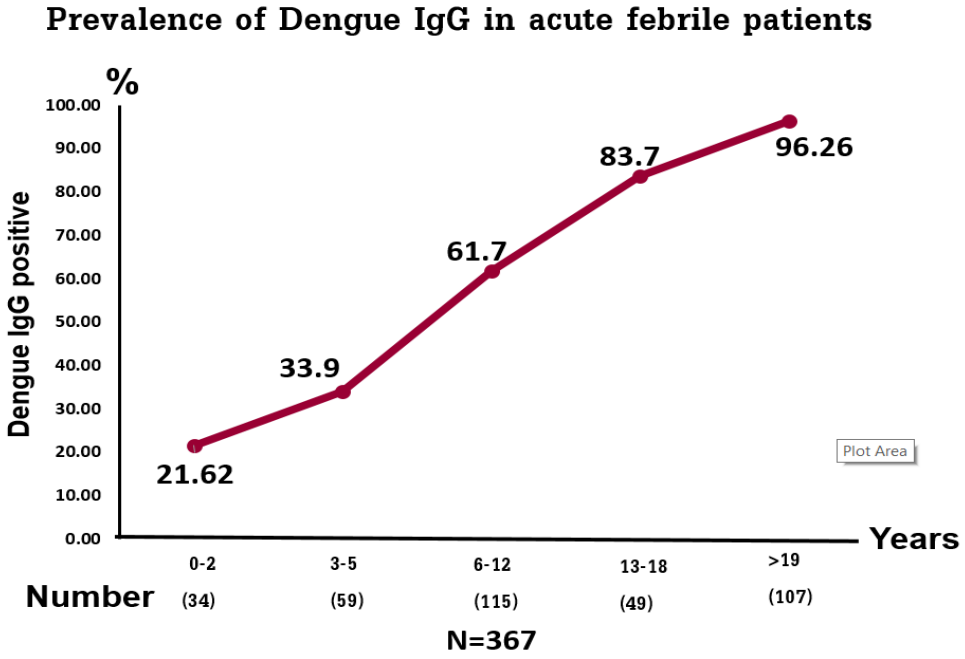


รูปที่ 26 %positive ของ Dengue markers ในผู้ป่วยไข้เฉียบพลันต่อจำนวนวันที่เป็นไข้

จากรูปที่ 26 พบว่า %RNA positive โดย semi-nested RT-PCR มากที่สุดในวันแรกของการเป็นไข้ ส่วน %NS1 positive มากที่สุดในวันที่ 2 ของการเป็นไข้ และ %positive ของ IgM จะสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการเป็นไข้ ซึ่งเมื่อพิจารณา ทั้ง 3 markers รวมกัน จะพบว่าประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่จะเพิ่มสูงขึ้น

IgG antibody เป็น Dengue marker ที่สามารถบอกได้ว่า เป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ครั้งที่เท่าไหร่ หากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เป็นตัวอย่างแบบ paired specimens แต่ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างแบบ single specimens จึงไม่สามารถที่จะพิจารณาได้ว่าเป็นการติดเชื้อเดงกี่ครั้งที่เท่าไหร่ แต่หากนำผลการศึกษา IgG antibody มาพิจารณาร่วมช่วงอายุของผู้ป่วยจะได้ผลการศึกษาดังรูปที่ 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 27 %positive ของ IgG antibodies ต่อช่วงอายุ ของผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน

เมื่อพิจารณา IgG antibody ในแต่ละช่วงอายุของผู้ป่วย จะพบว่าการมี IgG antibody จะเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มสูงขึ้นของผู้ป่วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดทั้งในซีรัม (serum) และพาสมา (plasma) ส่วนการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR จากตัวอย่างเลือดทั้งในซีรัม และพาสมา การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสซิกา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR จากตัวอย่างซีรัม พาสมาและปัสสาวะในผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลันในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 จากผู้ที่อาศัยในจังหวัดกรุงเทพฯ ที่อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และอำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

การศึกษานี้ในแต่ละพื้นที่ ทำการเก็บตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ ในจำนวนที่ไม่เท่ากัน และทำการตรวจหาเชื้อไวรัสแต่ละชนิดตามคำตรวจวินิจฉัยของแพทย์ในพื้นที่นั้นๆ ดังนั้นจึงทำให้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิกุนคุนยา และไวรัสซิกามีจำนวนไม่เท่ากัน แต่การศึกษาเพื่อตรวจหาไวรัสทั้ง 3 นั้น มีจำนวนมากกว่าจำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้ อย่างที่แสดงไว้ในหัวข้อประชากรที่ศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ไวรัสเดงกี่ (Dengue Virus)

การศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดทั้งในซีรัม (serum) และพาสมา (plasma) ส่วนการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR จากตัวอย่างเลือดทั้งในซีรัม และพาสมา การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสซิกา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR จากตัวอย่างซีรัม พาสมาและปัสสาวะในผู้ป่วยที่มีไข้เฉียบพลันในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 จากผู้ที่อาศัยในจังหวัดกรุงเทพฯ ที่อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และอำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

การศึกษานี้ในแต่ละพื้นที่ ทำการเก็บตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ ในจำนวนที่ไม่เท่ากัน และทำการตรวจหาเชื้อไวรัสแต่ละชนิดตามคำตรวจวินิจฉัยของแพทย์ในพื้นที่นั้นๆ ดังนั้น

จึงทำให้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิกุนคุนยา และไวรัสซิกามีจำนวนไม่เท่ากัน แต่การศึกษาเพื่อตรวจหาไวรัสทั้ง 3 นั้น มีจำนวนมากกว่าจำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้ อย่างที่แสดงไว้ในหัวข้อประชากรที่ศึกษา

หลังจากการตรวจวิจฉัยไวรัสเดงกี่ ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR นำตัวอย่างที่ positive จากการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้งหมด 181 ตัวอย่าง ส่ง sequencing เพื่อทำการยืนยันว่าเป็นไวรัสเดงกี่ นอกจากนี้ยังสามารถทราบถึงสายพันธุ์ (serotypes) ของไวรัสเดงกี่ในแต่ละตัวอย่างได้เช่นกัน ซึ่งเป็น DENV-4 , DENV-1, DENV-3 และ DENV-2 คิดเป็น 42%, 32.6%, 13.8% และ 11.6% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ L'Azou และคณะพบว่าในการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 ถึงปี พ.ศ. 2556 เป็น DENV-1 มากที่สุด DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ตามลำดับ(22) จะเห็นได้ว่าในแต่ละปี การติดเชื้อไวรัสเดงกี่ในประเทศไทย จะพบได้ทุกๆ สายพันธุ์ (serotype) และมีการเปลี่ยนชนิดของสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดไปแต่ละช่วงปีด้วยเช่นกัน

ในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่บางราย เป็นการติดเชื้อที่มีปริมาณไวรัส (viral load) ที่ต่ำ ทำให้การตรวจวินิจฉัย ด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR ไม่สามารถตรวจจับได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกที่จะศึกษา dengue markers ตัวอื่นๆ ด้วยวิธี ELISA ได้แก่ โปรตีน NS1, IgM และ IgG antibodies เพิ่มเติม จากตัวอย่างผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ที่นำมาตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ทั้งหมด 1,918 ตัวอย่าง เลือกมาทั้งหมด 367 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างที่เลือกจะต้องมีข้อมูลจำนวนวันที่เป็นไข้ทั้งหมด และพบว่าสามารถตรวจพบโปรตีน NS1 ได้มากที่สุด ดังรูปที่ 23 และเมื่อพิจารณารวมกับจำนวนวันที่เป็นไข้ พบว่า

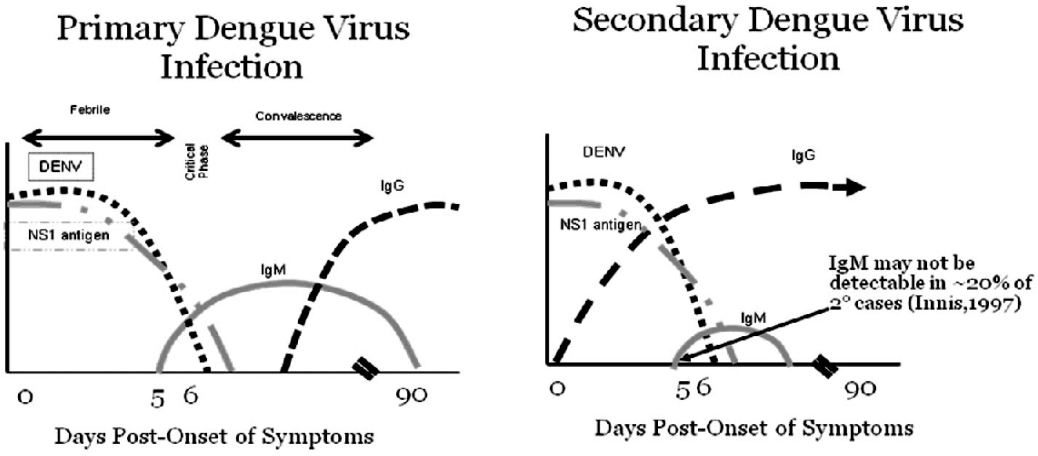
1.) %positive ของ RNA จะสูงในวันที่ 1 ของการเป็นไข้

2.) %positive ของโปรตีน NS1 จะสูงในวันที่ 2 ของการเป็นไข้

3.) %positive ของ IgM antibodies จะสูงในช่วงวันที่ 5 ของการเป็นไข้

และหากตรวจด้วย markers ทั้ง 3 ควบคู่กันไป จะเห็นว่า % positive ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่จะสูงขึ้น ดังรูปที่ 26 ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Cheah และคณะที่ว่า viral RNA, โปรตีน NS1 และ IgM antibody จะตรวจพบได้ในช่วงวันแรกๆ ของอาการไข้ของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่(23) ดังรูปที่ 26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

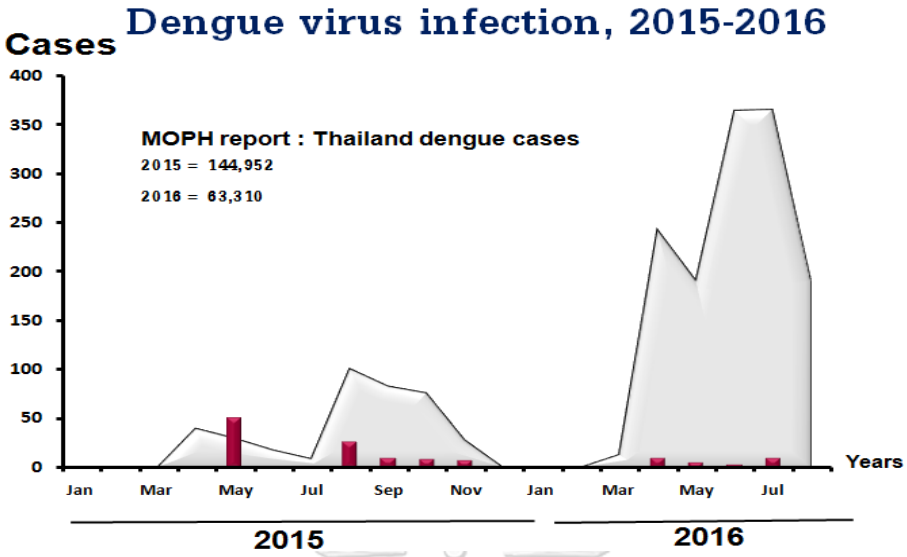


รูปที่ 28 แสดงถึงการพบ Dengue markers เปรียบเทียบกับจำนวนวันที่เป็นไข้ (23)

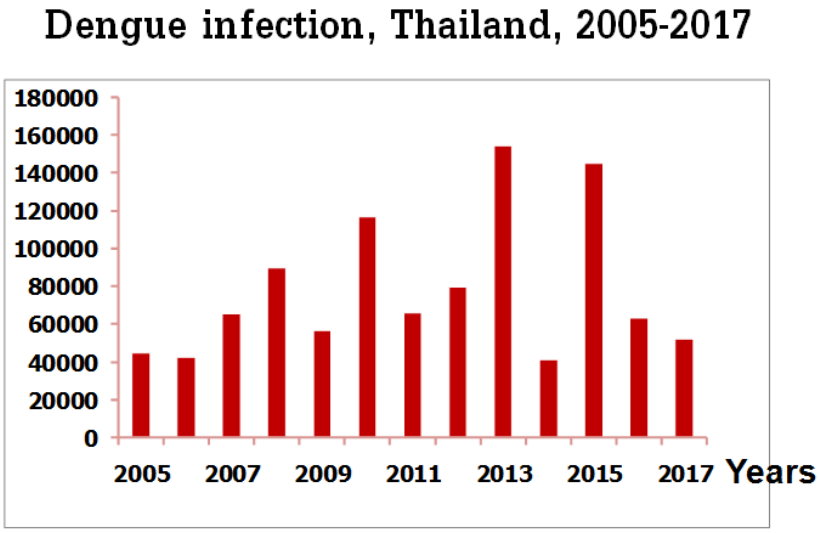
ส่วนการพิจารณา % positive ของ IgG antibodies ต่อช่วงอายุของผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน พบว่ายิ่งอายุมากขึ้นจะพบ %positive ของ IgG antibodies ก็จะเพิ่มสูงขึ้น ดังรูปที่ 25

โดยการศึกษานี้พบว่ามีการตรวจพบ RNA ของไวรัสเดงกี่ ในปี พ.ศ. 2558 มากกว่าในปี พ.ศ. 2559 ทั้งๆ ที่จำนวนผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ที่เข้ารับการตรวจ ในปี พ.ศ. 2559 มีมากกว่า พ.ศ. 2558 (รูปที่ 21) ซึ่งในผลของการศึกษานี้ ตรงกับการรายงานของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ที่พบโรคไข้เลือดออก ในปี พ.ศ. 2558 มากกว่าปี พ.ศ. 2559 กล่าวคือ มีการรายงานการตรวจพบไข้เลือดออก ของกระทรวงสาธารณสุขทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2558 จำนวนทั้งสิ้น 144,952 ราย และในปี พ.ศ. 2559 จำนวน 63,310 ราย หรือเปรียบเทียบอุบัติการณ์เป็น 96.76/แสนประชากร ในปี พ.ศ. 2558 222.58/แสนประชากร ในปีพ.ศ. 2559 (รูปที่ 29)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

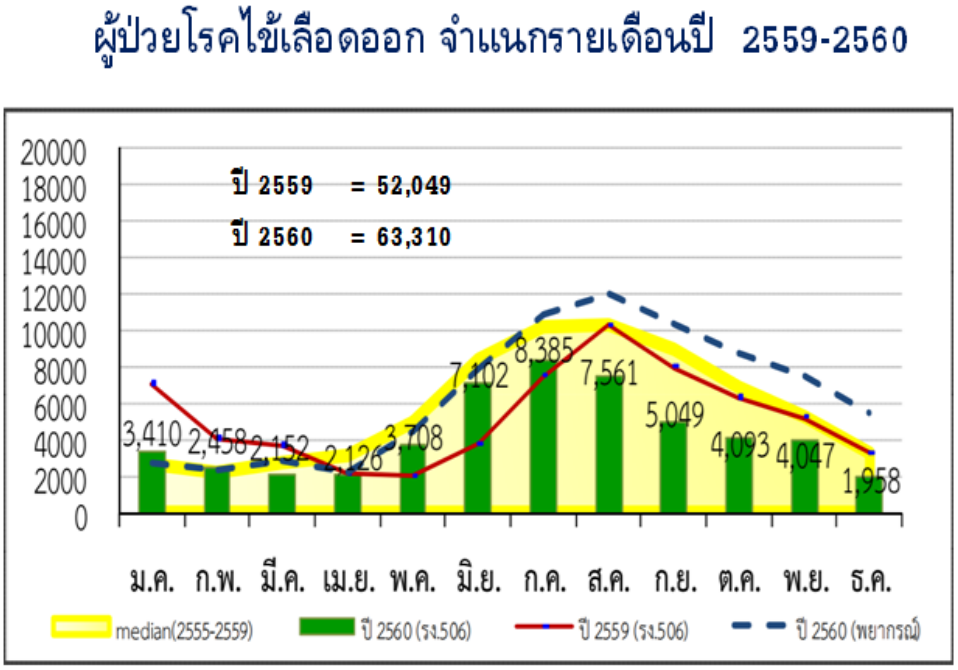


รูปที่ 29 แสดงขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการไข้เฉียบพลันเพื่อนำมาตรวจหาไวรัสเดงกี่ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 และพบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจำนวน 144,952 ในปี พ.ศ. 2558 และจำนวน 63,310 รายในปี พ.ศ. 2559 (ภาพจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขไทย) (24)



รูปที่ 30 แสดงจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก ที่พบในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2560 (ค.ศ.2005-2017) (ภาพจาก สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (24))

จากรูปที่ 30 ซึ่งเป็นการรายงานจากกรมควบคุมโรค จะเห็นว่าการระบาดของไข้เลือดออก พบได้ทุกปีแต่จะพบมากปีเว้นปี หรือปีเว้น 2 ปี และเมื่อเปรียบเทียบการติดเชื้อของไวรัสเดงกี่ ในปี พ.ศ. 2558 มากกว่าในช่วงปี พ.ศ. 2559 (รูปที่ 30) ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ว่า การระบาดของโรคไข้เลือดออก จะเกิดขึ้นปีเว้นปี หรือ 1-3 ปี(3) และจากการศึกษานี้ร่วมกับผลของกรมควบคุมโรค จะพบการระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยทั้งในปี พ.ศ. 2558 พ.ศ. 2559 และในปี พ.ศ. 2560 แต่ไม่ใช่การระบาดใหญ่ของโรค ดังนั้นถ้าเป็นไปตามคาดหมาย ในปี พ.ศ. 2561 อาจจะมีการระบาดใหญ่ของโรคไข้เลือดออก



รูปที่ 31 แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในแต่ละเดือน ในช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 และค่าเฉลี่ยในการตรวจพบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2559(ภาพจากระบบรายงานการเฝ้าระวัง 506 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค)(24)

จากการศึกษาของกรมควบคุมโรค พบว่าการตรวจพบไข้เลือดออก จะพบได้ตลอดทั้งปี แต่จะพบมากเมื่อเริ่มเข้าฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาวนั้นคือตั้งแต่ต้นเดือนพฤษภาคม จน ถึงเดือนพฤศจิกายน ของทุกๆ ปี จากรูปที่ 31 โดยจะมีสภาพภูมิอากาศชื้น เหมาะแก่การแพร่พันธุ์ของยุง ซึ่งเป็นพาหะของโรคไข้เลือดออก

ไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya Virus)

นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวินิจฉัย ไวรัสชิคุนกุนยา โดยไม่สามารถตรวจพบไวรัสชิคุนกุนยา จากผู้ป่วยไข้เฉียบพลันที่ไม่ทราบสาเหตุ ทั้งหมด 1,753 ตัวอย่าง โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการตรวจพบไวรัสชิคุนกุนยา ในประเทศไทยดังนี้

1.) พ.ศ. 2501 มีรายพบการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาครั้งแรก ในจังหวัดกรุงเทพฯ

2.) พ.ศ. 2531 เริ่มมีการระบาดที่จังหวัดสุรินทร์

3.) พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดขอนแก่น และปราจีนบุรี

4.) พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดเลย นครศรีธรรมราช และหนองคาย

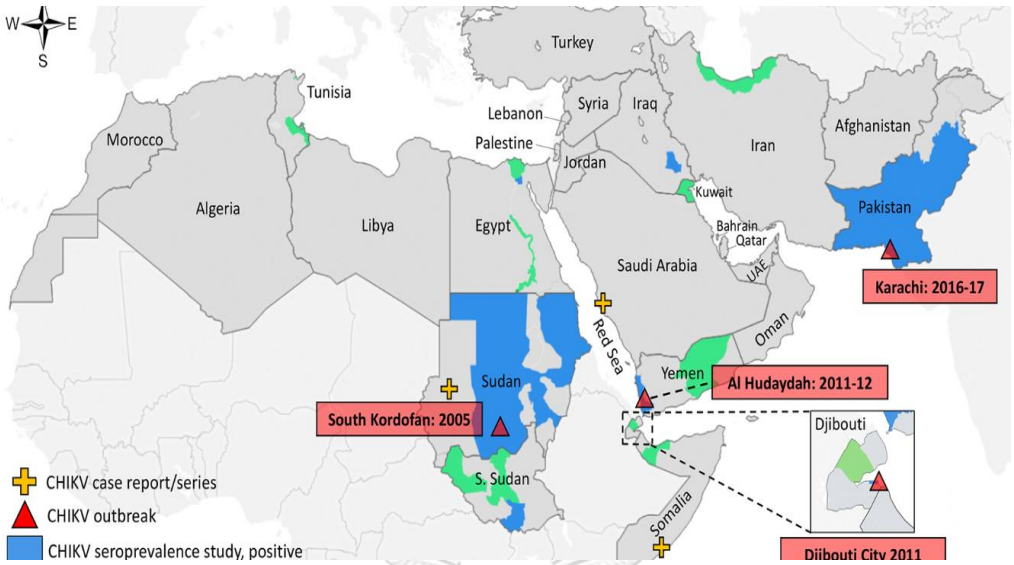
5.) พ.ศ. 2551 มีการระบาดใหญ่ที่จังหวัดนราธิวาส

6.) พ.ศ. 2552 ระบาดใหญ่ในพื้นที่ภาคใต้จนถึงจังหวัดชุมพร

7.) พ.ศ. 2556 ที่จังหวัดบึงกาฬซึ่งเป็นการระบาดครั้งล่าสุด

จากการศึกษาของ Humphrey และคณะพบว่ามีการรายงานการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ในปี พ.ศ. 2558 ที่ประเทศ ซูดาน พ.ศ. 2559 ที่ประเทศโซมาเลียและประเทศปากีสถาน(25) ส่วนการรายงานจากกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณะสุข ไม่พบการรายงานการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในปี พ.ศ. 2558-2560 ในประเทศไทยแต่พบผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2561 ถึง วันที่ 4 มิถุนายน พ.ศ. 2561 ในประเทศไทย ทั้งหมด 34 ราย จากจังหวัดนราธิวาส และจังหวัดภูเก็ต และไม่พบการเสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา(26)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 32 การรายงานการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในประเทศต่างๆ จากการศึกษาของ Humphrey และคณะ(25)

โดยคาดการณ์ว่าการระบาดใหญ่ที่จังหวัดบึงกาฬในปี พ.ศ. 2556 นั้น ไวรัสชิคุนกุนยาน่าจะข้ามมาจากประเทศเพื่อนบ้าน คือกัมพูชาและลาว เนื่องจากพื้นที่จังหวัดบึงกาฬอยู่เรียบแม่น้ำโขงและมีพื้นที่ปลูกยางพารา จึงมีภูมิประเทศคล้ายภาคใต้ และหลังจากนั้นก็พบจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาน้อยลงเรื่อยๆ จนแทบจะไม่มีรายงานเกิดขึ้นในประเทศไทย

ไวรัสซิกา (Zika Virus)

ส่วนการติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย มีรายงานว่านักท่องเที่ยวชาวต่างชาติ ที่เดินทางมายังภาคใต้ของประเทศไทย และเมื่อกลับไปพบว่ามีอาการของโรคไข้เฉียบพลันและพบว่าติดเชื้อไวรัสซิกา [2] ซึ่งทำให้ประเทศไทยเริ่มมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสซิกา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 จนถึงปัจจุบัน

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวินิจฉัยไวรัสซิกา ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR จากผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน จากตัวอย่างซีรัม พาสมา และปัสสาวะรวมทั้งหมด 1,949 ตัวอย่าง โดยพบ RNA ของไวรัสซิกาทั้งหมด 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.21% โดยตรวจพบเชื้อไวรัสซิกาได้เฉพาะจากตัวอย่างที่ปัสสาวะเท่านั้น แสดงถึงการคงอยู่ของไวรัสในตัวอย่างแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Gourinat และคณะที่ว่าในตัวอย่างปัสสาวะสามารถตรวจพบไวรัสซิกาได้ในระยะยาวและสามารถตรวจหาปริมาณไวรัส (viral load) ของไวรัสซิกาในตัวอย่างปัสสาวะได้มากกว่าในตัวอย่างเลือด(10)

โดยการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างปัสสาวะในช่วงเช้าของผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน โดยปัสสาวะในตอนเช้าจะมีความเข้มข้นกว่า เพราะช่วงเวลากลางคืนผู้ป่วยจะใช้เวลาในการนอนหลับพักผ่อนและมีโอกาสในการดื่มน้ำปริมาณน้อย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สามารถตรวจพบไวรัสซิกาในตัวอย่างปัสสาวะได้ดีกว่า

จากการรายงานของกรมควบคุมโรค พบการติดเชื้อไวรัสซิกา ดังนี้

1.) ปี พ.ศ. 2559

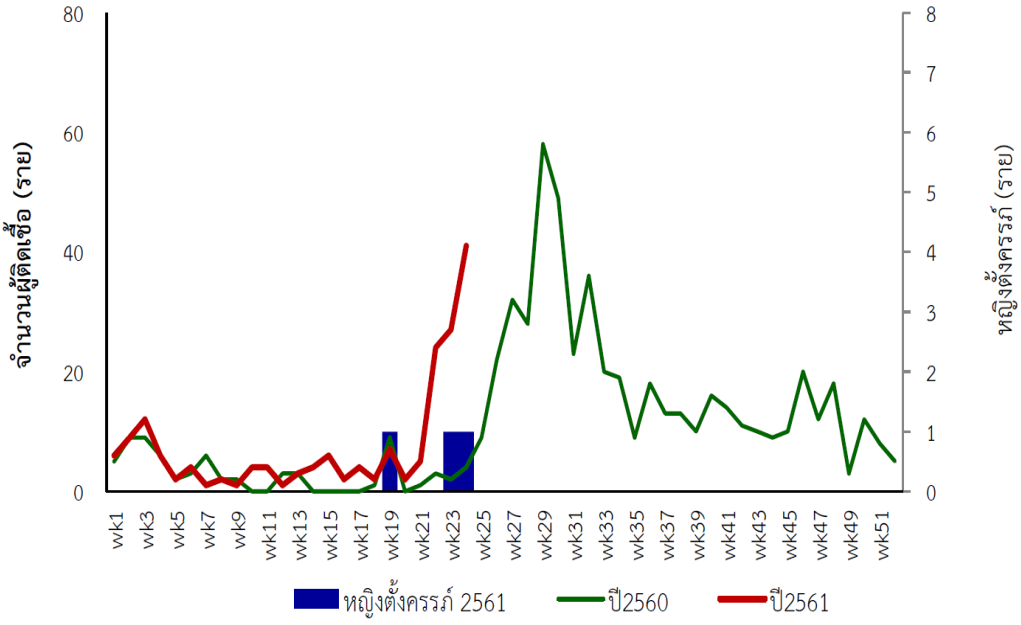
- ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสซิกาแบบมีอาการ 882 ราย
- การติดเชื้อแบบไม่มีอาการ 239 ราย

2.) ปี พ.ศ. 2560

- ผู้ป่วยติดเชื้อมีอาการ 564 ราย
- การติดเชื้อแบบไม่มีอาการ 13 ราย

3.) ปี พ.ศ. 2561 ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ถึง 15 มิถุนายน

- ผู้ป่วยติดเชื้อมีอาการทั้งหมด 179 ราย โดยเฉพาะอย่างยิ่งตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน ถึง 15 มิถุนายน พบผู้ป่วยติดเชื้อมีอาการทั้งหมด 41 ราย ดังรูปที่ 33



รูปที่ 33 แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560-2561 (ภาพจากระบบรายงานการเฝ้าระวัง 506 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค(27))

จากการศึกษาของ Wikanและ Smith พบการรายงานการติดเชื้อของไวรัสซิกาในเขตประเทศบราซิล อินโดนีเซีย และไทย โดยการรายงานผู้ป่วยติดเชื้อจากประเทศไทยส่วนใหญ่ จะเป็นนักท่องเที่ยวต่างชาติ เดินทางมายังประเทศไทย และติดเชื้อไวรัสซิกากลับไปยังประเทศของตน โดยอาการส่วนใหญ่ของผู้ป่วย ได้แก่ มีไข้ มีผื่น ปวดข้อ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และตาแดง ซึ่งได้ตรวจพบในภายหลังว่าสาเหตุของอาการเหล่านี้ คือการติดเชื้อไวรัสซิกา(28)

โดยในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ซึ่งเป็นไวรัสที่มียุงเป็นพาหะของการเกิดโรค ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดไข้เฉียบพลันในประเทศไทย จากการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ซึ่งทำให้สามารถทำนายอุบัติการณ์การเกิดโรค และสามารถควบคุมการเกิดโรคในอนาคตได้

โดยในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ซึ่งเป็นไวรัสที่มียุงเป็นพาหะของการเกิดโรค ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดไข้เฉียบพลันในประเทศไทย จากการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวินิจฉัยไวรัสเดงกี่ ไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสซิกา ซึ่งทำให้สามารถทำนายอุบัติการณ์การเกิดโรค และสามารถควบคุมการเกิดโรคในอนาคตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Hickey AC, Koster JA, Thalmann CM, Hardcastle K, Tio P-H, Cardosa MJ, et al. Serotype-specific host responses in rhesus macaques after primary dengue challenge. Am J Trop Med Hyg 2013;89:1043-57.

2. CDC [Internet]. Clinical Description For Case Definitions; [cited 2016 December] Available from: https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/casedef.html.

3. Cummings DA, Irizarry RA, Huang NE, Endy TP, Nisalak A, Ungchusak K, et al. Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in Thailand. Nature 2004;427:344.

4. Tiawsirisup S. Chikungunya virus in Thailand; an update. The Thai Journal of Veterinary Medicine 2011;41:133.

5. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. J Gen Virol 2000;81:471-9.

6. Wanlapakorn N, Thongmee T, Linsuwanon P, Chattakul P, Vongpunsawad S, Payungporn S, et al. Chikungunya outbreak in Bueng Kan Province, Thailand, 2013. Emerg Infect Diseases 2014;20:1404.

7. Atieh T, Baronti C, De Lamballerie X, Nougairède A. Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses. Scientific reports 2016;6:39384.

8. สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่กรมควบคุมโรค. โรคติดเชื้อไวรัสซิกา; [cited 2016 December]. Available from: http://beidddcmoph goth/beid_2014/th/diseases/2078/

9. C. M. The CDC has confirmed Zika cause microcephaly birth defects; [cited 2016 December] Available from: http://wwwpopscicom/cdc-confirms-connection-between-zika-and-microcephaly.

10. Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. Emerg Infect Diseases 2015;21:84.

11. Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Detection of Zika virus in saliva. J Clin Virol 2015;68:53-5.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Potential sexual transmission of Zika virus. Emerg Infect Diseases 2015;21:359.

13. Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, Mengelle C, Bujan L, Marchou B, et al. Zika virus in semen and spermatozoa. Lancet Infect Dis 2016; 16:1106-7.

14. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol 2005;3:13.

15. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. J Virol 2009;83:12895-906.

16. Wiki M. Yellow fever virus [Internet]. [cited 2016 December]. Available from: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Yellow_fever_virus.

17. Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. Expert Rev Vaccines 2012;11:1087-101.

18. Kuhn RJ. Alphaviruses: Sindbis virus, Chikungunya virus [Intenet]. [cited 2016 December] Available from: https://www.bio.purdue.edu/lab/kuhn/research.html.

19. ตัณฑุลาวัฒน์ แ. การตรวจวินัจฉัยและจำแนกายพันธุ์ระดับชีวโมเลกุลของการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ด้วยชุดทดสอบเชิงพาณิชย์วิธีอีไลซ่าและเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์. 2553.

20. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. Emerg Infect Diseases 2007;13:764.

21. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Diseases 2008;14:1232.

22. L'Azou M, Moureau A, Sarti E, Nealon J, Zambrano B, Wartel TA, et al. Symptomatic dengue in children in 10 Asian and Latin American countries. N ENGl J MED 2016;374:1155-66.

23. Cheah W, Ng K, Marzilawati A-R, Lum L. A review of dengue research in malaysia. Med J Malaysia 2014;69:59-67.

24. กรมควบคุมโรค สส. รายงานการพยากรณ์โรคไข้เลือดออก [Internet]. 2560 [cited 2016 December]. Available from: http://www.thaivbd.org/n/uploads/file/file_PDF/Dengue/2561/DHF%202561.pdf.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

25. Humphrey JM, Cleton NB, Reusken CB, Glesby MJ, Koopmans MP, Abu-Raddad LJ. Urban Chikungunya in the Middle East and North Africa: A systematic review. PLoS Negl Trop Dis 2017;11:0005707.

26. กระทรวงสาธารณสุข สก. สถานการณ์โรคไข้ปวดข้อยุงลาย [Internet]. 2561 [cited 2016 Demcer]. Available from: http://www.thaivbd.org/n/contents?module=%E0%B8%AA%E0%B8%96%E0%B8%B2%E0%B8%9%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%93%E0%B9%8C%E0%B9%84%E0%B8%2%E0%B9%9%E0%B8%9B%E0%B8%A7%E0%B8%94%E0%B8%82%E0%B9%9%E0%B8%AD%E0%B8%A2%E0%B8%B8%E0%B8%7%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%A2.

27. กระทรวงสาธารณสุข สก. สถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสซิกา[Internet]. 2561 [cited 2016 December]. Available from :http://www.thaivbd.org/n/contents/view/325061.

28. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. Lancet Infect Dis 2016;16:119-26.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารสำหรับสกัด RNA

-น้ำกลั่น หรือ distilled water (DW) ซึ่งเตรียมโดย นำขวดแก้วบรรจุน้ำ แล้วนำไปผ่านการ autoclave

-ละลาย carier RNA โดยใส่ RNA free water ทั้งหมด 370 μl ลงในหลอด carrier RNA

-เติม 95% ethanol ลงในสารต่างๆ ตามวิธี RB1 17 μl, RBW 17 μlและ RNW 24 μlซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการสกัด RNA

การเตรียมสารสำหรับ semi-nested RT-PCR

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

การเตรียมสารสำหรับใช้ในการ run gel electrophoresis

-5x Tris borate buffer (5x TBE) ; ละลายสาร Tris base 54 g, Boric acid 27.5 g. และ 0.5 M EDTA 20 ml ในน้ำกลั่น 1,000 ml จนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

-1x Tris borate buffer (1x TBE) ; 5x TBE 200 ml ผสมกับ น้ำกลั่น 800 ml

-2% (w/v) agarose gel ;ละลาย agarose gel ในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วนเจลต่อน้ำ 2 g ต่อ 100 ml นำเข้าไมโครเวฟ จนกว่าเจลและน้ำจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล วริษฐาเพ็ชรสม เพศ หญิง

อายุ 25 ปี เกิดวัน พฤหัสบดี ที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2535

สถานที่เกิด โรงพยาบาล พญาไท 1 จังหวัด กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ 9/69 หมู่บ้าน ชัชฎาวิลล่า ถ. บางแวก แขวง บางไผ่ เขต บางแค จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10160

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์) จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University