EFFECT OF CO-INFECTION BY DENGUE SEROTYPES II AND III IN CELL CULTURE

Miss Cholnipa Boonsnong

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.

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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

ผลของการติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัสเดงกีซีโรไทป์สองและสามในเซลล์เพาะเลี้ยง

นางสาวชลนิภา บุญสนอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัสเดงกีซีโรไทป์สองและสามในเซลล์เพาะเลี้ยง
โดย	นางสาวชลนิภา บุญสนอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ชลนิภา บุญสนอง : ผลของการติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัสเดงกีซีโรไทป์สองและสามในเซลล์เพาะเลี้ยง (EFFECT OF CO-INFECTION BY DENGUE SEROTYPES II AND III IN CELL CULTURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. วันล่า กุลวิชิต, 59 หน้า.

การติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus) พบมากแถบประเทศในเขตร้อน โดยทั่วไป การติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่ง ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันข้ามซีโรไทป์ได้เพียงชั่วคราว และเมื่อมีการติดเชื้อครั้งที่สองด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรก ผู้ป่วยส่วนหนึ่ง อาจมีการแสดงออกของโรคที่รุนแรงเป็น dengue hemorrhagic fever (DHF) หรือ dengue shock syndrome (DSS) นอกจากนี้ ยังมีรายงานจากหลายประเทศ ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่มากกว่าหนึ่งซีโรไทป์พร้อมกัน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่มีในปัจจุบัน ยังคงไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีที่มากกว่าหนึ่งซีโรไทป์ ชักนำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้มากกว่าการติดเชื้อแบบหนึ่งซีโรไทป์หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิด cytopathic effect (CPE) และปริมาณไวรัส ระหว่างการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งและสองซีโรไทป์พร้อมกัน ผลการวิจัยพบว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันทำให้เซลล์เกิด CPE ได้รวดเร็วกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ และสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสเดงกีในการติดเชื้อแบบหนึ่งซีโรไทป์ได้ด้วยวิธี Immunocytochemistry เมื่อเวลาผ่านไปนาน 2 วัน หลังจากที่เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อไวรัสเดงกี ในขณะที่การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันนั้นตรวจพบได้เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 24 ชั่วโมง และทำการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี RT-PCR ในการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์และสองซีโรไทป์พร้อมกัน ในช่วงเวลา 1 – 6 หลังจากที่เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยวิธี qRT-PCR พบว่า ปริมาณไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มีมากกว่าซีโรไทป์ 3 ทั้งในกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งและสองซีโรไทป์พร้อมกัน ในช่วงเวลาเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่มากกว่าหนึ่งซีโรไทป์พร้อมกัน ชักนำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพที่รวดเร็วกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบซีโรไทป์เดียว แต่ปรากฏการณ์ดังกล่าว มีความสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของอาการทางคลินิกหรือไม่นั้น เป็นสิ่งที่ต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

5574119130 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: DENGUE VIRUS, CO-INFECTION, CYTOPATHIC EFFECT (CPE)

CHOLNIPA BOONSNONG: EFFECT OF CO-INFECTION BY DENGUE SEROTYPES II AND III IN CELL CULTURE. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., 59 pp.

Dengue infection is an epidemic disease especially in many tropical countries. Infection with one serotype provides lifelong protective immunity to that one but there is no permanent cross protective immunity to the others. Secondary infection with a heterologous serotype is implicated in the increased severe dengue: dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). Concurrent multi-serotype dengue infections in individual patients have been identified in several countries. Yet, it is unclear whether concurrent infections impose affected patients to more likelihood of DHF or DSS. The aim of this study was to compare findings between one- and two-serotype infections of dengue virus in cell culture. These results indicate that concurrent two-serotype infection stimulate cytopathic effect of cells faster than infection by a single serotype. The viral antigens in infected cells were quantified by Immunocytochemistry assay and compared to uninfected cells. The results show that dengue virus antigens of single infection in LLC-MK2 cells can be detected within 2 days post-infection meanwhile dengue virus antigens of co-infection can be detected within 24 hours post-infection and confirmed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The viral genomes of single infection and concurrent two-serotype infection within 1 – 6 days post-infection were quantified by qRT-PCR. The results show that dengue virus serotype 2 replicated greater efficiency than serotype 3 did both single infection and concurrent two-serotype infection within the same period. In conclusion, concurrent multi-serotype infection in cell-culture system can probably stimulate cytopathic effect of cells faster than infection by a single serotype. Further studies are needed to investigate how the multi-serotype infection might correlate with the severity of clinical symptoms.

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

Academic Year: 2014 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์เพราะได้รับคำแนะนำทั้งทางด้านวิชาการ ความเอื้อเฟื้อด้านอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย สถานที่สำหรับดำเนินงานวิจัย อีกทั้งยังได้รับความช่วยเหลือแนะนำแนวทางในการทำวิจัยจากผู้ทรงคุณวุฒิในด้านต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำและสั่งสอน ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในทุกๆ เรื่อง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร รองศาสตราจารย์ ดร. ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี และ อาจารย์ ดร. ชาลิสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร ที่ให้เกียรติในการเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา ภูมี ดร.เมธี ศรีประพันธ์ และนายวศิน มนูประเสริฐ (นิสิตปริญญาเอก) ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่างๆ ทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเทคนิคทางด้านเซลล์พยาธิวิทยา

ขอขอบคุณ นางสาววรรณา กะหวัง นางสาวเกื้อกูล ทรงเจริญ และนางสาวอาธิกยา สว่างวารี สมาชิกภายในห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคติดเชื้อ แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือเสมอมา

ขอขอบพระคุณ นางสาวอภิญญา บุตรลี้ เจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางปนัดดา ขำนิพัทธ์ และนางสาวเกศิณี อรุณยิ่งมงคล เจ้าหน้าที่หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดเวลาที่ผ่านมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว “บุญสนอง” ที่เลี้ยงดู ให้โอกาส สนับสนุน และ เป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญรูปภาพ ..... ฌ
สารบัญตาราง ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale) 1
คำถามงานวิจัย (Research Question) 3
วัตถุประสงค์การวิจัย (Research Objective) 3
สมมติฐานการวิจัย (Research Hypotheses) 3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Definitions) 3
ข้อพิจารณาทางด้านจริยธรรม (Ethical Consideration) 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of Study) 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
ไวรัสเดงกี (Dengue virus) 5
พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกี (Pathogenesis of Dengue virus infection) 7
การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus replication) 8
ลักษณะอาการทางคลินิก (Clinical manifestations) 9
การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Diagnosis) 10
การศึกษาทาง Immunocytochemistry 11
Reverse transcription polymerase chain reaction assay (RT-PCR) 12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

Real-time Reverse transcription polymerase chain reaction assay (qRT-PCR) 13
การติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยง (Dengue virus infection in cell culture)..... 14
การติดเชื้อไวรัสเดงกีมากกว่าหนึ่งซีโรไทป์ (Muti-Serotype Infection of Dengue Virus)..... 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 17
แผนการวิจัย (Experimental Design) 17
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 17
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 18
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 19
Stock virus 20
การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)..... 20
การ infect ไวรัสเดงกีและการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ (Cell morphology) 20
การตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Immunocytochemistry..... 21
การสกัด RNA โดยใช้ QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 22
การทำ one step RT-PCR 22
บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 27
ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ 27
ผลการตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยวิธี immunocytochemistry..... 37
การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีโดยวิธี one-step reverse transcription PCR (RT-PCR)..... 42
ผลการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีโดยวิธี Real time reverse transcription PCR (qRT-PCR)..... 45
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 46
ข้อจำกัดของงานวิจัย 48
รายการอ้างอิง 49

หน้า

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปภาพ 1: การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกี 5
รูปภาพ 2: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเดงกี 6
รูปภาพ 3: โครงสร้างสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดง 7
รูปภาพ 4: การกระจายตัวของไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ 7
รูปภาพ 5: การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี 9
รูปภาพ 6: การใช้ SYBR Green I dye 14
รูปภาพ 7: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 1 วัน 28
รูปภาพ 8: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 1 วัน 28
รูปภาพ 9: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 1 วัน 28
รูปภาพ 10: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 1 วัน 29
รูปภาพ 11: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 2 วัน 29
รูปภาพ 12: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 2 วัน 29
รูปภาพ 13: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 2 วัน 30
รูปภาพ 14: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 2 วัน 30
รูปภาพ 15: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 4 วัน 31
รูปภาพ 16: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 4 วัน 31
รูปภาพ 17: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 4 วัน 32

รูปภาพ 18: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 4 วัน 32

รูปภาพ 19: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 5 วัน 33

รูปภาพ 20: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 5 วัน 33

รูปภาพ 21: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 5 วัน 34

รูปภาพ 22: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 5 วัน 34

รูปภาพ 23: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 6 วัน 35

รูปภาพ 24: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 6 วัน 35

รูปภาพ 25: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 6 วัน 36

รูปภาพ 26: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 6 วัน 36

รูปภาพ 27: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 (A) และ 3 (B) นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody 38

รูปภาพ 28: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์กีแบบ 2 ซีโรไทป์ พร้อมกัน นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody (A) และ dengue type 3 virus monoclonal antibody (B) 38

รูปภาพ 29: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์กีแบบ 2 ซีโรไทป์ พร้อมกัน นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody 38

รูปภาพ 30: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody 39

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปภาพ 31: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์แบบ 2 ซีโรไทป์ นาน 2 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody ... 39

รูปภาพ 32: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 2 วัน 39

รูปภาพ 33: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 2 วัน 40

รูปภาพ 34: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 6 วัน 40

รูปภาพ 35: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีแบบ 2 ซีโรไทป์ นาน 5 วัน 41

รูปภาพ 36: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 6 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody 41

รูปภาพ 37: ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมจากอาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 l 42

รูปภาพ 38: ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมจากอาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 43

รูปภาพ 39: M = ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมจากอาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ไม่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 43

รูปภาพ 40: ผลการแยกซีโรไทป์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1: primers ที่เลือกมาใช้ คือ DV1 และ DV2 23

ตาราง 2: ส่วนประกอบของ PCR reaction 23

ตาราง 3: primers ที่เลือกมาใช้ คือ DV1, TS2 และ TS3 24

ตาราง 4: ส่วนประกอบของ PCR reaction 24

ตาราง 5: primers ที่เลือกมาใช้ คือ mDV1, mTS2 และ TS3 25

ตาราง 6: ส่วนประกอบของ PCR reaction 25

ตาราง 7: ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกีจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ 45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale)

โรคไข้เลือดออกมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus) เป็นเชื้อก่อโรคชนิดที่ปรากฏขึ้นใหม่และมีการระบาดซ้ำ (emerging and re-emerging disease) ซึ่งจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อน (tropical) และกึ่งเขตร้อน (subtropical) เชื้อไวรัสเดงกีที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออกนั้นจัดเป็นไวรัสในกลุ่มที่มีแมลงเป็นพาหะ (arboviruses) โดยยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคมี 2 ชนิดคือ *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* [1, 2]

เชื้อไวรัสเดงกีจัดอยู่ใน Family *Flaviviridae,* Genus *Flavivirus* มีสารพันธุกรรมเป็น positive single stranded RNA แบ่งได้เป็น 4 ซีโรไทป์ (serotype) คือ ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 (DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4) เมื่อมีการติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งในครั้งแรก (primary infection) แล้วนั้น ผู้ป่วยจะมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่สามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เพียงไม่กี่เดือน ปัญหาที่สำคัญคือ หากบุคคลนั้นได้รับการติดเชื้อครั้งที่สองด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรก ผู้ป่วยบางรายอาจมีการแสดงออกของโรคที่รุนแรง [3, 4]

การติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น ก่อให้เกิดอาการที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน โดยสามารถจำแนกอาการตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ 2 กลุ่ม คือ ผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ไม่แสดงอาการของโรค และผู้ป่วยมีอาการแสดงออกของโรค โดยแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม คือ 1.) อาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (undifferentiated febrile illness) 2.) ไข้เดงกี (dengue fever, DF) และ 3.) ไข้เลือดออกเดงกี (dengue hemorrhagic fever, DHF) กลุ่ม DHF ที่รุนแรงจนมีภาวะช็อกเรียกว่าภาวะนี้ว่า dengue shock syndrome (DSS) [4-6]

รายงานลักษณะทางระบาดวิทยาของผู้ป่วยกลุ่มโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ณ วันที่ 30 ธันวาคม 2557 พบว่า มีผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกสะสม รวม 39,569 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 61.75 ต่อประชากรแสนคน พบผู้เสียชีวิต 40 รายคิดเป็นอัตราตาย 0.06 และอัตราป่วยตายร้อยละ 0.10 [7]

การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี เริ่มต้นตั้งแต่ซักประวัติ ผลการตรวจร่างกาย เช่น การทดสอบ tourniquet ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับการติดเชื้อไวรัสเดงกี ทำได้หลายวิธี เช่น การแยกเชื้อไวรัสเดงกี วิธีที่เป็นที่นิยม ได้แก่ การเพาะเลี้ยง

แยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ หรือ การตรวจทางไวรัสวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเดงกีในคนไข้ วิธีนี้สามารถให้ผลการทดสอบได้ภายในไม่กี่ชั่วโมง รวมถึงเทคนิคทางอณูชีววิทยา ที่เป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบัน เพราะสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง เช่น การตรวจโดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อตรวจสอบว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกีหรือไม่ และเพื่อระบุซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเดงกี วิธีการนี้อาจให้ผลการทดสอบได้เร็วถึงภายใน 2-4 ชั่วโมง [1, 8] แต่มีข้อจำกัดด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาสูง มีโอกาสเกิดการปนเปื้อน และไม่สามารถตรวจสอบตำแหน่งของเซลล์ที่ไวรัสเดงกีเข้าไปเพิ่มจำนวนได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคที่มีหลักการตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไวรัสนั้นและสามารถมองเห็นเซลล์ที่ติดไวรัสไปพร้อมๆ ได้ เช่น การตรวจหาโปรตีนหรือแอนติเจนของเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิคทางพยาธิวิทยาทางเซลล์ เช่น Immunocytochemistry ซึ่งเป็นกระบวนการตรวจหาโปรตีนของไวรัสที่อยู่ในเซลล์ที่นำมาศึกษา โดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเชื้อไวรัสในเซลล์ รายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อไวรัสเดงกีสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์จากร่างกายมนุษย์ได้หลากหลายชนิด รวมถึงเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เช่น monocyte, macrophage, Langerhans cell, fibroblast และ epithelial cell โดยใช้เทคนิคทางพยาธิวิทยาในการตรวจ [9]

การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ในผู้ป่วยนั้นมีรายงานจากหลายประเทศ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีในปัจจุบันยังคงไม่สามารถบอกถึงพยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงได้แน่ชัดและยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ชักนำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้มากกว่าการติดเชื้อแบบหนึ่งซีโรไทป์หรือไม่ โดยงานวิจัยของ Quintero-Gil และคณะ ในปี 2014 [10] ได้ทำการศึกษา replication ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 ในการติดเชื้อแบบ co-infections ในเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 และในยุงลาย *Aedes aegypti* อีกทั้งงานวิจัยของ Jessie ในปี 2004 [9] สามารถใช้เทคนิคทางพยาธิวิทยาในการตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์ต่างๆ ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ในเซลล์เพาะเลี้ยง LLC-MK2 โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิด cytopathic effect (CPE) ระหว่างการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งและสองซีโรไทป์ รวมถึงใช้เทคนิคทางพยาธิวิทยาทางเซลล์ในการตรวจสอบซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการช่วยยืนยันผลการเกิด CPE และเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของปริมาณไวรัส (viral load) แต่ละซีโรไทป์ของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ในช่วงเวลาต่างๆ

คำถามงานวิจัย (Research Question)

การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์สองและสามพร้อมกันในเซลล์เพาะเลี้ยงมีความแตกต่างของ cytopathic effect (CPE) และปริมาณไวรัสหรือไม่ อย่างไร เมื่อเปรียบเทียบกับการติดเชื้อไวรัสเดงกีหนึ่งซีโรไทป์

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research Objective)

เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์สองและสามพร้อมกันในเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ โดยสังเกตการเกิด cytopathic effect (CPE) และปริมาณไวรัสหลังการติดเชื้อ

สมมติฐานการวิจัย (Research Hypotheses)

- การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันสามารถทำให้เซลล์เกิด cytopathic effect (CPE) ได้รวดเร็วกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์
- ปริมาณไวรัสเดงกีของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์มีมากกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Definitions)

Co-infection **คือ การติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไปในเซลล์เดียว (single cell)**

Cytopathic effect (CPE) คือ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เช่น เซลล์มีขนาดใหญ่กลม และมีหลาย nucleus บางเซลล์อาจเกิดการรวมของเซลล์ที่ติดเชื้อเป็นกลุ่มๆ บางเซลล์อาจมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก เหี่ยว และตายในที่สุด

Immunocytochemistry คือ วิธีการศึกษาชนิดและตำแหน่งโปรตีนที่สนใจในเซลล์ต่างๆ โดยการใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนนั้นๆเป็นตัวจับ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเกิดจากการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antigen-antibody complex)

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

รูปแบบการวิจัยโดยการทดลอง (Experimental Research)

ข้อพิจารณาทางด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)

เนื่องจากทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ได้ทำการทดลองในสัตว์ทดลองและไม่ได้ใช้ตัวอย่างจากคนไข้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์และเชื้อไวรัสเดงกีทำภายในตู้ปราศจากเชื้อ (Class II Biohazard Safety Cabinet) เพื่อไม่ให้เกิดความเสี่ยงต่อตนเองและผู้อื่น จึงไม่มีปัญหาทางด้านจริยธรรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of Study)

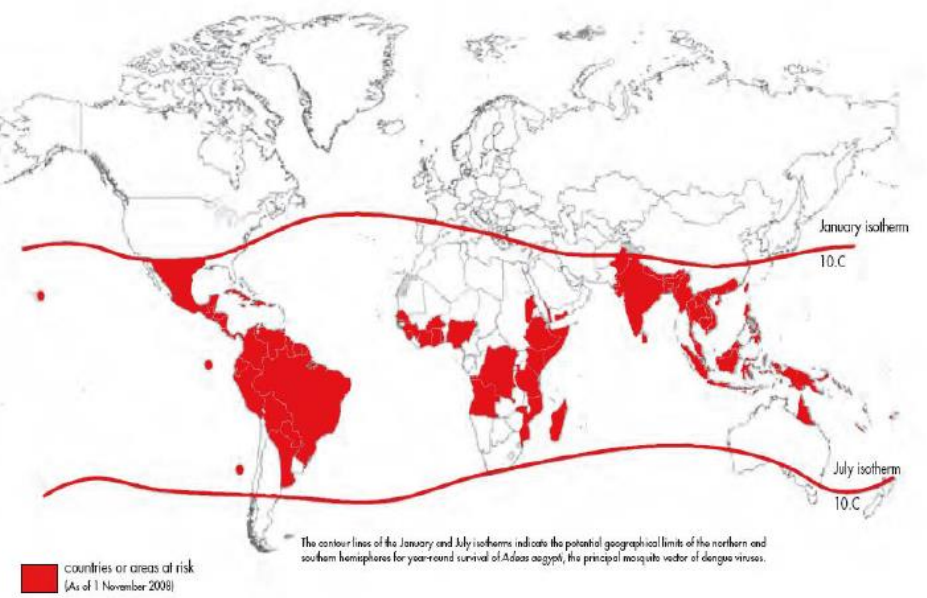
- ทำให้ทราบข้อมูลของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ว่าก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์อย่างไร ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ในผู้ป่วยต่อไปในอนาคต
- จากการวิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการวิจัยอื่นๆ โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยาและการเกิดพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งจะนำไปสู่การตรวจสอบและวางแผนป้องกัน การพัฒนาวัคซีนและการรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

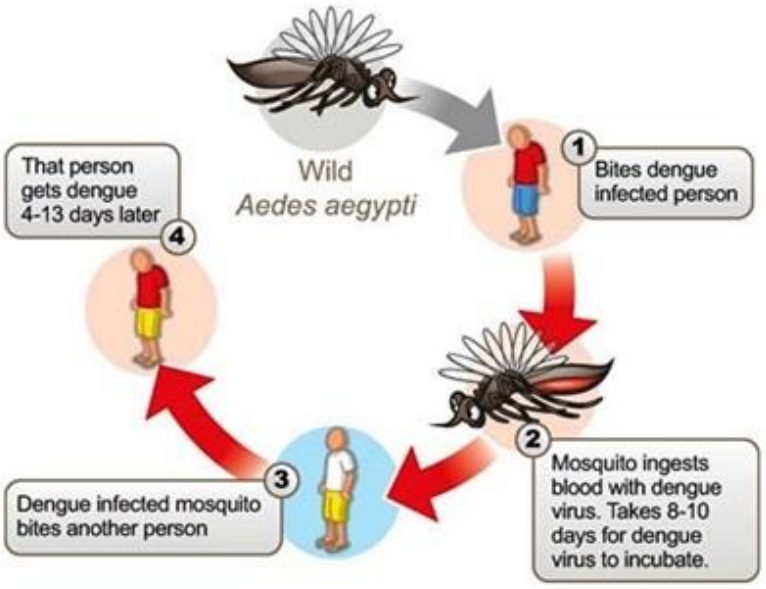
ไวรัสเดงกี (Dengue virus)

โรคไข้เลือดออกมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นเชื้อก่อโรคชนิดที่ปรากฏขึ้นใหม่และมีการระบาดซ้ำ (emerging and re-emerging disease) ซึ่งจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อน กึ่งเขตร้อน และร้อนชื้น พื้นที่ส่วนใหญ่ที่พบรายงานผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจะอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 25 องศาเหนือถึง 25 องศาใต้ ทั้งในทวีปแอฟริกา อเมริกากลางและใต้ ประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแปซิฟิกตะวันตก ดังแสดงรูปที่ 1 ประชากรมากกว่า 2.5 พันล้านคนอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการแพร่ระบาด องค์การอนามัยโลกคาดคะเนว่าประชากรประมาณ 50 ล้านคนมีการติดเชื้อไวรัสเดงกี รายงานอย่างเป็นทางการครั้งแรกพบว่าเกิดขึ้นที่ประเทศฟิลิปปินส์ สำหรับในประเทศไทยเริ่มมีการระบาดใหญ่ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 โดยลักษณะการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยนั้นไม่มีแบบแผนที่แน่นอนสามารถพบผู้ป่วยได้ตลอดทั้งปีแต่พบมากที่สุดในช่วงฤดูฝนและพบกระจายทั่วทุกภาคของประเทศ [1, 2, 6]



รูปภาพ 1: การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกี [6]

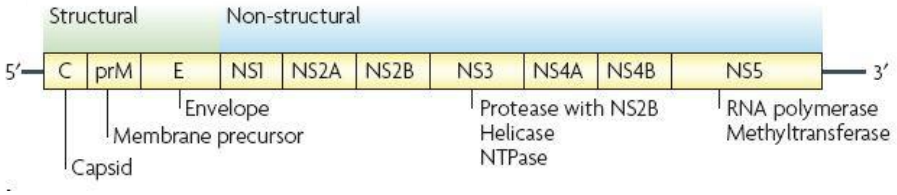
เชื้อไวรัสเดงกีที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออกนั้นจัดเป็นไวรัสในกลุ่มที่มีแมลงเป็นพาหะ (arboviruses) โดยยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคมี 2 ชนิด คือ ยุงลายบ้าน *(Aedes aegypti)* ซึ่งเป็นพาหะที่สำคัญในเขตเมือง และยุงลายสวน *(Aedes albopictus)* เป็นพาหะที่สำคัญในชานเมืองและชนบท ยุงลายจะชุกชุมในช่วงฤดูฝน มักออกหากินในเวลากลางวัน หลังจากยุงลายดูดเลือดของผู้ที่มีเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อจะเข้าไปเพิ่มจำนวนใน midgut epithelium และกระจายจาก midgut ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ในตัวยุง เชื้อไวรัสเดงกีสามารถผ่านจากรังไข่ไปสู่ไข่ของยุงได้ทำให้ยุงสามารถติดเชื้อได้ตั้งแต่เป็นตัวอ่อน อวัยวะที่สำคัญในการแพร่เชื้อไวรัส คือ ต่อมน้ำลาย โดยเชื้อจะฟักในตัวยุงประมาณ 8-10 วัน และเชื้อจะอยู่ในตัวยุงไปตลอดชีวิต เมื่อยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเดงกีไปกัดคนอื่น เชื้อจะฟักตัวอยู่ในคนประมาณ 4-13 วันหลังจากได้รับเชื้อ ดังแสดงรูปที่ 2 ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีส่วนใหญ่จะมีเชื้อไวรัสอยู่ในเลือดไม่เกิน 7 วันนับตั้งแต่เริ่มมีไข้ [1, 2]



รูปภาพ 2: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเดงกี [11]

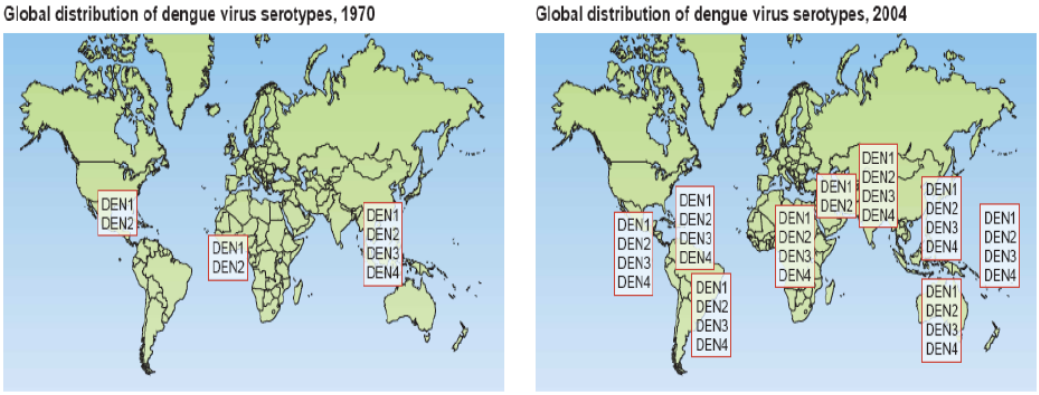
เชื้อไวรัสเดงกีจัดอยู่ใน Family *Flaviviridae,* Genus *Flavivirus* ซึ่งเป็นกลุ่มไวรัสกลุ่มใหญ่ที่เป็นสาเหตุการตายทั้งคนและสัตว์ มีสารพันธุกรรมเป็น positive single stranded RNA virus ยาวประมาณ 10.7 kb มีอนุภาคเป็นทรงกลม ขนาดของอนุภาคไวรัสประมาณ 50 นาโนเมตร โครงสร้างของเชื้อไวรัสเดงกีแบ่งได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ 1.) Structural proteins ประกอบไปด้วย capsid (C), pre-membrane/membrane (PrM/M) และ envelope (E) 2.) Non-structural

proteins (NS) ประกอบไปด้วย NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5 และ 3.) Untranslated region (UTR) ประกอบไปด้วย 5′UTR และ 3′UTR [1, 2, 12] ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปภาพ 3: โครงสร้างสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี [13]

เชื้อไวรัสเดงกีสามารถแบ่งได้เป็น 4 ซีโรไทป์ คือ ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 (DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4) เมื่อมีการติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งในครั้งแรก (primary infection) แล้วนั้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่สามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เพียงไม่กี่เดือนเท่านั้น การติดเชื้อครั้งที่สอง (secondary infection) ด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรกผู้ป่วยมักมีการแสดงออกของโรคที่รุนแรง ประเทศในเขตร้อนส่วนใหญ่ รวมถึงประเทศไทยนั้นเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ ดังแสดงในรูปที่ 4 จึงทำให้มีโอกาสที่จะติดเชื้อซ้ำได้สูง [1-4, 13]



รูปภาพ 4: การกระจายตัวของไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ [12]

พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกี (Pathogenesis of Dengue virus infection)

พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การติดเชื้อไวรัสทั่วๆ ไปนั้น ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ภายในร่างกายมนุษย์จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำครั้งที่สอง แต่โรคไข้เลือดออกเดงกีจะมีความแตกต่างออกไป คือ เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรก ด้วยซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งแล้วนั้น ผู้ป่วยอาจไม่มีอาการแสดงออกของโรค

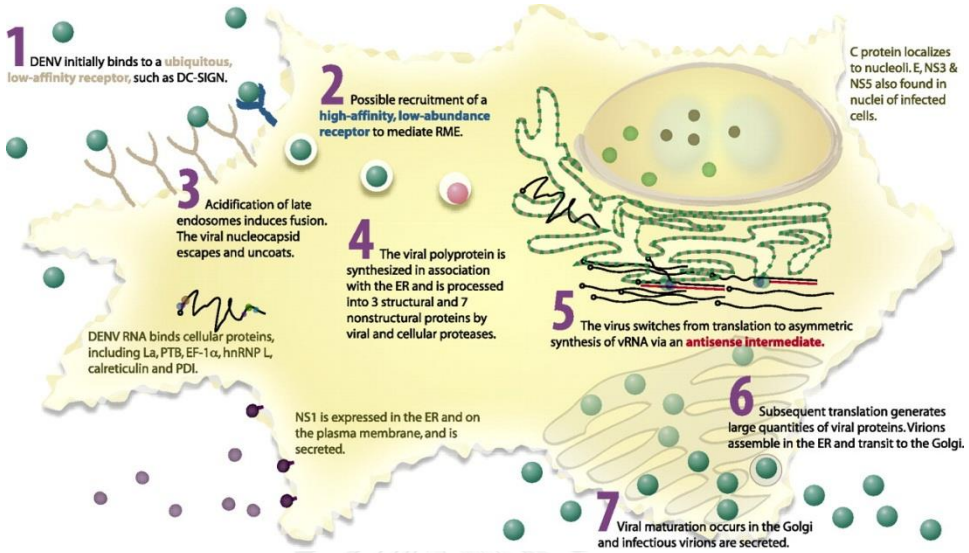
หรืออาจมีอาการแสดงออกของโรคเหมือนการติดเชื้อไวรัสทั่วๆ ไป แต่จะมีอาการแสดงออกของโรคที่รุนแรงที่ชัดเจนเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำครั้งที่สองด้วยซีโรไทป์ที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งแรก [1, 3, 12] ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไม่สามารถยับยั้ง (neutralize) เชื้อไวรัสได้ แต่กลับไปส่งเสริมให้มีการเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เป้าหมายมากขึ้น เรียกว่าเป็นการเกิด antibody dependent enhancement (ADE) สำหรับเชื้อไวรัสเดงกี เมื่อมีการติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งในครั้งแรกแล้วนั้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่ป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ จึงทำให้การติดเชื้อซ้ำด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรกส่งผลให้ผู้ป่วยมักมีการแสดงออกของโรคที่รุนแรง [3] นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคยังเป็นผลมาจากปัจจัยอื่น เช่น จำนวนของไวรัส (viral load) พบว่าปริมาณของไวรัสนั้นมีผลต่อเซลล์เป้าหมายโดยตรง สืบเนื่องมาจากปริมาณไวรัสที่มากทำให้สามารถติดเชื้อต่อเซลล์เป้าหมายได้มาก จึงส่งผลให้มีการแสดงความรุนแรงได้ชัดเจนขึ้น จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสเดงกีในเลือดมาก ไม่ว่าในระยะไข้หรือระยะที่ไข้หายแล้วมีแนวโน้มที่จะมีอาการรุนแรงกว่าผู้ที่มีปริมาณเชื้อไวรัสในเลือดน้อยกว่า อีกทั้งสายพันธุ์ของไวรัส (viral strain) มีผลต่อความรุนแรงของอาการ โดยมีการศึกษาพบว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์อาจทำให้ความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน การติดเชื้อซ้ำครั้งที่สองโดยเฉพาะด้วยซีโรไทป์ 2 มักทำให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรงมาก รวมไปถึงปัจจัยจากผู้รับเชื้อ เช่น อายุ เพศ โรคประจำตัว ภาวะโภชนาการ และลักษณะทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล [1, 3, 13, 14] มีการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ต่างๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปี ในอดีตเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มีบทบาทสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคในประเทศไทย แต่ในระยะหลังพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 เพิ่มมากขึ้น และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงเพิ่มขึ้น [1, 12]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus replication)

วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเดงกีเริ่มจากการที่เชื้อไวรัสเดงกีสามารถจับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์เป้าหมาย แล้วกระตุ้นให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการที่เรียกว่า receptor-mediated endocytosis (RME) โดยจะเกิดการสร้าง endosome ในเซลล์ ซึ่งภายใน endosome มีสภาวะเป็นกรดที่มีคุณสมบัติเป็น viral fusion protein ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ envelope โปรตีน เป็นผลให้ RNA ของไวรัสหลุดออกจาก envelope (uncoat) จากนั้น RNA ของไวรัสจะเริ่มสร้างโปรตีนต่างๆ ที่บริเวณ ER-derived membrane และจะหยุดสร้างโปรตีนเมื่อมีการสร้างสาย RNA ของไวรัส โปรตีนและสาย RNA ที่สร้างขึ้นจะประกอบตัวกัน (assembly) ที่ endoplasmic reticulum (ER) แล้วเคลื่อนต่อไปที่ golgi compartment เพื่อให้การประกอบตัวสมบูรณ์และไวรัส

มีสภาพเป็นตัวเต็มวัย (mature form) ดังแสดงในรูปที่ 5 แล้วเซลล์เป้าหมายนี้ก็จะปล่อยไวรัสที่เกิดใหม่และมีความสมบูรณ์ออกจากเซลล์เดิมกระจายไปสู่เซลล์เป้าหมายเซลล์อื่นๆ ต่อไป [1, 2]



รูปภาพ 5: การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี [5]

ลักษณะอาการทางคลินิก (Clinical manifestations)

การติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้นก่อให้เกิดอาการจำแนกตามความรุนแรง แบ่งตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ 2 กลุ่ม คือ ผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ไม่แสดงอาการของโรค (asymptomatic) และผู้ป่วยมีอาการแสดงออกของโรค (symptomatic) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย คือ 1.) อาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (undifferentiated febrile illness, UF) ผู้ป่วยมักมีอาการไข้สูงเฉียบพลันเพียงอย่างเดียว อาการจะเหมือนการติดเชื้อไวรัสทั่วไป แสดงอาการประมาณ 2-3 วัน แล้วมักจะหายไปเอง 2.) ไข้เดงกี (dengue fever, DF) ผู้ป่วยมักมีอาการไข้สูง อาจมีการลดต่ำลงแล้วกลับมาสูงขึ้นอีกครั้ง ร่วมกับอาการ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามข้อและกระดูก กระบอกตา กล้ามเนื้อต่างๆ ตามร่างกาย อาจมีผื่นและจุดเลือดออกบริเวณผิวหนัง การทดสอบ tourniquet ให้ผลบวก โดยทั่วไปผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีอาการไม่รุนแรง แสดงอาการประมาณ 5-7 วัน แล้วจึงหายเป็นปกติ 3.) ไข้เลือดออกเดงกี (dengue hemorrhagic fever, DHF) พบอาการลักษณะเดียวกับไข้เดงกี (dengue fever) แต่รุนแรงกว่ามาก ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีลักษณะอาการที่ชัดเจนคือ มีไข้สูงลอยร่วมกับอาการเลือดออก เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการจะพบว่ามีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำลง มีอาการตับโต และมีการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด ซึ่งถ้าพลาสมารั่วออกไปมากผู้ป่วยจะมีภาวะช็อกเกิดขึ้น เรียกว่า dengue shock syndrome (DSS) การรั่วของพลาสมาสามารถตรวจพบได้จากการที่มีระดับ

hematocrit สูงขึ้น มีน้ำในเยื่อหุ้มช่องปอดและช่องท้อง ถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาไม่ทันจะเป็นอันตรายถึงตายได้ [6]

ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีส่วนใหญ่มักไม่มีอาการ (asymptomatic) โดยพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ไม่มีอาการถึงร้อยละ 90 ของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งหมด ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีแล้วมีอาการแสดงออกจะมีการดำเนินโรคเป็น 3 ระยะ คือ 1.) ระยะไข้ (febrile phase) ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงเกิน 38.5°C นาน 2-7 วัน ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาจปวดท้องบริเวณลิ้นปี่หรือใต้ชายโครงด้านขวาเนื่องมาจากตับโต บางรายอาจมีอาการชัก พบอาการหน้าแดง จุดเลือดออกบริเวณผิวหนัง อาจพบผื่นแบบ maculopapular 2.) ระยะวิกฤติ (critical phase) ไข้มักจะลดลงอย่างรวดเร็ว ลักษณะสำคัญคือ จะพบการรั่วของพลาสมาจำนวนมากไปยังช่องปอดและช่องท้องจนทำให้เกิดภาวะช็อกในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง dengue shock syndrome (DSS) ผู้ป่วยจะมีอาการกระสับกระส่าย ชีพจรเบาลง ความดันโลหิตต่ำและแคบกว่า 20 มม.ปรอท (ความรุนแรงของโรคแบ่งได้เป็น 4 เกรด โดยจำแนกตามการเลือดออกและภาวะช็อก คือ เกรด 1 หมายถึงไม่พบอาการเลือดออก การทดสอบ tourniquet ให้ผลบวก เกรด 2 หมายถึงมีอาการเลือดออก เกรด 3 หมายถึงมีชีพจรเบา ความดันโลหิตต่ำและแคบ เกรด 4 หมายถึงวัดความดันโลหิตไม่ได้) 3.) ระยะพักฟื้น (recovery phase) เกิดค่อนข้างเร็ว ผู้ป่วยมีอาการทั่วไปดีขึ้น เป็นระยะที่มีการดูดกลับของพลาสมาเข้ากระแสโลหิต อาจพบผื่นที่เรียกว่า convalescent rash ในช่วงท้าย ซึ่งมักมีอาการคัน [1, 2, 5, 6, 12, 13]

การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Diagnosis)

โรคไข้เลือดออกยังคงมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง แต่ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันหรือยาที่ใช้ในการรักษาอย่างจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการลดความเสี่ยงที่ผู้ป่วยจะเสียชีวิตหนทางหนึ่งจึงต้องอาศัยแพทย์ผู้มีประสบการณ์ในการวินิจฉัยอาการของผู้ป่วยร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่แม่นยำและรวดเร็ว ซึ่งจะส่งเสริมให้แพทย์ทำการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถทำได้หลายวิธี โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ 1.) การตรวจหาแอนติบอดีของผู้ป่วย โดยวิธีที่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน เช่น rapid test โดยอาศัยหลักการ ELISA เพื่อตรวจหา IgM และ IgG ต่อไวรัสเดงกีจากตัวอย่างที่ส่งตรวจ การทำ ELISA ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้หลักการของการตรวจสอบอัตราส่วนระหว่าง IgM และ IgG ซึ่งยังสามารถใช้แยกการติดเชื้อครั้งแรกและการติดเชื้อซ้ำครั้งที่สองได้ [8, 14] และ 2.) การตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี (viral identification) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจเพาะเลี้ยงแยกเชื้อไวรัส (viral isolation) มีประโยชน์ในการศึกษารูปร่างการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนและคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวภาพของไวรัสเดงกี นอกจากนี้ยังเป็น

ประโยชน์ในการทำความเข้าใจความสัมพันธ์ของไวรัสเดงกีกับเซลล์ ซึ่งนำไปถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเซลล์ ทำให้อาจทำนายและคาดการณ์ลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น เซลล์เพาะเลี้ยงที่นิยมใช้มีทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็น mammalian cell line เช่น LLC-MK2 เป็นเซลล์จาก rhesus monkey kidney epithelial cells หรือ mosquito cell line เช่น C6/36 เป็นเซลล์จากยุงลาย *Aedes albopictus* โดยจะสังเกตได้จากถ้ามีเชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงจะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า cytopathic effect (CPE) และสามารถใช้เทคนิควิเคราะห์ต่างๆ เช่น reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในการหาชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันการเกิด CPE ได้ การเพาะเลี้ยงไวรัสอีกหนึ่งวิธีคือการทำ mosquito inoculation [8, 15-18] การตรวจเพาะเลี้ยงแยกเชื้อไวรัสถือเป็น gold standard ที่ยืนยันสาเหตุการเกิดโรคที่แน่นอนที่สุด [19] แต่วิธีการแยกเชื้อไวรัสเดงกีมีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 1-2 สัปดาห์ จึงไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคในระยะที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ได้ รวมไปถึงเรื่องของสิ่งส่งตรวจที่ต้องเก็บในระยะที่มีไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ความไวของการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเดงกีจะลดลงหากเก็บสิ่งส่งตรวจล่าช้า การตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีเป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบัน เพราะมีความรวดเร็วและแม่นยำสูง เช่น การทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อตรวจสอบว่ามีเชื้อไวรัสเดงกีหรือไม่และเพื่อระบุซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเดงกีได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกี (specific primer) ในการตรวจสอบ วิธีการนี้สามารถให้ผลภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมง [1, 8, 15, 18, 20] แต่มีข้อจำกัดคือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ยังมีราคาสูงและมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ข้อจำกัดที่สำคัญคือไม่สามารถตรวจสอบตำแหน่งของไวรัสนั้นว่าอยู่ในบริเวณใดของเซลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษาทาง Immunocytochemistry

Immunocytochemistry เป็นเทคนิคที่ใช้ระบุตำแหน่งของโปรตีนหรือแอนติเจนที่อยู่ในเซลล์ โดยใช้ primary antibody และ secondary antibody ร่วมกับ enzyme complex และสารตั้งต้น (substrate) ที่ก่อให้เกิดสี โดยปฏิกิริยาทางเอนไซม์จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ (product) ที่ตำแหน่งของแอนติเจนนั้น ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาในอดีตมีเฉพาะวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (Immunofluorescence) ซึ่งเป็นการใช้สารเรืองแสง (fluorescein) ติดกับแอนติบอดี วิธีนี้มีข้อจำกัด คือต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เท่านั้น นอกจากนี้ สารเรืองแสงจะเสื่อมสภาพเมื่อถูกแสงสว่าง ต้องเก็บสไลด์ในที่มืด และเก็บได้ไม่นาน จะเก็บได้เฉพาะรูปถ่ายเท่านั้น ซึ่งต่อมามีผู้คิดค้นนำเอนไซม์มาเชื่อมติดกับแอนติบอดีเพื่อใช้แทนสารเรืองแสง ซึ่งเมื่อเอนไซม์ปฏิกิริยากับสารตั้งต้น และเมื่อหยด chromogen เช่น DAB จะปรากฏสีตรงตำแหน่งของเซลล์ที่มีแอนติบอดี้ไปจับอยู่กับแอนติเจน ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา รวมไปถึงสามารถศึกษาจาก paraffin section ได้ และสามารถเก็บสไลด์เป็นสไลด์ถาวรได้

เทคนิค immunocytochemistry นี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบใหญ่ๆ ได้แก่ 1.) Direct method เป็นการใช้แอนติบอดีที่ติดฉลาก (conjugate) กับเอนไซม์ เช่น horse radish peroxidase หรือ alkaline phosphatase มาจับกับแอนติเจน แล้วทำให้เกิดสี วิธีการนี้จะมี sensitivity น้อย และ 2.) Indirect method เป็นการใช้แอนติบอดีสองชนิด ชนิดแรก คือ primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการจะตรวจหานั้นๆ และ secondary antibody จะติดฉลากกับเอนไซม์ไว้แล้ว วิธีนี้เป็นการเพิ่มให้ sensitivity ดีขึ้น [21, 22]

ขั้นตอนของการตรวจด้วยวิธี immunocytochemistry จะประกอบด้วยขั้นตอนย่อย [22] ดังต่อไปนี้

1. การตรึง (Fixation) เป็นการป้องกันกระบวนการ autolysis และเป็นการรักษาแอนติเจนในเซลล์ตัวอย่างสารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการนี้ เช่น 10% neutral-buffered formaldehyde, acetone, alcohol หรือ paraformaldehyde เป็นต้น

2. การหยุดปฏิกิริยาของโปรตีนที่ไม่จำเพาะ (nonspecific - protein blocks) เป็นขั้นตอนที่จะลดโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะระหว่างแอนติบอดีต่อส่วนประกอบอื่นๆนอกเหนือจากแอนติเจนเป้าหมาย

3. การใส่ primary antibody

4. การใส่ secondary antibody ที่ติดสลากกับเอนไซม์

5. ขั้นตอนการตรวจจับการเกิดปฏิกิริยาโดยก่อให้เกิดสี (detection)

การแปลผลของวิธี immunocytochemistry คือ ดูผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่ามีโปรตีนจำเพาะที่อยู่ในเซลล์ เป็นผลบวก (positive staining) โดยสีที่เห็นอาจจะอยู่ในไซโตพลาสซึม นิวเคลียส หรือเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาจอยู่เป็นจุดรวม หรือกระจายก็ได้ วิธี immunocytochemistry สามารถใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อได้ ส่วนมากจะใช้วินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส เช่น hepatitis B , human herpes virus, cytomegalovirus

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Reverse transcription polymerase chain reaction assay (RT-PCR)

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยจะอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนจะเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองสายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR การทำ PCR จะใช้องค์ประกอบหลัก 5 อย่างในหลอดทดลอง คือ DNA template, ไพรเมอร์, dNTP, Taq DNA polymerase และ บัฟเฟอร์ที่มี Mg^{2+}

การดำเนินปฏิกิริยาในหนึ่งรอบจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1.) Denaturation step ความร้อนประมาณ 90 - 95°C จะทำให้สายดีเอ็นเอสายคู่ต้นแบบ สองสายแยกจากกัน 2.) Annealing step อุณหภูมิจะถูกลดลงที่ประมาณ 40 - 60°C ไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 – 30 เบสจะเข้ามาจับกับดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวในตำแหน่ง complementary 3.) Extension step ที่อุณหภูมิประมาณ 70 - 75°C จะมีการเติมนิวคลีโอไทด์จาก 5′ –> 3′ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA

polymerase จนได้ดีเอ็นคู่ใหม่ เมื่อปฏิกิริยาจบ 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มจาก 1 เป็น 2 ชุด เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนรอบต่อๆ ไป จำนวนการเพิ่มดีเอ็นเอจะเป็นแบบทวีคูณ (2^n) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว ดีเอ็นที่ถูกเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองจะนำมาวิเคราะห์ได้หลายวิธี โดยทั่วไปจะทำโดยการแยกขนาดของดีเอ็นเอบน agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า เรียกว่า agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่แยกบน agarose gel จะย้อมสี ethidium bromide ที่ทำให้เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่เรืองแสงเมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจากเครื่อง UV transilluminator

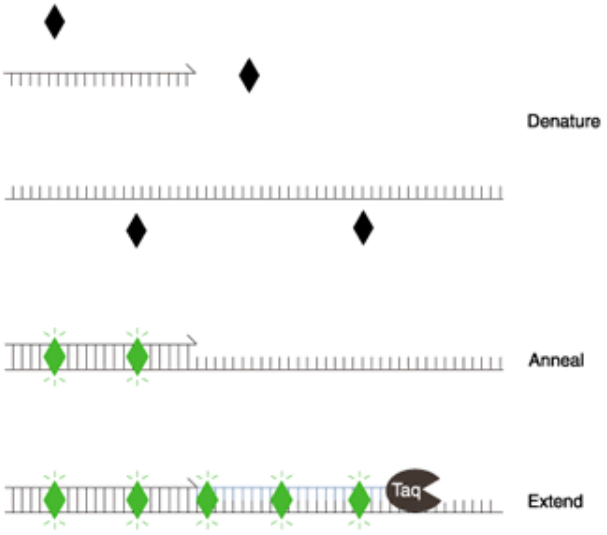
Reverse transcription polymerase chain reaction หรือ RT-PCR เป็นปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่หนึ่งเป็นปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ก่อน และขั้นตอนที่สองจึงตามด้วยปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนปกติ

มีรายงานการศึกษาที่ใช้เทคนิค PCR ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ในปี 1992 Lanciotti และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค nested RT-PCR โดยใช้ specific primer ต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ [20] และการศึกษาของ Harris และคณะ ในปี 1998 ได้นำวิธีดังกล่าวมาดัดแปลงเป็น single step multiplex RT-PCR เพื่อแยกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี [19] ซึ่งจากรายงานการวิจัยเหล่านี้ที่สามารถใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจวินิจฉัยและแยกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้

Real-time Reverse transcription polymerase chain reaction assay (qRT-PCR)

เนื่องจากในปัจจุบัน conventional PCR เช่น RT-PCR ยังไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ แม้จะมีการพัฒนาในรูปแบบต่าง ๆ จึงทำให้มีการพัฒนาเทคนิค Real-time Reverse transcription polymerase chain reaction assay (qRT-PCR) ขึ้นมา การทำ real time PCR จึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยที่สามารถวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นในเวลานั้น ต่างจาก conventional PCR ที่จะทำหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา

การตรวจวัด PCR product ที่เกิดขึ้นนั้น เกิดจากการที่ PCR product ถูกทำให้เกิดสัญญาณเรืองแสง ซึ่งในปัจจุบันมีอยู่หลายวิธี วิธีที่เป็นที่นิยมวิธีหนึ่ง คือ การใช้ SYBR Green I dye ซึ่ง SYBR Green I เป็นสารเรืองแสง (fluorochrome) ที่เข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัตราไวโอเลต จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของฟลูออเรสเซนต์ ในช่วง denaturation เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากเส้นคู่ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยวนั้น SYBR Green I จะยังไม่สามารถเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SYBR Green I จะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอเส้นคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต แต่เมื่อรอบของ PCR กลับมาถึงช่วงการ denaturation อีกครั้ง SYBR Green I ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง โมเลกุลของสีจะจับได้มากน้อยขึ้นกับความยาวของ PCR product สำหรับ SYBR Green I ที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่แล้วถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีจะเกิดการคายพลังงานออกมาในรูปแบบของแสงและสามารถตรวจจับโดยตัวรับสัญญาณที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real time thermocycler



รูปภาพ 6: การใช้ SYBR Green I dye

มีรายงานการศึกษาของ Johnson และคณะ ในปี 2005 ได้คิดค้นและพัฒนาการทำ qRT-PCR แบบ fourplex reaction โดยใช้ specific primers และ fluorogenic probes 4 เซท ใน reaction mixture เดียวกัน ซึ่งความเข้มข้นของไวรัสที่น้อยที่สุดที่เทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้คือ 0.5 PFU ของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1 และ 0.002 PFU ของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2, 3 และ 4 [23] ถัดมา ในปี 2006 Chien และคณะ ได้ทำการปรับปรุงและพัฒนาไพรเมอร์ D1, TS1, TS2 และ TS4 ที่ใช้ในการทำ RT-PCR ของ Lanciotti และคณะ เพื่อให้สามารถใช้ในการทำ qRT-PCR ได้ [20, 24] และในปี 2008 Dos Santos และคณะ ได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์ที่สามารถจับกับไวรัสเดงกีได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ เพื่อใช้ในการทำ qRT-PCR แบบ one step โดยใช้ SYBR Green I dye [25]

การติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยง (Dengue virus infection in cell culture)

เมื่อไวรัสเข้าไปทำการเจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยงแล้วนั้น จะเกิดปรากฏการณ์ของเซลล์เมื่อเซลล์เกิดพยาธิสภาพ เรียกว่า cytopathic effect (CPE) ลักษณะของ CPE ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mammalian cell เช่น LLC-MK2 มักจะมีทั้งที่เป็นลักษณะกลมและจับเป็นกลุ่ม (round and clumping) หรือเซลล์กลมใหญ่ มีนิวเคลียสมากกว่า 1 นิวเคลียสภายในเซลล์ขนาดใหญ่นั้น ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของเซลล์ข้างเคียง (syncytial formation) และเซลล์แตก (lysis) [1, 15]

ปี 1974 มีรายงานการศึกษาของ Cantazaro และคณะ โดยทำการทดลองใน LLC-MK2 cell line ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 โดยใช้ MOI (multiplicities of infection) 2 และ 10 พบว่าสามารถย้อมดูการแสดงออกของ membrane antigen protein โดยใช้เทคนิค immuno cytolysis ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการดูได้ตั้งแต่ 18 ชั่วโมงหลังจากที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสแล้ว [26]

ปี 1976 มีรายงานการศึกษาของ Theofilopoulos และคณะ ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ DENV-2 ใน human lymphoblastoid cell line โดยการใช้ค่า MOI 0.05 - 1 สามารถเห็น membrane bound dengue virus ได้หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อไวรัส [27]

ปี 2005 มีรายงานการศึกษาของ Miller และคณะ ได้ทำการศึกษารูปแบบของตำแหน่งรวมถึงการแสดงออกของ NS4B ใน Huh-7 cell line และ Vero cell line โดยการใช้ MOI 2 - 4 ซึ่งใช้ DENV-2 ในการทดลอง จากนั้นจึงเก็บเซลล์ตามช่วงเวลาต่างๆ คือ 14 ,24, และ 38 ชั่วโมง ภายหลังการติดเชื้อ ผลการศึกษานั้นแสดงให้เห็นว่า สามารถย้อม fluorescence พบ DENV-NS4B ได้ตั้งแต่ 14 ชั่วโมงขึ้นไป [28]

ปี 2010 มีรายงานการศึกษาของ Azhar และคณะ ซึ่งทำการแยกเชื้อไวรัสเดงกี (viral isolation) จากซีรัมของผู้ป่วยในเซลล์ C6/36 และ LLC-MK2 โดยพบการเกิด CPE ในเซลล์ C6/36 ภายใน 1-4 วัน ในขณะที่เซลล์ LLC-MK2 พบวันที่ 7-12 หลังจาก inoculation โดยลักษณะ CPE ในเซลล์ C6/36 ที่พบคือ เซลล์มีขนาดใหญ่และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (multinucleated giant cells) บางเซลล์**เกิดการรวมกันได้เซลล์ ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส แต่ละนิวเคลียสจะเล็กและขอบเซลล์จะไม่กลมเหมือน** multinucleated giant cell ส่วนลักษณะ CPE ในเซลล์ LLC-MK2 มีลักษณะคล้ายที่พบในเซลล์ C6/36 แต่พบบางเซลล์ที่มีลักษณะกลม บวม (rounding and swelling) โดยใช้เทคนิค immunofluorescence assay (IFA, polyclonal antibody 1:1000) ในการยืนยันเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส [15]

ปี 2011 Potiwat และคณะ ได้ทำการศึกษาการเกิด co-infection ระหว่างเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus) ในเซลล์เพาะเลี้ยง C3/36 ด้วยการทำให้เซลล์ดังกล่าวติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นเท่ากัน และติดด้วยเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่เข้มข้นมากกว่าเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 แล้วตรวจสอบด้วยวิธี one-step duplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (D-RT-PCR) โดยใช้ specific primer พบว่าให้ผลบวกทั้งคู่ แต่ในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่มีความเข้มข้นมากกว่าเชื้อไวรัสชิคุนกุนยานั้น เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี D-RT-PCR แล้วให้ผลบวกเฉพาะเชื้อไวรัสเดงกีซีโรป์ 3 เท่านั้น จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสเดงกีมีการแย่งกด (competitive suppression) การติดเชื้อเซลล์ของเชื้อชิคุนกุนยาในขณะที่เกิด co-infection [29]

การติดเชื้อไวรัสเดงกีมากกว่าหนึ่งซีโรไทป์ (Muti-Serotype Infection of Dengue Virus)

การติดเชื้อเดงกีไวรัสแบบสองซีโรไทป์ในผู้ป่วยนั้นมีรายงานจากหลายประเทศ ในปี 1985 Gubler และคณะ ได้รายงานการพบการติดเชื้อไวรัสเดงแบบสองซีโรไทป์ในซีรัมผู้ป่วย เพศชาย อายุ 16 ปี ในประเทศเปอโตริโก โดยพบเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1 และ 4 ซึ่งรายงานนี้ถือเป็นรายงานแรกที่พบการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก [30]

ปี 2005 Wenming และคณะ ได้รายงานการพบการติดเชื้อไวรัสเดงแบบสองซีโรไทป์ใน serum ผู้ป่วยที่พึ่งกลับจากประเทศศรีลังกา เป็นเพศชาย อายุ 36 ปี ในประเทศจีน โดยพบเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 [31]

ปี 2006 มีรายงานการศึกษาของ Thavara และคณะ พบเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2, 3 และ 4 ในยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ทั้งตัวผู้และตัวเมีย และพบเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 ในยุงลายสวน *Aedes albopictus* ตัวเมีย และพบการติดเชื้อแบบสองซีโรไทป์ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 กับ 3 ใน *Aedes aegypti* ทั้งตัวผู้และตัวเมีย และใน *Aedes albopictus* ตัวเมีย ซึ่งตัวอย่างยุงทั้งหมดเก็บมาจากจังหวัดกระบี่ ภูเก็ต พังงา และสุราษฎร์ธานี ในช่วงต้นฤดูฝนของปี 2005 คณะผู้วิจัยได้อภิปรายเอาไว้ว่าการพบเชื้อไวรัสเดงกีที่มากกว่าหนึ่งซีโรไรไทป์ในตัวยุงทั้งสองชนิดนั้นเป็นหนึ่งในความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงได้ ในปีเดียวกันนั้น Araujo FM และคณะ ได้พบการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ด้วยซีโรไทป์ 2 และ 3 ในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก โดยใช้เทคนิค type specific indirect immunofluorescence assay และยืนยันผลด้วย RT-PCR ซึ่งรายงานนี้ถือเป็นรายงานแรกที่พบการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในประเทศบราซิล [32]

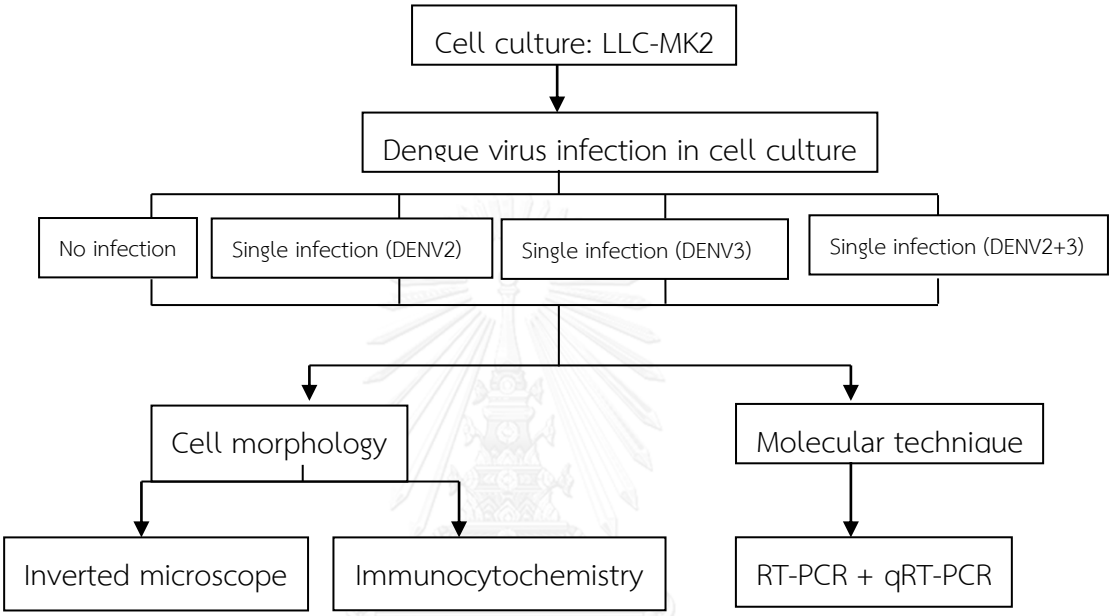
ปี 2008 มีรายงานการศึกษาของ Bharaj และคณะ พบว่ามีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ในประเทศอินเดียเพิ่มมากขึ้น โดยมีซีโรไทป์ 3 เป็นซีโรไทป์ที่พบมากที่สุด และจากรายงานนี้ยังพบการติดเชื้อแบบมากกว่าหนึ่งซีโรไทป์มากขึ้นด้วย โดยพบเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยซีโรไทป์ 1 และ 3 มากที่สุด รองลงมาคือ ซีโรไทป์ 1 และ 4 และในปีเดียวกันนั้น Pepin และคณะพบว่าเมื่อมีการเกิด co-infection ระหว่างเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 4 แล้ว ทั้งเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทป์ 2 และ4 มีการลดการเพิ่มจำนวนเมื่อเปรียบเทียบกับการติดเชื้อแบบซีโรไทป์เดียว (single infection) และพบว่าเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทป์ 2 ถูก suppression ได้มากกว่าซีโรไทป์ 4 [33]

ปี 2014 Quintero-Gil และคณะ ได้ทำการศึกษาดู replication ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 ในการติดเชื้อแบบ co-infections ในเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 และในยุงลาย *Aedes aegypti* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR ผลการศึกษาพบว่า จำนวนของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มีการเพิ่มจำนวนมากกว่าไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ทั้งการศึกษาใน *in vitro* และ *vivo* [10]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

แผนการวิจัย (Experimental Design)



ระเบียบวิธีวิจัย (Research Materials and Methods)
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Autoclave (Hirayama, Japan)
2. Biohazard Safety Cabinet class II (Esco, Singapore)
3. Deep freezer -80°C (Sanyo, Japan)
4. Freezer -30°C (Sanyo, Japan)
5. Gel chamber (SciePlas, UK)
6. Gel Doc (Quantum ST4 100, France)
7. Hot oven incubator (Memmert, Germany)
8. Hot plate and Magnetic stirrer (Labtech, Korea)
9. Incubator (Memmert, Germany)
10. Micro centrifuge (Labtech, Korea)
11. Microwave (Sharp, Thailand)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12. Mini centrifuge (WiseSpin, Korea)
13. Nano drop spectrophotometer (Thermo, USA)
14. PCR thermal cycle (Eppendorf, Germany)
15. pH meter (Schott, Germany)
16. Power supply (Biorad, USA)
17. Refrigerated centrifuge (Eppendorf, Germany)
18. Refrigerator 4°C (Sanyo, Japan)
19. Rotor Gene 6000 Real time PCR machine (Corbett Life Science, QIAGEN, Germany)
20. Safety Cabinet for PCR preparation (Augustin, Thailand)
21. Stop watch (Canon, Thailand)
22. Vortex mixer (WiseMix, Korea)
23. Water bath (WiseBath, Korea)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Alcohol flame lamp (Suksapan, Thailand
2. Auto pipettes size 0.1-2.5 µl, 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl and 10-1000 µl (Eppendorf, Germany; Biohit, Finland)
3. Autoclave tape (3M, Thailand)
4. Beaker size 250 ml (Pyrex, Germany)
5. Blue pad (SOFT ‘n SECURE, Thailand)
6. Bottle top filter size 500 ml (Corning, USA)
7. cover glass 22x22 mm , thick 0.13-0.17 mm (HAD)
8. Duran bottles size 50 ml, 200 ml, 250 ml, 500 ml and 1000 ml (Schott,
9. Filter tips size 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl and 1000 µl (Axygen, USA)
10. Flask size 250 ml and 500 ml (Pyrex, USA)
11. Forceps (Hilbro, Pakistan)
12. Micro tube size 1.5 ml (Axygen, USA)
13. Para film paper (Parafilm M, USA)
14. PCR racks and 1.5 ml racks (Axygen, USA)
15. PCR tube size 0.2 µl (Axygen, USA)

16. Plastic boxes (Axygen, USA)
17. plus slide (Superfrost plus microscope slides , Thermo scientific
18. Sterile plastic serological pipettes size 5 ml and 10 ml (Costar, USA)
19. Sterile tips size 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl and 1000 µl (Axygen, USA)
20. sterile tube 15 ml and 50 ml (Corning, USA)
21. Tissue paper (RiverPro, Thailand)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. absolute alcohol
2. Cytology formulation consul-mounting , xylene base (Thermo Shandon)
3. DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride)
4. DNase – Rnase free water , molecular grade (Gibco)
5. Goat anti-mouse IgG2a horseradish peroxidase conjugate (A10685; Life technologies, USA)
6. Mayer's Haematoxylin (ready to use)
7. Minimum Essential Medium (powder) (Gibco, Life technologies, USA)
8. Mouse anti-dengue complex monoclonal antibody (MAB8705; Chemicon, Temecula, CA)
9. Mouse anti-dengue type 2 virus monoclonal antibody (MAB8702; Chemicon, Temecula, CA)
10. Mouse anti-dengue type 3 virus monoclonal antibody (MAB8702; Chemicon, Temecula, CA)
11. Mouse Monoclonal Antibody IgG2a negative control (MABC004; Chemicon, Temecula, CA)
12. normal goat serum (NGS) (Pan Biotech GmSH)
13. Phosphate buffer saline (PBS)
14. Sterile water
15. TBE
16. Xylene

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Stock virus

DENV2 (16681) 3.5×10^6 PFU/ml

DENV3 (16562) 3.0×10^5 PFU/ml

เชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (Armed Forces Research Institute of Medical Sciences: AFRIMS) และคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ LLC-MK2 เป็นเซลล์จาก Rhesus monkey kidney epithelial cells ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Media (MEM) ที่มี 10% fetal bovine serum และ 100 U penicillin, 100 ug/mL streptomycin โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และ 5% CO_2 (อ้างอิงจาก ATCC CCL-7)

การ infect ไวรัสเดงกีและการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ (Cell morphology)

เพาะเลี้ยงเซลล์ LLC-MK2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM โดยให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1.2×10^6 เซลล์ต่อหลุม (6-well plate) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วใส่ไวรัสที่เตรียมไว้ จากสูตรคำนวณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Virus innuoculum (µl) = (cell per flask)(MOI) / (virus titer in PFU) x (1000 µl)

โดยกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์มีสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ที่ความเข้นข้น 3.5×10^6 pfu/ml กำหนดให้มี MOI (multiplicity of infection) = 1 และกลุ่มที่สอง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่ความเข้นข้นตั้งต้น 3.0×10^5 pfu/ml กำหนดให้มี MOI = 1 กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ที่ความเข้น3.5×10^6 pfu/ml และ ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่ความเข้นข้นตั้งต้น 3.0×10^5 pfu/ml โดยกำหนดให้แต่ละซีโรไทป์มี MOI = 0.5 (เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ เป็น MOI = 1 เช่นเดียวกับหลุมที่ทาให้เซลล์ติดเชื้อซีโรไทป์เดียว และสามารถเปรียบเทียบกันได้) ทำการ adsorb ไวรัสในแต่ละหลุมปริมาณ 1 ml จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ลงไป 1 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีหลุมที่ไม่ infect ไวรัสเป็นหลุม

ควบคุม (control) ทำการกลิ้ง plate เบาๆ ทุก 15 นาที เมื่อครบเวลา นำเซลล์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเซลล์ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์และสองซีโรไทป์

การตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Immunocytochemistry

1. นำเซลล์ลงบนสไลด์ ทำให้เซลล์ติดกับสไลด์โดยนำมาปั่นลงด้วยเครื่อง cytocentrifuge ที่ความเร็วรอบ 1500 rpm/min
2. การตรึงเซลล์ โดยใช้อาซีโตนเย็น (cold acetone) เป็น fixative หลังการนำเซลล์ลงบนสไลด์แล้ว แช่สไลด์ใน cold acetone 10 นาที เมื่อครบเวลานำสไลด์มาผึ่งให้แห้ง
3. นำสไลด์ที่มีผ่านการตรึงเซลล์แล้วมา หยด 10% normal goat serum จากนั้น incubate เป็นเวลา 30 นาที ในภาชนะที่ชื้น (moist chamber)
4. เมื่อครบเวลาทำการล้างด้วย PBS pH 7.4 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วสะบัดให้แห้ง
5. เตรียม primary antibody โดยใช้ความเข้มข้น 1:200 หยดลงบนสไลด์ให้ท่วมเซลล์ จากนั้น incubate เป็นเวลา 60 นาที
6. เมื่อครบเวลาทำการล้างด้วย PBS pH 7.4 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วสะบัดให้แห้ง
7. เตรียม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ในที่นี้ใช้เป็น goat anti-mouse IgG2a horseradish peroxidase conjugate โดยใช้ความเข้มข้น 1:500 หยดลงบนสไลด์ให้ท่วมเซลล์ จากนั้น incubate เป็นเวลา 30 นาที
8. เมื่อครบเวลาทำการล้างด้วย PBS pH 7.4 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วสะบัดให้แห้ง
9. หยด DAB ลงบนสไลด์ให้ท่วมเซลล์ จากนั้น incubate เป็นเวลา 10 นาที
10. เมื่อครบเวลาทำการล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง แล้วสะบัดให้แห้ง
11. ทำการ counter stain ด้วยการหยดสี hematoxylin ลงบนสไลด์ให้ท่วมเซลล์ แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง แล้วสะบัดให้แห้ง
12. จุ่มสไลด์ลงใน 95% alcohol 10 ครั้ง
    95% alcohol 10 ครั้ง
    Absolute alcohol 10 ครั้ง
    Absolute alcohol 10 ครั้ง
    xylene 15 ครั้ง
    xylene 15 ครั้ง
    ตามลำดับ
13. ทำการ mounting slide

14. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์และสองซีโรไทป์

การสกัด RNA โดยใช้ QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

1. เติม buffer AVL carrier RNA 560 µl ลงใน supernatant 140 µl ที่เตรียมไว้ใน 1.5 µl tube mix โดยการ vortex 15 วินาที
2. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง (25 ˚C) 10 นาที Spin down เบาๆ ให้สารละลายที่ติดฝาด้านบนลงมาผสมกับสารใน tube
3. เติม absolute ethanol ลงไป 560 µl mix โดยการ vortex 15 วินาที Spin down เบาๆ
4. เติมสารละลายในข้อ 4 ลงไปใน column 630 µl ปั่นที่ 8000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้งไป ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้งกรณีมีสารละลายในข้อ 4 เหลืออยู่
5. เติม buffer AW1 ลงไป 500 µl ปั่นที่ 8000 rpm นาน 1 นาที เทน้ำใน collection tube ทิ้งไป
6. เติม buffer AW2 ลงไป 500 µl ปั่นที่ 1400 rpm นาน 3 นาที ทิ้ง collection tube นั้นไป
7. Dry column โดยปั่นที่ 14000 rpm นาน 1 นาที
8. Elute RNA ออกจาก column โดยเติม buffer AVE 40 µl จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้อง (25 ºC) นาน 1 นาที ปั่นที่ 9000 rpm นาน 1 นาที
9. แบ่ง RNA เก็บใส่ tube ที่ อุณหภูมิ -80 ºC

การทำ one step RT-PCR

หลังจากการสกัด Viral RNA จากอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ที่เก็บมาในแต่ละวันจากทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง (no infection, DV2 infection, DV3 infection และ DV2+3 infection) จากนั้นนำมาทำ one step RT-PCR โดย protocol และ primers ที่ใช้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Lanciotti และคณะ [20] ดังตารางที่ 1 และ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง 1: primers ที่เลือกมาใช้ คือ DV1 และ DV2

Primer	Sequence	Size (bp) of amplified DNA product
DV1	5′ TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3′	511
DV2	5′ TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC 3′	

ตาราง 2: ส่วนประกอบของ PCR reaction

Mixtures	1X Volume (µl)
5X buffer	4
10 mM dNTPs	0.8
10 µM DV1	1
10 µM DV2	1
Riboinhibitor	0.2
RNase free water	8.2
Enzyme mix	0.8
RNA template	4
Total	20

นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycle โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้

Reverse transcription step	50 °C	30 นาที	
Innitial PCR activation step	95 °C	15 นาที	
Denaturation step	94 °C	1 นาที	40 cycles
Annealing step	55 °C	1 นาที	
Extension step	72 °C	2 นาที	
Final extension step	72 °C	7 นาที	
Keep	4 °C		

การทำ nested PCR

นำ PCR product จากการทำ one step RT-PCR มาใช้เป็น template ในการทำ nested PCR โดย protocol และ primers ที่ใช้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Lanciotti และคณะ [20] ดังตารางที่ 3 และ 4

ตาราง 3: primers ที่เลือกมาใช้ คือ DV1, TS2 และ TS3

Primer	Sequence	Size (bp) of amplified DNA product
DV1	5′ TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3′	
TS2	5′ CGCCACAAGGGCCATGAACAG 3′	119 (D1/TS2)
TS3	5′ TAACATCATCATGAGACAGAGC 3′	290 (D1/TS3)

ตาราง 4: ส่วนประกอบของ PCR reaction

Mixtures	1X Volume (µl)
10X buffer	2
25 mM $MgCl_2$	0.8
10 mM dNTPs	0.4
10 µM DV1	0.5
10 µM TS2	0.5
10 µM TS3	0.5
RNase free water	13.2
5U/µl HotStarTaq DNA Polymerase	0.1
RNA template	2
Total	20

นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycle โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้

Innitial PCR activation step	95 °C	15 นาที	
Denaturation step	94 °C	1 นาที	40 cycles
Annealing step	58 °C	1 นาที	
Extension step	72 °C	2 นาที	
Final extension step	72 °C	10 นาที	
Keep	4 °C		

Gel electrophoresis

นำ PCR product มาตรวจดูด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่เตรียมได้จาก agarose ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 110 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปเปรียบเทียบขนาด DNA กับ 100 bp DNA Ladder ภายใต้ ultraviolet transilluminator และบันทึกผลโดยชุดถ่ายภาพเจล (gel documentation system)

การทำ one step qRT-PCR

protocol และ primers ที่ใช้อ้างอิงจากการศึกษาของ Santos และคณะ [24] ดังตารางที่ 5 และ 6

ตาราง 5: primers ที่เลือกมาใช้ คือ mDV1, mTS2 และ TS3

Primer	Sequence
mDV1	5′ TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG 3′
mTS2	5′ CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT 3′
TS3	5′ TAACATCATCATGAGACAGAGC 3′

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 6: ส่วนประกอบของ PCR reaction

Mixtures	Volume (µl)
2X QuantiTest SYBR green RT-PCR	10
10 µM mDV1	0.5
10 µM mTS2 or TS3	0.5
QuantiTest RT-Mix	0.2
RNase free water	6.8
RNA template	2
Total	20

นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง Rotor Gene 6000 Real time PCR machine (Corbett Life Science, QIAGEN, Germany) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้

Reverse transcription step	50 ℃	35 นาที	
Activation hot start enzyme step	95 ℃	15 นาที	
Denaturation step	94 ℃	15 วินาที	40 cycles
Annealing step	54 ℃	30 วินาที	
Extension step	72 ℃	30 วินาที	
Melting (Tm) step	60 ℃	1 วินาที	
	95 ℃	15 วินาที	

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เปรียบเทียบลักษณะ CPE ของการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยงระหว่างการติดเชื้อแบบหนึ่งซีโรไทป์และสองซีโรไทป์และเปรียบเทียบปริมาณไวรัสแต่ละซีโรไทป์ของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์กับหนึ่งซีโรไทป์ โดยใช้ one way ANOVA ($p < 0.05$)

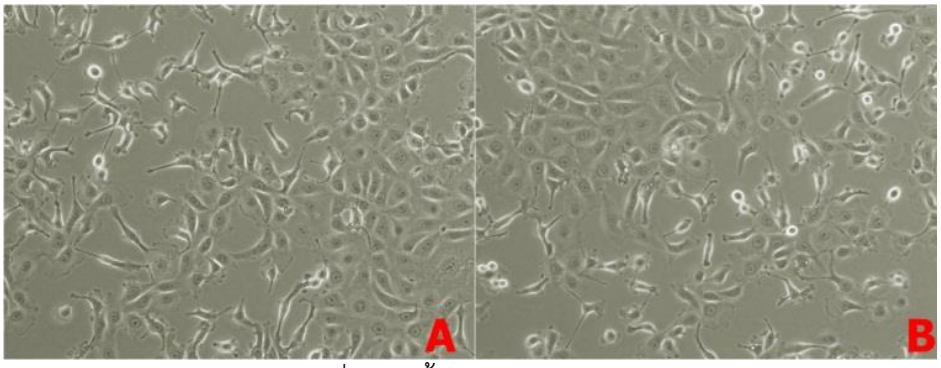
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

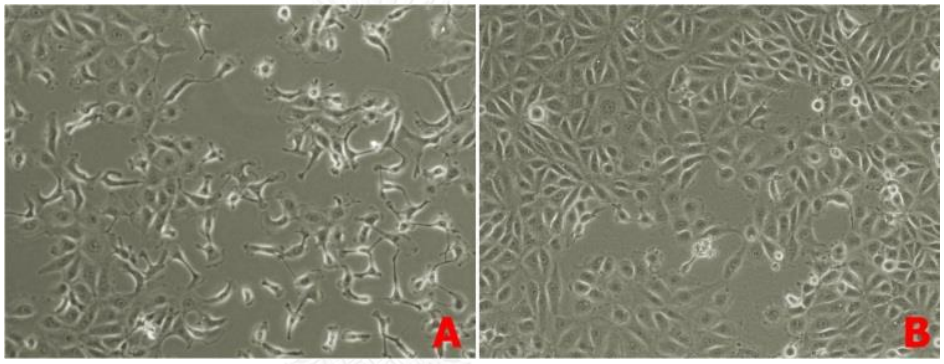
ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์

เซลล์ LLC-MK2 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ก่อนนำมาทำการ infect ด้วยไวรัสเดงกี ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี 10% fetal bovine serum โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C, 5% CO_2 พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดี อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงนั้นมีลักษณะใส ไม่มีตะกอนของการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและรา จากนั้นจึงทำการย้ายเซลล์ลงใน 6-well plate เพื่อเตรียมทำการศึกษาต่อไป

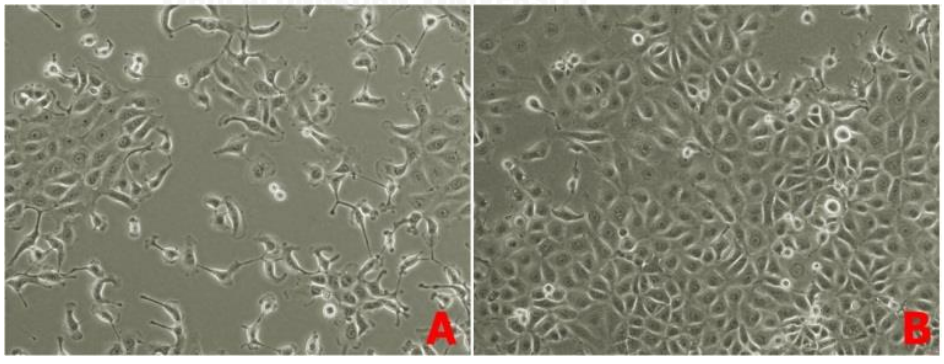
ในการ infect ไวรัสเดงกี เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตประมาณร้อยละ 80-90 จึงทำการ infect ไวรัสเดงกีลงไป โดยกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์มีสองกลุ่ม คือกลุ่มที่หนึ่งใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ที่ MOI = 1 และกลุ่มที่สอง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่ MOI = 1 กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 โดยแต่ละซีโรไทป์มี MOI = 0.5 เมื่อสังเกตลักษณะเซลล์ที่ infect ด้วยไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์และสองซีโรไทป์ เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี นาน 1-2 วัน หลังทำการ infect ไวรัสเดงกี พบว่า ลักษณะรูปร่างของเซลล์ ไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 7 – 10 เริ่มสังเกตเห็นความแตกต่างของเซลล์เมื่อเข้าสู่วันที่ 3 หลังทำการ infect ไวรัสเดงกี โดยกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์มี และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ เซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนมากกกว่าเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี ในบางบริเวณ เซลล์จะมีการเกาะกลุ่มและเบียดกันแน่น ดังแสดงในรูปที่ 11 – 14 เมื่อเข้าสู่วันที่ 4 หลังทำการ infect ไวรัสเดงกี กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ จะสังเกตพบบางเซลล์มีลักษณะกลม ใหญ่ การเกาะกลุ่มกันของเซลล์พบมากขึ้น เซลล์เบียดกันแน่นมากขึ้น ภายในเซลล์เริ่มมีสีคล้ำและเริ่มพบช่องวางภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี ดังแสดงในรูปที่ 15 – 18 เข้าสู่วันที่ 5 หลังทำการ infect ไวรัสเดงกี เซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ มีสีคล้ำเข้มขึ้น สังเกตพบเซลล์ที่มีลักษณะกลม ใหญ่ แลแซลล์ที่มี 2 – 3 นิวเคลียสในเซลล์เดียว ในหลายบริเวณ การเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นกลุ่มใหญ่มากขึ้นมากขึ้น สังเกตพบช่องว่างภายในเซลล์มากขึ้นและช่องว่างเหล่านั้นมีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์ของกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์เริ่มมีการหลุดลอย ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกีเริ่มมีการแบ่งตัวมากขึ้น แต่เซลล์มีดูลักษณะสมบูรณ์ ปกติดี ดังแสดงในรูปที่ 19 – 22 เมื่อเข้าวันที่ 6 เซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม มีการเกาะกลุ่มกันหนาแน่นมาก บางบริเวณเริ่มมีการหลุดร่อนออกจากพื้นผิว ส่วนกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์นั้น เซลล์หลุดร่อนออกจากพื้นผิวมากกว่าร้อยละ 80 ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกีนั้น เซลล์มีการแบ่งตัวจนเบียดกันหนาแน่น แต่ไม่พบการเกาะกลุ่มกัน ดังแสดงในรูปที่ 23 – 26



รูปภาพ 7: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 วัน (A) และ 2 วัน (B) (กำลังขยาย 100X)

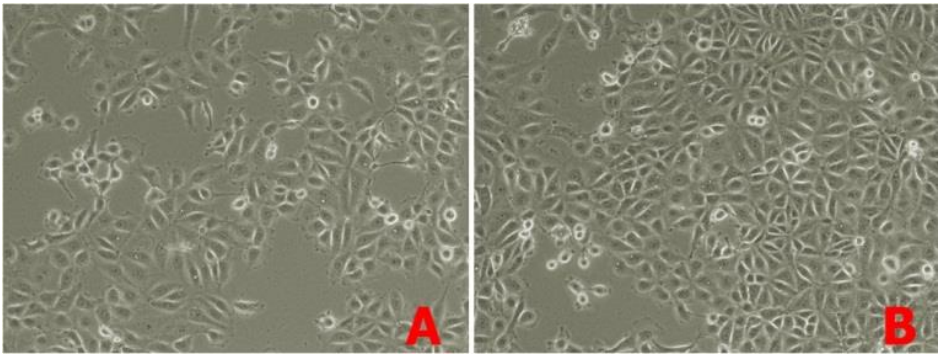


รูปภาพ 8: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 1 วัน (A) และ 2 วัน (B) (กำลังขยาย 100X)

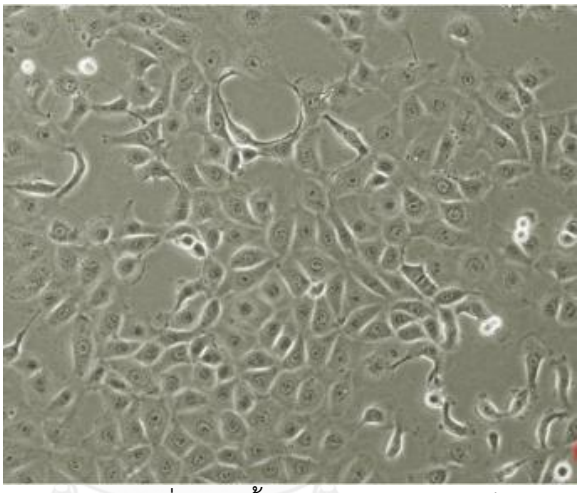


รูปภาพ 9: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 1 วัน (A) และ 2 วัน (B) (กำลังขยาย 100X)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

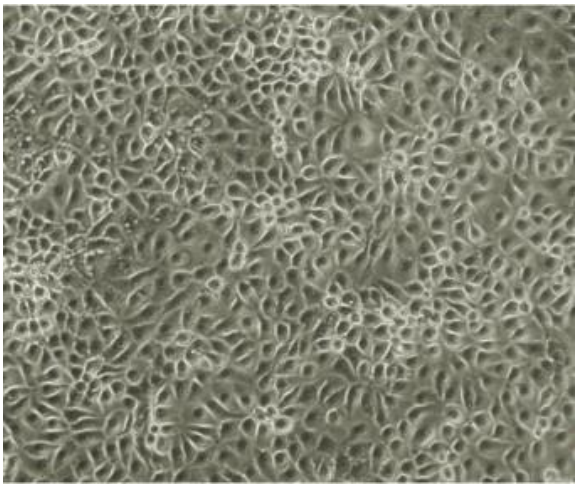


รูปภาพ 10: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 1 วัน (A) และ 2 วัน (B) (กำลังขยาย 100X)

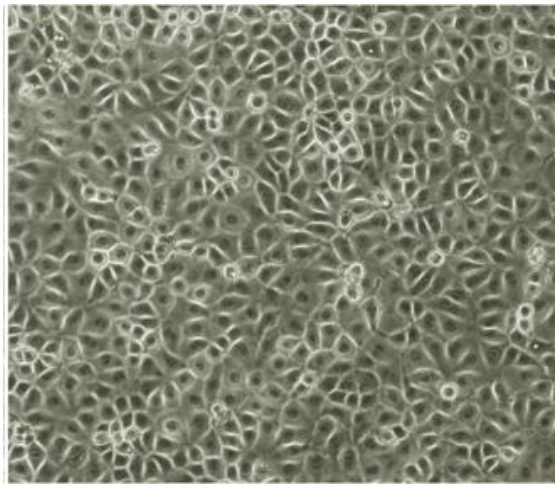


รูปภาพ 11: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน (กำลังขยาย 100X)

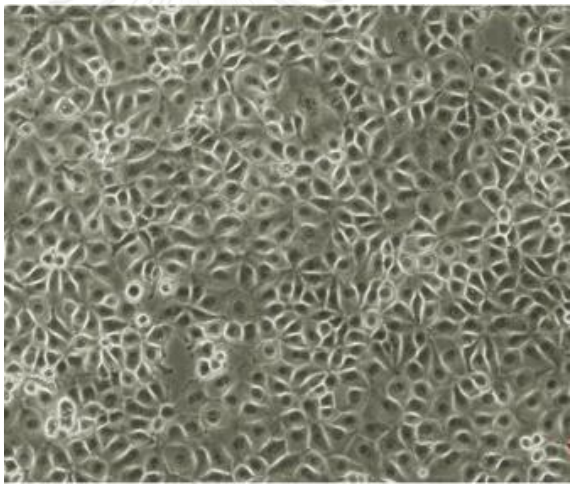
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



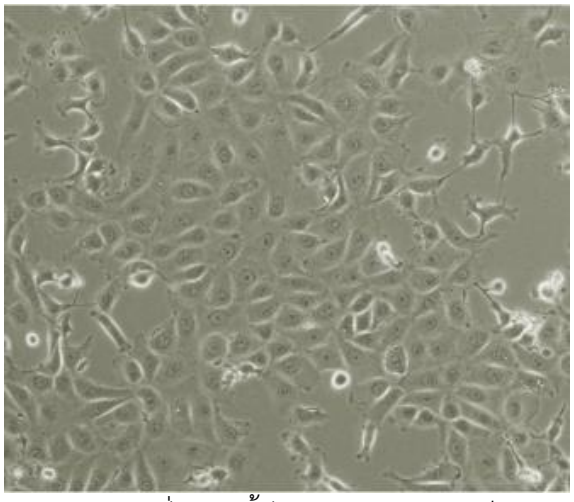
รูปภาพ 12: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 3 วัน (กำลังขยาย 100X)



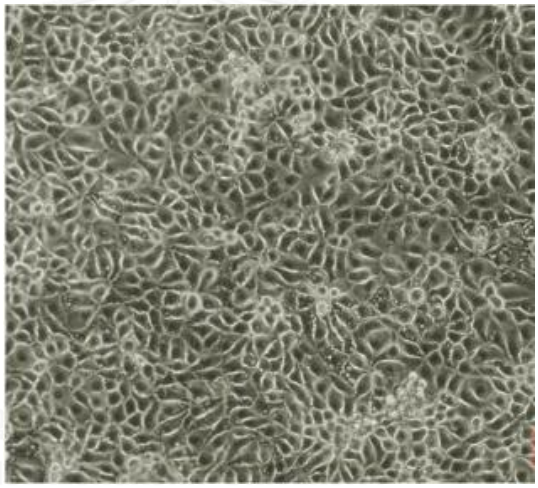
รูปภาพ 13: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 3 วัน (กำลังขยาย 100X)



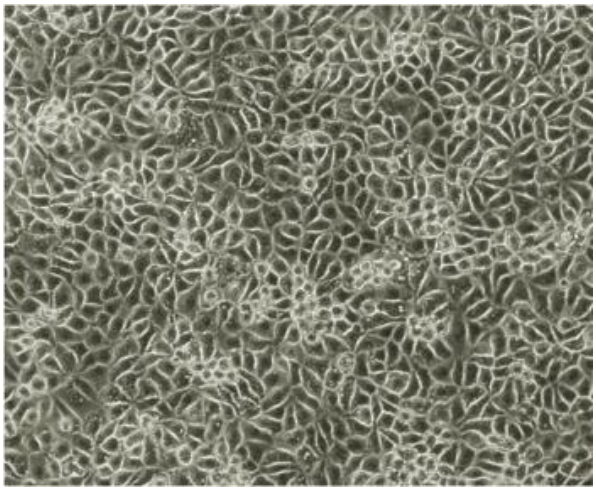
รูปภาพ 14: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 3 วัน (กำลังขยาย 100X)



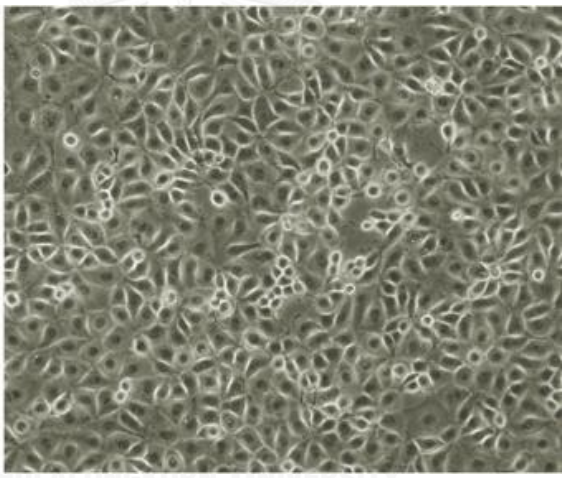
รูปภาพ 15: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (กำลังขยาย 100X)



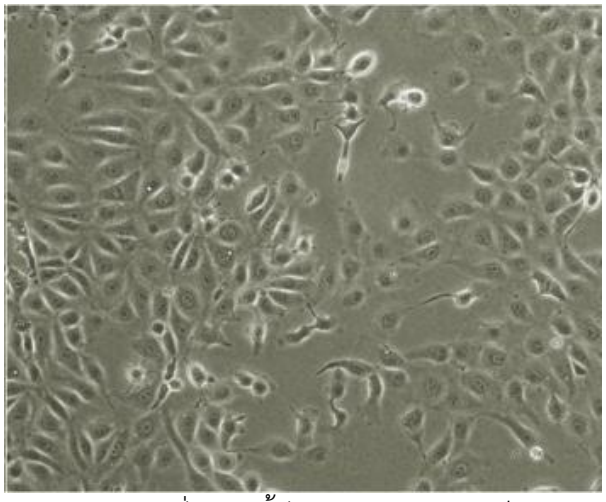
รูปภาพ 16: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 4 วัน (กำลังขยาย 100X)



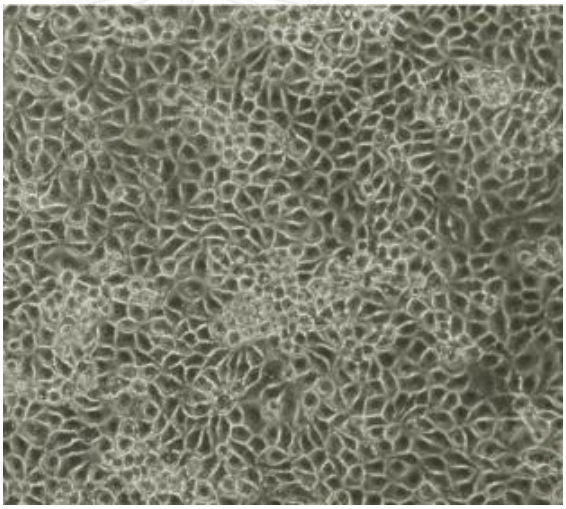
รูปภาพ 17: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 4 วัน (กำลังขยาย 100X)



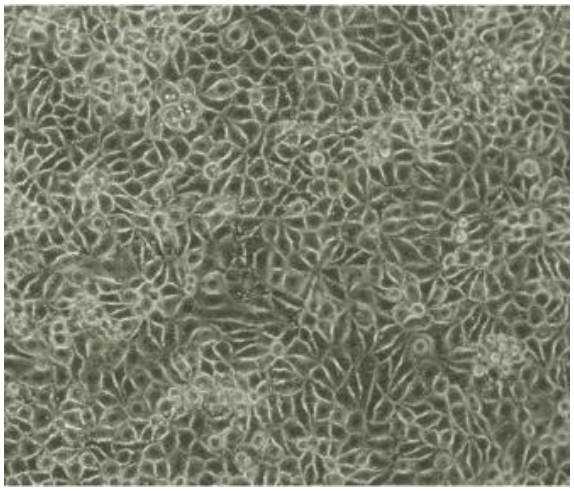
รูปภาพ 18: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 4 วัน (กำลังขยาย 100X)



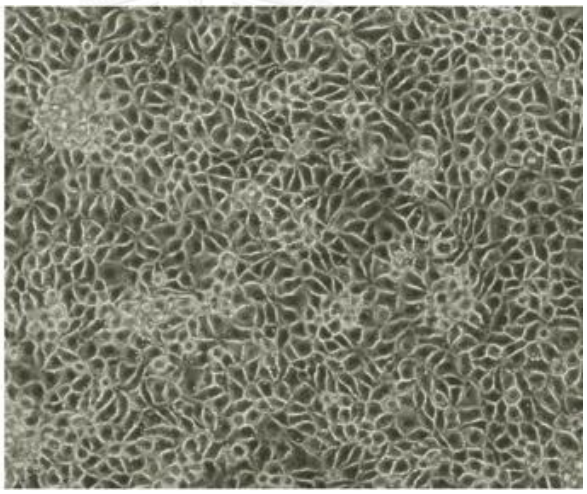
รูปภาพ 19: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน (กำลังขยาย 100X)



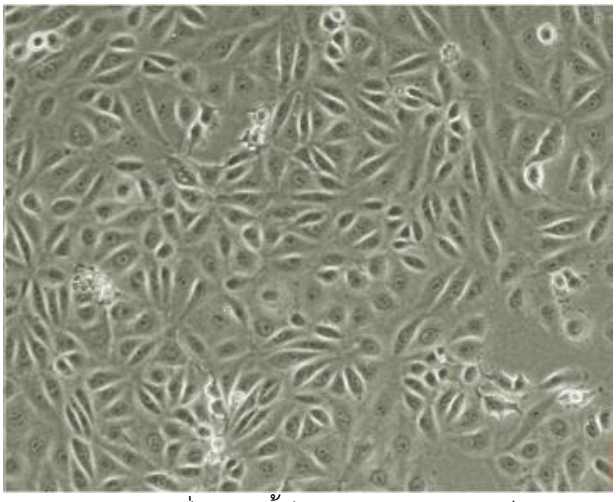
รูปภาพ 20: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 5 วัน (กำลังขยาย 100X)



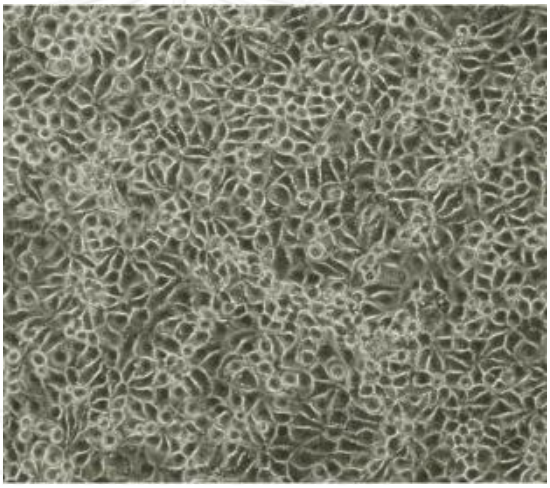
รูปภาพ 21: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 5 วัน (กำลังขยาย 100X)



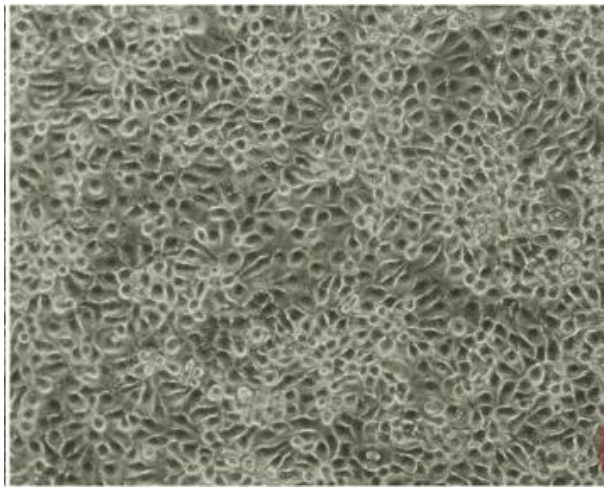
รูปภาพ 22: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 5 วัน (กำลังขยาย 100X)



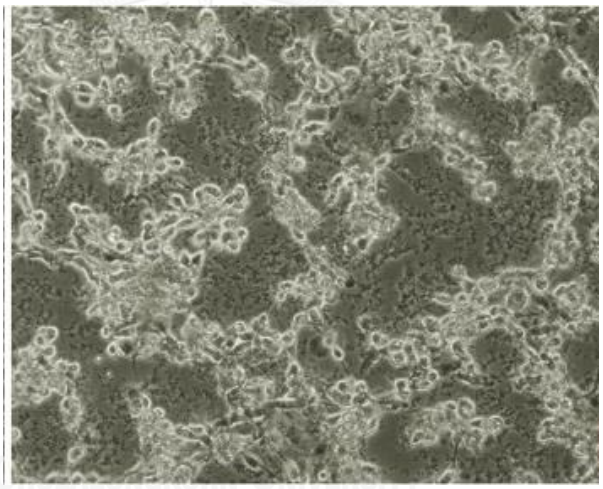
รูปภาพ 23: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (กำลังขยาย 100X)



รูปภาพ 24: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 6 วัน (กำลังขยาย 100X)



รูปภาพ 25: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 6 วัน (กำลังขยาย 100X)



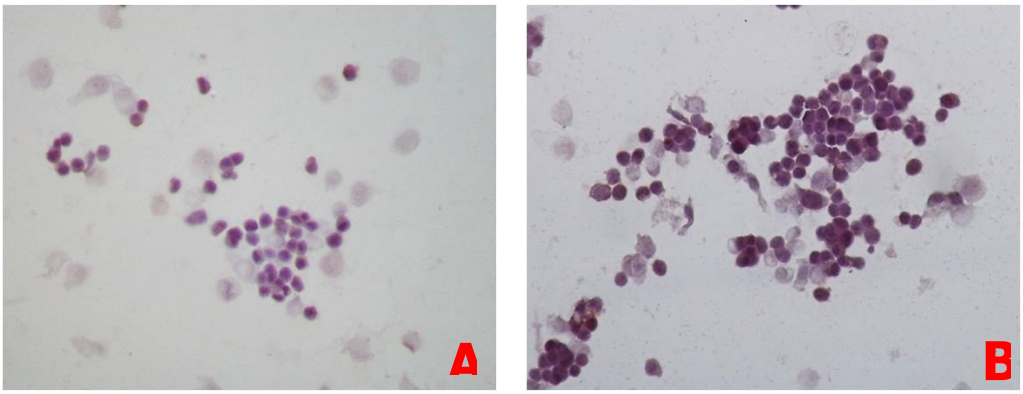
รูปภาพ 26: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 พร้อมกัน นาน 6 วัน (กำลังขยาย 100X)

ผลการตรวจหาแอนติเจนในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยวิธี immunocytochemistry

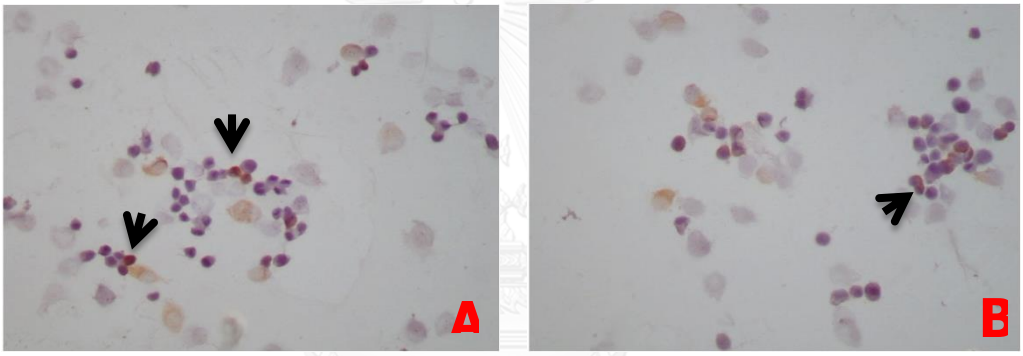
เทคนิค immunocytochemistry นั้น เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ โดยใช้ monoclonal antibody จับจำเพาะ ต่อโปรตีนที่เราสนใจ ซึ่งในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาแอนติเจนของไวรัสเดงกี ที่มีการสร้างออกมาในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้ DAB เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะเป็นตัวส่งสัญญาณและจะแสดงออกมาเป็นสีน้ำตาลในเซลล์ โดยเซลล์ที่ให้ผลบวกนั้นจะพบลักษณะการติดสีน้ำตาลของเซลล์

งานวิจัยนี้พบว่า เซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์มีสองกลุ่ม คือกลุ่มที่หนึ่ง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ที่ MOI = 1 และกลุ่มที่สอง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่ MOI = 1 กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 โดยแต่ละซีโรไทป์มี MOI = 0.5 และเซลล์กลุ่มควบคุมคือ เซลล์ที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี เมื่อเก็บเซลล์มาย้อมโดยใช้เทคนิค immunocytochemistry ในช่วงเวลาหลังจาก infection 1 – 6 วัน พบว่า การย้อมเซลล์ของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม ในวันแรก ยังไม่พบการย้อมติดสีน้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 27 ซึ่งแตกต่างจากลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบ 2 ซีโรไทป์พร้อมกัน เซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ สามารถย้อมเห็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีได้ในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง หลังจาก infection ลักษณะรูปแบบของเซลล์ที่ให้ผลบวก จะเห็นเป็นแกรนูลสีน้ำตาลเข้มภายในเซลล์ โดยแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีจะใช้ dengue type 2 virus monoclonal antibody (ความเข้มข้น 1:200) สำหรับตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2, dengue type 3 virus monoclonal antibody สำหรับตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ดังแสดงในรูปที่ 28 และ dengue complex monoclonal antibody (ความเข้มข้น 1:200) ดังแสดงในรูปที่ 29 เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมคือ เซลล์ที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี จะติดเพียงสีม่วงของ hematoxylin เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 30

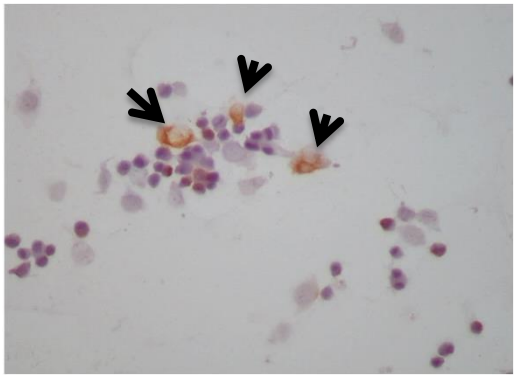
ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม สามารถย้อมเห็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีได้หลังจาก infected ไวรัสเดงกีไปแล้ว 2 วัน ลักษณะรูปแบบของเซลล์ที่ให้ผลบวก จะเห็นเป็นแกรนูลสีน้ำตาลเข้มภายในเซลล์เช่นเดียวกัน โดยแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีจากการ infect เซลล์ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 จะใช้ dengue complex monoclonal antibody (ความเข้มข้น 1:200) และ dengue type 2 virus monoclonal antibody (ความเข้มข้น 1:200) สำหรับตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ดังแสดงในรูปที่ 32 และ แอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีจากการ infect เซลล์ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 จะใช้ dengue complex monoclonal antibody (ความเข้มข้น 1:200) และ dengue type 3 virus monoclonal antibody (ความเข้มข้น 1:200) ดังแสดงในรูปที่ 33 โดยในวันที่ 2 หลังการ infect เซลล์นั้น ระดับการติดสีน้ำตาลในเซลล์ของกลุ่มที่มีการติดเชื้อแบบ 1 และ 2 ซีโรไทป์ ไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 31 และเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 5 และ 6 นั้นเซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ สามารถตรวจพบการติดสีน้ำตาลของเซลล์ได้ปริมาณมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 34 และ 3ถ เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกียังคงติดเพียงสีม่วงของ hematoxylin เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 36



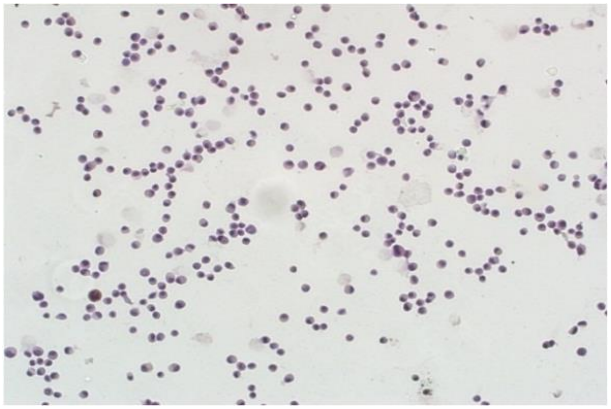
รูปภาพ 27: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 (A) และ 3 (B) นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody



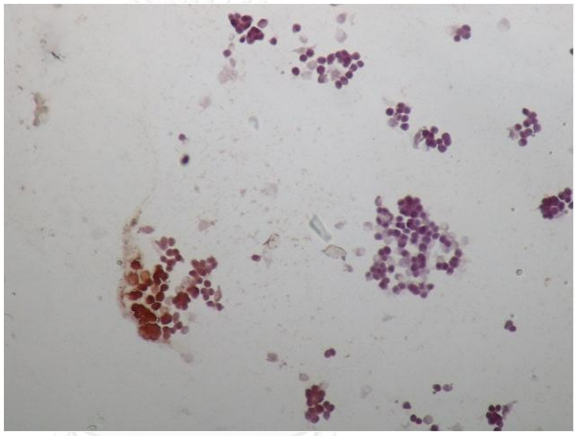
รูปภาพ 28: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์กีแบบ 2 ซีโรไทป์พร้อมกัน นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody (A) และ dengue type 3 virus monoclonal antibody (B)



รูปภาพ 29: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์กีแบบ 2 ซีโรไทป์พร้อมกัน นาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody

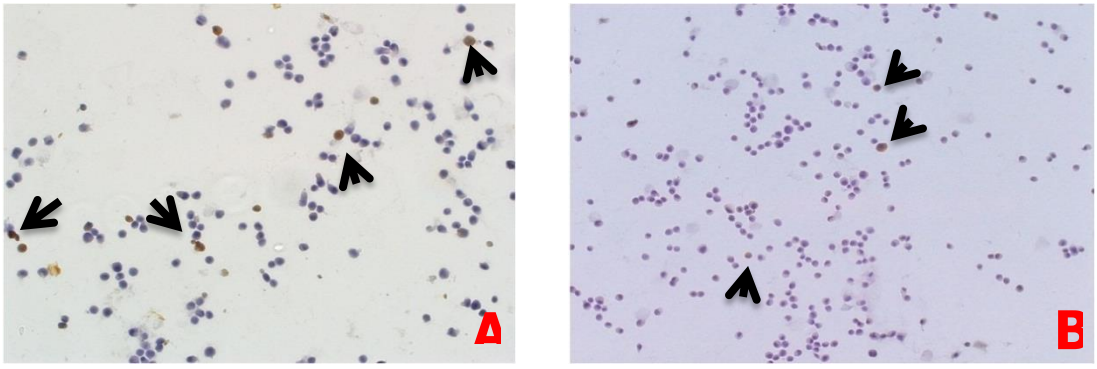


รูปภาพ 30: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody

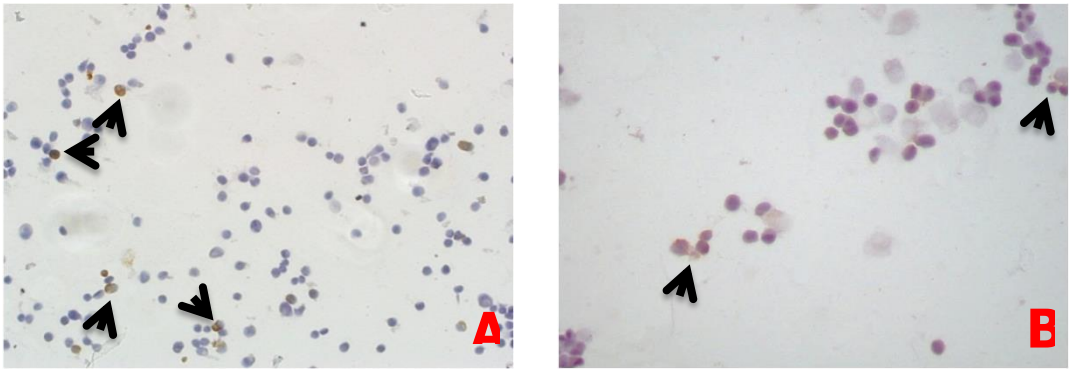


รูปภาพ 31: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์แบบ 2 ซีโรไทป์ นาน 2 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody

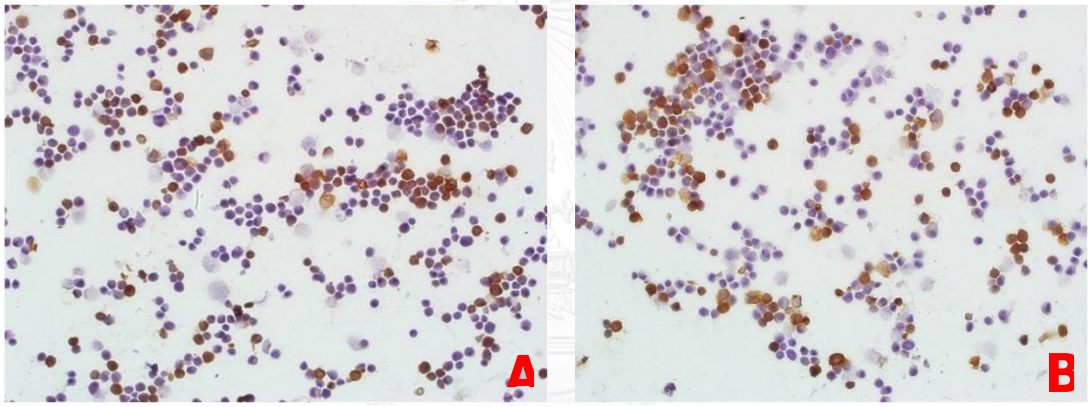
Chulalongkorn University



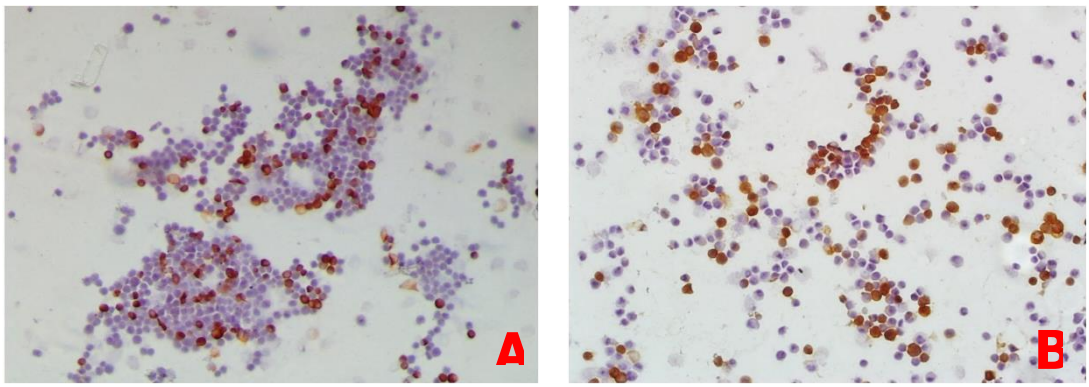
รูปภาพ 32: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 2 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody (A) และ dengue type 2 virus monoclonal antibody (B)



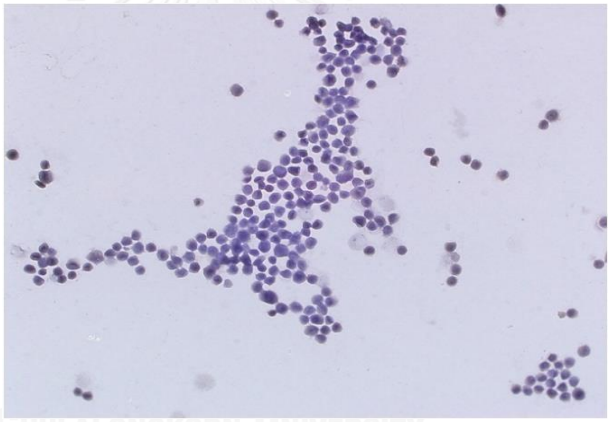
รูปภาพ 33: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 2 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody (A) และ dengue type 3 virus monoclonal antibody (B)



รูปภาพ 34: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 6 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody (A) และ หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ นาน 6 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 3 virus monoclonal antibody (B)



รูปภาพ 35: เซลล์ LLC-MK2 หลังจากถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีแบบ 2 ซีโรไทป์ นาน 5 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue type 2 virus monoclonal antibody (A) และ dengue type 3 virus monoclonal antibody (B)

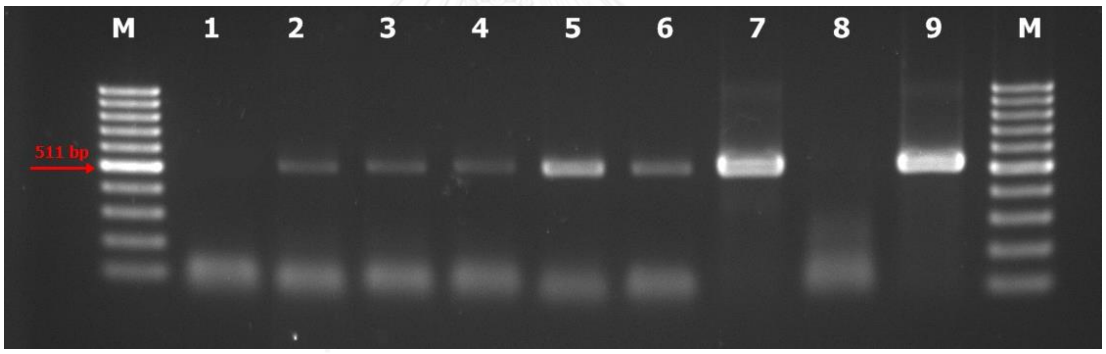


Chulalongkorn University

รูปภาพ 36: เซลล์ LLC-MK2 ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 วัน นำมาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วย dengue complex monoclonal antibody

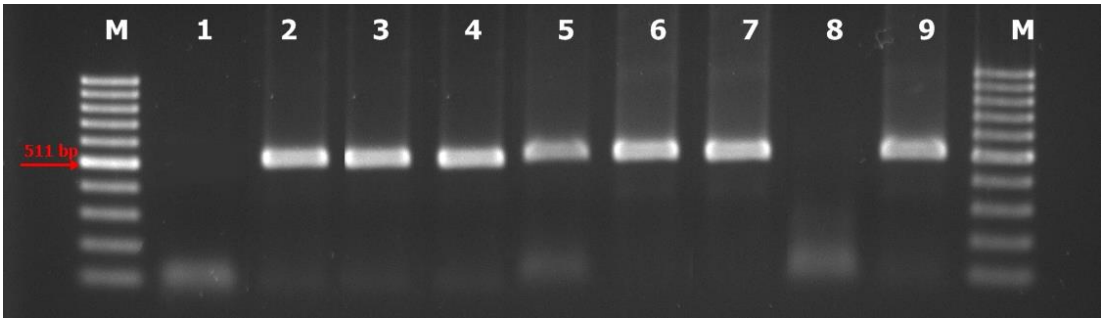
การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีโดยวิธี one-step reverse transcription PCR (RT-PCR)

การทำ one step RT-PCR ในงานวิจัยนี้เพื่อเป็นการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant จาก cell culture) โดยเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจาก infect เซลล์ไปแล้ว 1 – 6 วันจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ และจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการ infect ไวรัสเดงกี แล้วนำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) และใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์จับจำเพาะสำหรับไวรัสเดงกีในการตรวจสอบ พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์หลังจาก infected ไปแล้ว 1 – 6 วัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ผ่าน agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 511 bp ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับ positive control ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ดังแสดงใน รูปที่ 37, 38 และ 39

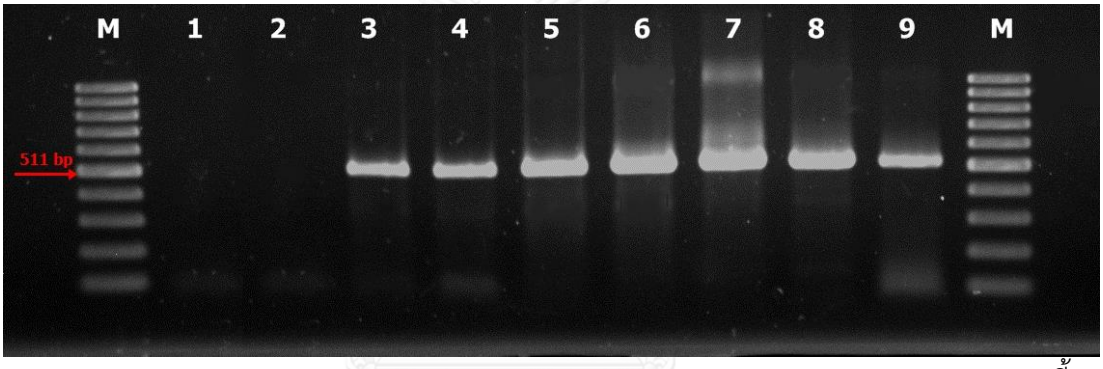


Chulalongkorn University

รูปภาพ 37: M = 100-bp ladder marker, lane 1 = negative control, lane 2 3 4 5 6 และ 7 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นาน 1 2 3 4 5 และ 6 วัน, lane 8 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ไม่ถูก infected, lane 9 = positive control

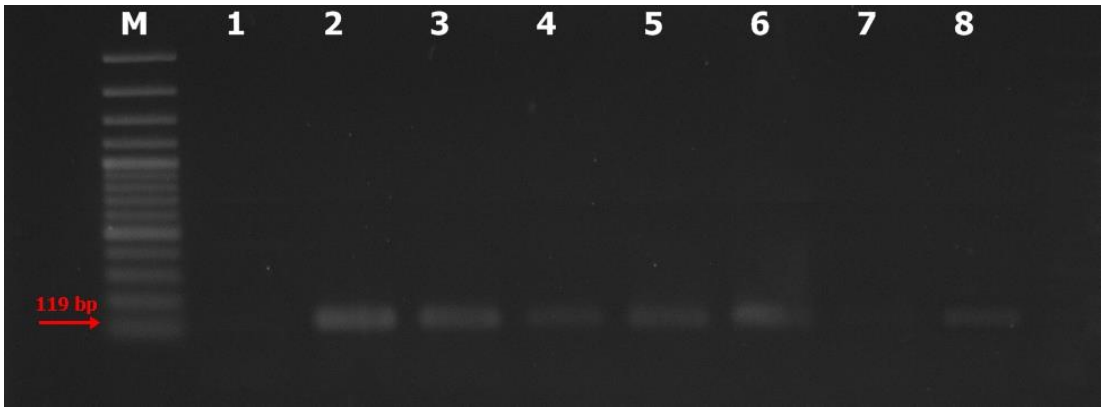


รูปภาพ 38: M = 100-bp ladder marker, lane 1 = negative control, lane 2 3 4 5 6 และ 7 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 นาน 1 2 3 4 5 และ 6 วัน, lane 8 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ไม่ถูก infected, lane 9 = positive control



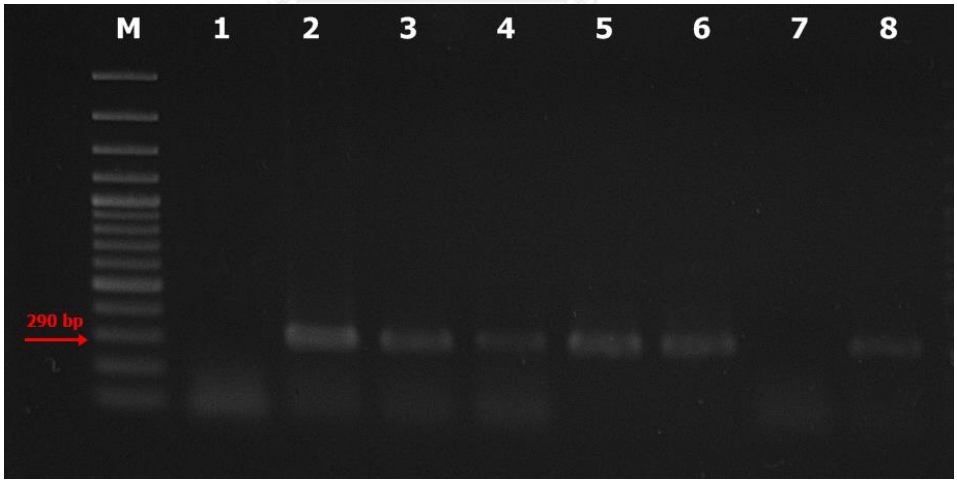
รูปภาพ 39: M = 100-bp ladder marker, lane 1 = negative control, lane 2 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ไม่ถูก infected, lane 3 4 5 6 7 และ 8 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 นาน 1 2 3 4 5 และ 6 วัน, lane 9 = positive control

นำ PCR product จากการทำ one step RT-PCR ของอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ นำมาใช้เป็น template ในการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับจำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 เมื่อนำไปวิเคราะห์ผ่าน agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 119 bp ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับ positive control ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ดังแสดงในรูปที่ 40



รูปภาพ 40: M = 100-bp ladder marker, lane 1 = negative control, lane 2 3 4 5 และ 6 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 นาน 1 2 3 4 และ 5 วัน , lane 7 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ไม่ถูก infected, lane 8 = positive control

นำ PCR product จากการทำ one step RT-PCR ของอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ นำมาใช้เป็น template ในการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับจำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 เมื่อนำไปวิเคราะห์ผ่าน agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 290 bp ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับ positive control ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ดังแสดงในรูปที่ 41



รูปที่ 41: M = 100-bp ladder marker, lane 1 = negative control, lane 2 3 4 5 และ 6 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 นาน 1 2 3 4 และ 5 วัน ,lane 7 = อาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์ที่ไม่ถูก infected, lane 8 = positive control

ผลการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีโดยวิธี Real time reverse transcription PCR (qRT-PCR)

การตรวจหาปริมาณของไวรัสเดงกีจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่มและกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ช่วงเวลา 1 – 6 หลังจากทำการ infected ไวรัสเดงกี ด้วยวิธี qRT-PCR โดยใช้ SYBR Green I เป็นตัวตรวจวัด โดยจะเปรียบเทียบปริมาณของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์กับ standard curve ที่สร้างจาก stock ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 3.5 x 10^6 PFU/ml ที่นำมาเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution (รูปที่ 32, 33 และ 34) และเปรียบเทียบปริมาณของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์กับ standard curve จาก stock ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 3.0 x 10^5 PFU/ml ที่นำมาเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution (รูปที่ 35, 36 และ 37) การตรวจหาปริมาณของไวรัสเดงกีทำโดยนำค่า Ct ที่ตรวจได้ว่าเปรียบเทียบกับ standard curve ที่สร้างจาก stock ไวรัสเดงกีที่สร้างขึ้น โดยแสดงปริมาณไวรัสเดงกีที่ตรวจได้ดังแสดงในตารางที่ 7

ตาราง 7: ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกีจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์

Post of infection (day)	Viral load (PFU/ml)			
	DENV2	DENV3	Co-infection	
			DENV2	DENV3
1	0.05	0.25	0.57	3.14
2	0.39	0.28	134.67	31.97
3	24.59	0.28	1,371.29	394.02
4	335.84	0.77	285,861.49	40,930.17
5	1,856.76	2.34	2,429,155.12	169,645.82
6	194,199.50	74,749.84	-	-

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การติดเชื้อไวรัสเดงกีพบมากแถบประเทศในเขตร้อน โดยทั่วไปการติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่ง ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันข้ามซีโรไทป์เพียงชั่วคราว และเมื่อมีการติดเชื้อครั้งที่สองด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรก ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจมีการแสดงออกของโรคที่รุนแรง นอกจากนี้ ยังมีรายงานจากหลายประเทศของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกัน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่มีในปัจจุบันยังคงไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ชักนำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้มากกว่าการติดเชื้อแบบหนึ่งซีโรไทป์หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิด cytopathic effect (CPE) ระหว่างการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งและสองซีโรไทป์ในเซลล์เพาะเลี้ยง LLC-MK2

ในการ infect ไวรัสเดงกี จะแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์มีสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 ที่ MOI = 1 และกลุ่มที่สอง ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ที่ MOI = 1 กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ใช้ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 โดยแต่ละซีโรไทป์มี MOI = 0.5 เมื่อสังเกตลักษณะเซลล์ที่ infect ด้วยไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์และสองซีโรไทป์ เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี นาน 1-2 วัน หลังทำการ infect ไวรัสเดงกี พบว่า ลักษณะรูปร่างของเซลล์ ไม่มีความแตกต่างกัน จะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อเข้าสู่วันที่ 3 หลังทำการ infected ไวรัสเดงกี โดยกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ เซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนมากกกว่าเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกี และเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 และวันที่ 5 เซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ จะสังเกตพบบางเซลล์มีลักษณะกลม ใหญ่ เซลล์เริ่มมีสีเข้มคล้ำ พบการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ (round and clumping) และสังเกตพบช่องว่างภายในเซลล์ และเมื่อเข้าสู่วันที่ 6 เซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์มีการหลุดร่อนออกจากพื้นผิว การที่เซลล์เกิดปรากฏการณ์ตามผลการวิจัยดังกล่าวนี้เนื่องมาจาก เซลล์ได้เสียคุณสมบัติบางประการที่เคยมีอยู่เนื่องจากการสอดแทรกสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าไปในเซลล์ [1, 34] จากงานวิจัยนี้พบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนหนานแน่น และมีการเสียคุณสมบัติการยึดเกาะพื้นผิวไป นอกจากนี้แอนติเจนของไวรัสที่อยู่บนผิวเซลล์ยังอาจทำให้เซลล์มาเกาะกลุ่มรวมตัวกัน [34] การเปลี่ยนแปลงของเซลล์อีกประการหนึ่งที่พบคือ การพบช่องว่าง (vacuole) และ inclusion body ภายในเซลล์ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า inclusion body อาจเป็นส่วนประกอบของไวรัสเพื่อประกอบเป็นอนุภาคที่

สมบูรณ์ เคยมีการศึกษาพบว่าเมื่อนำเซลล์มีการติดเชื้อไวรัสไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนมักพบว่า inclusion body จะประกอบไปด้วยผลึกของอนุภาคไวรัสหรือเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ปะปนอยู่กับองค์ประกอบของเซลล์ [15]

เมื่อนำเซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์มาตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเดงกีด้วยวิธี immunocytochemistry ซึ่ง เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ โดยใช้ monoclonal antibody จับจำเพาะ ต่อแอนติเจนที่เราสนใจ โดยใช้ DAB เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะเป็นตัวส่งสัญญาณและจะแสดงออกมาเป็นสีน้ำตาลในเซลล์ โดยเซลล์ที่ให้ผลบวกนั้นจะพบลักษณะการติดสีน้ำตาลของเซลล์ ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า เซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ สามารถย้อมเห็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีได้ในเวลาเพียง 24 ชั่วโมงหลังจากการ infected ด้วยไวรัสเดงกี ลักษณะรูปแบบของเซลล์ที่ให้ผลบวก จะเห็นเป็นแกรนูลสีน้ำตาลเข้มภายในเซลล์ ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม สามารถย้อมเห็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสเดงกีได้หลังจาก infected ไวรัสเดงกีไปแล้ว 2 วัน ลักษณะรูปแบบของเซลล์ที่ให้ผลบวกจะเห็นเป็นแกรนูลสีน้ำตาลเข้มภายในเซลล์เช่นเดียวกัน และเมื่อเวลาผ่านไปนั้นเซลล์กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ สามารถตรวจพบการติดสีน้ำตาลของเซลล์ได้ปริมาณมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัสเดงกียังคงติดเพียงสีม่วงของ hematoxylin เท่านั้น จากผลการย้อมเซลล์แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ตั้งแต่วันแรกหลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี แต่ไวรัสที่เพิ่มจำนวนนั้นยังไม่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างไปจากเดิมภายในหนึ่งถึงสองวันแรก

การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีด้วยวิธี one step RT-PCR เพื่อเป็นการตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยจะทำเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจาก infect เซลล์ไปแล้ว 1 – 6 วันจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ และจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการ infect ไวรัสเดงกี แล้วนำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) และใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์จับจำเพาะสำหรับไวรัสเดงกีในการตรวจสอบ พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่ม กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์หลังจาก infected ไปแล้ว 1 – 6 วัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ผ่าน agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 511 bp ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี หลังจากนั้นนำ PCR product จากการทำ one step RT-PCR ของอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ที่ถูก infected ด้วยไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ นำมาใช้เป็น template ในการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับจำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 เมื่อนำไปวิเคราะห์ผ่าน agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มีขนาด 119 bp และ PCR product ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มีขนาด 290 bp ในขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมนั้นไม่พบสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ซึ่งการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR นอกจากจะใช้ยืนยันผลการย้อมเซลล์ด้วยวิธี immunocytochemistry แล้ว ยังพบว่า เทคนิค RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเพราะสามารถตรวจพบสาร

พันธุกรรมของไวรัสเดงกีจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการ infect ซึ่งการตรวจด้วยวิธี immunocytochemistry ยังไม่สามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสเดงกีได้และยังเป็นการยืนยันว่าไวรัสเดงกีทั้งสองซีโรไทป์มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์

การตรวจหาปริมาณของไวรัสเดงกีจากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ทั้งสองกลุ่มและกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ ช่วงเวลา 1 – 6 หลังจากทำการ infected ไวรัสเดงกี ด้วยวิธี qRT-PCR โดยใช้ SYBR Green I เป็นตัวตรวจวัด พบว่า หลังจากการพบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ คือวันที่ 3 หลังจากเซลล์ติดเชื้อไวรัสแล้วนั้น พบปริมาณไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มากกว่าซีโรไทป์ 3 ทั้งในกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบ 1 และ 2 ซีโรไทป์ในช่วงเวลาเดียวกัน ในกลุ่มที่มีการิดเชื้อไวรัสเดงกีแบบ 2 ซีโรไทป์พร้อมกันนั้น ในวันที่ 5 ที่เซลล์เริ่มมีการหลุดจากพื้นผิว พบปริมาณไวรัสเดงกีทั้งสองซีโรไทป์เพิ่มจำนวนสูงขึ้นมาก ผลการวิจัยนี้อาจบอกได้ว่า ไวรัสเดงกีทั้งสองซีโรไทป์ส่งเสริมกันให้มีการเพิ่มจำนวนมากกว่าการติดเชื้อแบบซีโรไทป์เดียว มีงานวิจัยก่อนหน้ากล่าวเอาไว้ว่า ในการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันนั้น การเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งที่มากกว่าอีกซีโรไทป์ อาจเกี่ยวข้องกับ specific receptor บนผิวเซลล์ตัวรับ แต่ในปัจจุบันก็ยังไม่มีกลไลใดที่สามารถอธิบายถึงการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกีสองซีโรไทป์ที่ต่างกันพร้อมกันในเซลล์เดียวได้ [1, 5, 10, 26, 34]

จากผลการวิจัยทั้งหมดนี้จึงเป็นไปตามสมมติฐานว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกัน ชักนำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพที่รวดเร็วกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ และปริมาณไวรัสเดงกีของการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์มีมากกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ แต่ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของอาการทางคลินิกหรือไม่นั้น เป็นสิ่งที่ต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข้อจำกัดของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดคือ ยังไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าในการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์พร้อมกันนั้น พบไวรัสเดงกีทั้งสองซีโรไทป์ในเซลล์เซลล์เดียวหรือไม่ ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องทำการพิสูจน์ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

1. กนกทิพย์, ทิพย์รัตน์., ไข้เลือดออกเด็งกี่. 2549, กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน.
2. Simmons, C.P., et al., *Dengue.* N Engl J Med, 2012. **366**(15): p. 1423-32.
3. Guzman, M.G. and S. Vazquez, *The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection.* Viruses, 2010. **2**(12): p. 2649-62.
4. Vaughn, D.W., et al., *Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity.* J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 2-9.
5. Clyde, K., J.L. Kyle, and E. Harris, *Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.* J Virol, 2006. **80**(23): p. 11418-31.
6. Organization, W.H., *DENGUE:Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. 2009, Geneva, Switzerland.
7. ปภานิจ, สวงโท. รายงานสถานการณ์กลุ่มโรคไข้เลือดออก (ไข้เลือดออก ไข้เลือดออกช็อก และ ไข้เดงกี) ประเทศไทย พ.ศ. *2557 (*จากรายงาน *506* ประจำสัปดาห์ที่ *51* ข้อมูล ณ วันที่ *30* ธันวาคม *2557).* 2014 [cited 2557 28 พ.ค.]; http://www.boe.moph.go.th/files/report/20150106_732528.pdf].
8. De Paula, S.O. and B.A. Fonseca, *Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis.* Braz J Infect Dis, 2004. **8**(6): p. 390-8.
9. Jessie, K., et al., *Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization.* J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1411-8.
10. C., Q.-G.D., et al., *Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and Aedes aegypti mosquitoes.* J Infect Dev Ctries, 2014. **8**(7): p. 876-84.
11. (RIME), R.s.I.o.M.E. *Dengue Fever*. Available from: http://www.medicinemcq.com/index.php/journals/sub_details/86/19/DENGUE-FEVER.

Chulalongkorn University

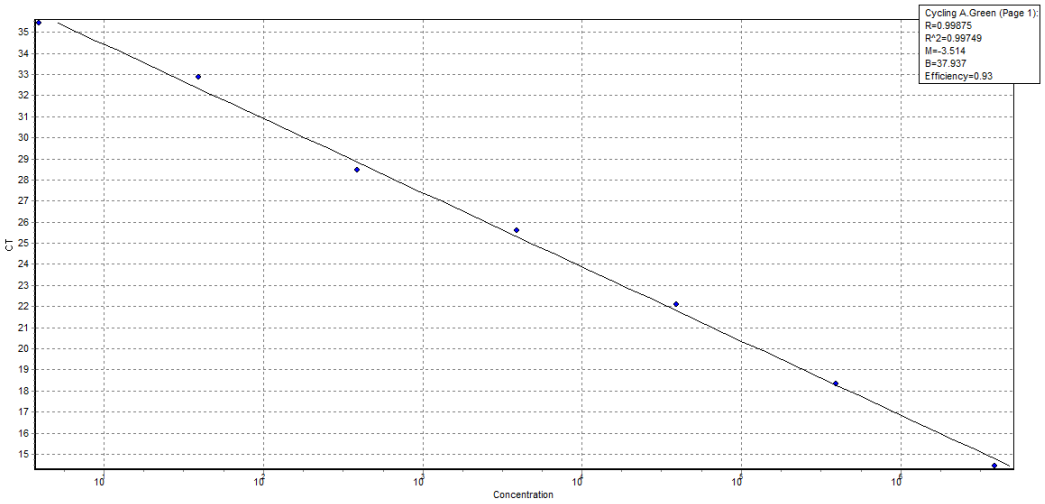
12. Guzman, M.G., et al., *Dengue: a continuing global threat.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(12 Suppl): p. S7-16.
13. Whitehead, S.S., et al., *Prospects for a dengue virus vaccine.* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(7): p. 518-28.
14. Kumarasamy, V., et al., *Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection.* Singapore Med J, 2007. **48**(7): p. 669-73.
15. Esam Azhar, et al., *Virological diagnosis of dengue fever in Jeddah, Saudi Arabia: Comparison between RT-PCR and virus isolation in cell culture.* Journal of Infectious Diseases and Immunity, 2010. **2**(2): p. 24- 29.
16. Halstead, S.B. and N.J. Marchette, *Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii.* Am J Trop Med Hyg, 2003. **69**(6 Suppl): p. 5-11.
17. Tesh, R.B., *A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures.* Am J Trop Med Hyg, 1979. **28**(6): p. 1053-9.
18. Yamada, K., et al., *Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection.* J Clin Virol, 2002. **24**(3): p. 203-9.
19. Harris, E., et al., *Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR.* J Clin Microbiol, 1998. **36**(9): p. 2634-9.
20. Lanciotti, R.S., et al., *Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol, 1992. **30**(3): p. 545-51.
21. อิมมูโนพยาธิวิทยา (*Immunohistochemistry)*. 2010; Available from: http://www.medicaresupply.net/index.php?lay=show&ac=article&Id=539159729.
22. Marc K., K.A., Kirsten B., Kenneth J. B., Thomas B., Nanna K. C., Farmilo A. J., Richard H., Jim H., Mehrdad N., Roy W. O., Gale E. P., Ole F. R., Andreas S., Helle G. W., Lars W. and Ron Z, *Immunohistochemical staining methods Fifth editions*. 2009, California: DakoCytomation.

23. Johnson, B.W., B.J. Russell, and R.S. Lanciotti, *Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 4977-83.
24. Chien, L.J., et al., *Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(4): p. 1295-304.
25. Dos Santos, H.W., et al., *A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection.* J Med Virol, 2008. **80**(8): p. 1426-33.
26. Catanzaro, P.J., et al., *Detection of dengue cell-surface antigens by peroxidase-labeled antibodies and immune cytolysis.* Infect Immun, 1974. **10**(2): p. 381-8.
27. Theofilopoulos, A.N., et al., *Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes.* J Immunol, 1976. **117**(3): p. 953-61.
28. Miller, S., S. Sparacio, and R. Bartenschlager, *Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B.* J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8854-63.
29. Potiwat, R., et al., *Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in Aedes albopictus c6/36 cell line.* Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2011. **42**(6): p. 1388-94.
30. Gubler, D.J., et al., *A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses.* Am J Trop Med Hyg, 1985. **34**(1): p. 170-3.
31. Wenming, P., et al., *Simultaneous infection with dengue 2 and 3 viruses in a Chinese patient return from Sri Lanka.* J Clin Virol, 2005. **32**(3): p. 194-8.
32. Thavara, U., et al., *Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand.* Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2006. **37**(3): p. 468-76.
33. Bharaj, P., et al., *Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India.* Virol J, 2008. **5**: p. 1.

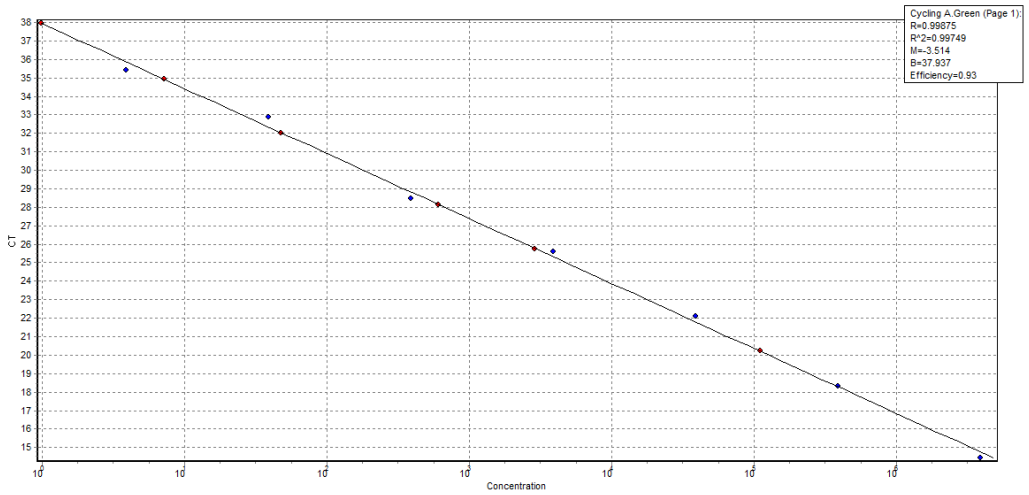
34. Roizman, B., *Multiplication*, in *Medical Microbiology*, S. Baron, Editor. 1996: Galveston (TX).

ภาคผนวก

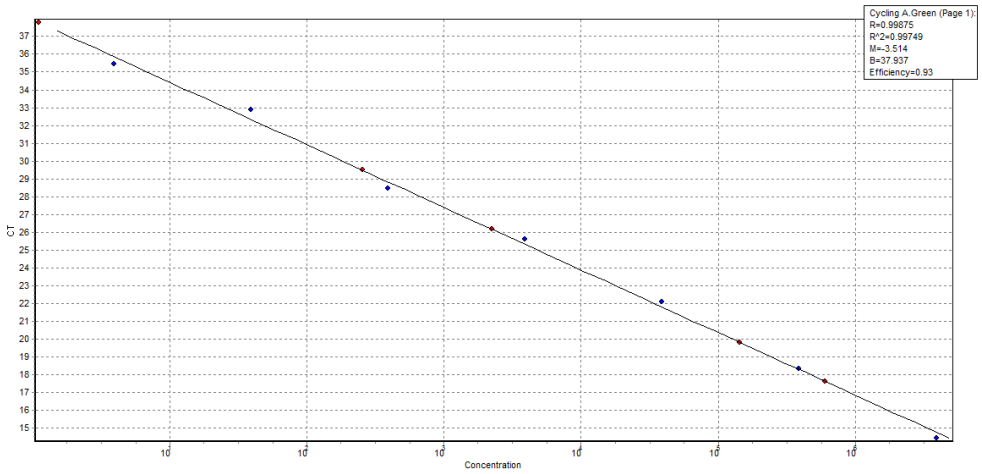
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



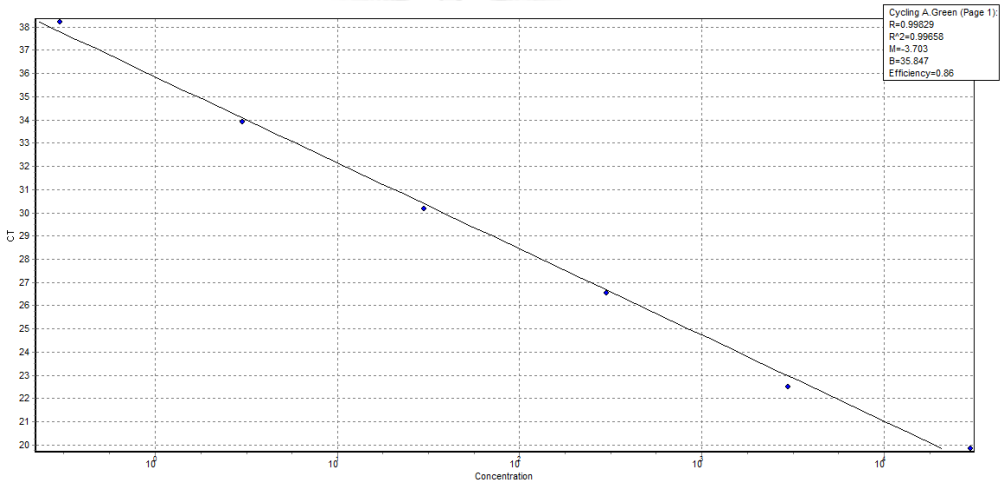
รูปที่ 1: Standard curve ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2



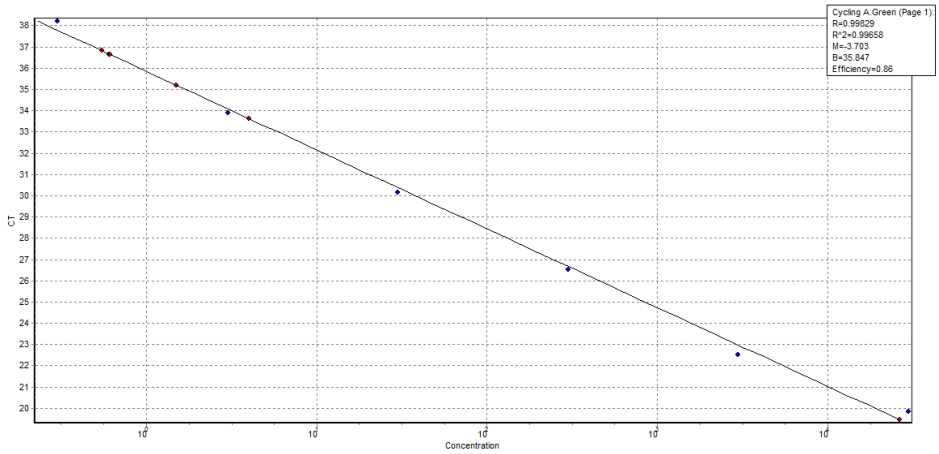
รูปที่ 2: ปริมาณของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ เปรียบเทียบกับ standard curve ที่สร้างจาก stock ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2



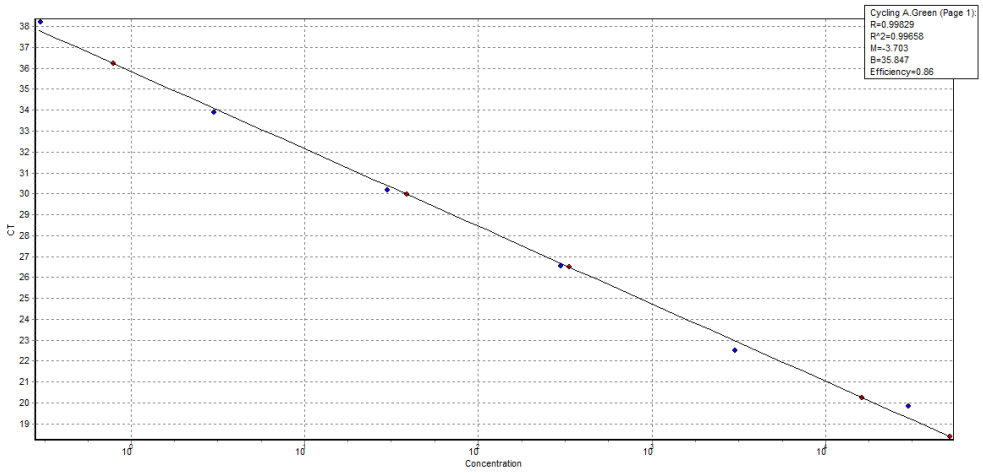
รูปที่ 3: ปริมาณของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ เปรียบเทียบกับ standard curve ที่สร้างจาก stock ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2



รูปที่ 4: Standard curve ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3



รูปที่ 5: ปริมาณของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบหนึ่งซีโรไทป์ เปรียบเทียบกับ standard curve ที่สร้างจากstock ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3



รูปที่ 6: ปริมาณของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 จากกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบสองซีโรไทป์ เปรียบเทียบกับ standard curve ที่สร้างจากstock ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM สำหรับเซลล์ LLC-MK2

- ละลาย $NaHCO_3$ 2..2 กรัม ในน้ำกลั้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- ละลายอาหารเลี้ยงเซลล์แบบผง 1 ซอง (สำหรับ 1 ลิตร) ในสารละลาย $NaHCO_3$ 2..2 กรัม/ลิตร แล้วเขย่าให้ลายลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้มาปรับให้ค่า pH = 7.4 จากนั้นนำมากรองผ่าน 0.2 μm membrane filter
- เก็บใส่ขวดและพันพาราฟินไว้สำหรับเป็น stock media

2. การเตรียม Phosphate-buffered saline (10X PBS)

ละลาย	NaCl	80	กรัม
	KCl	2	กรัม
	Na_2HPO_4	14.4	กรัม
	KH_2PO_4	2.4	กรัม

ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การเตรียม Phosphate-buffered saline (1X PBS)

PBS 10X	100	มิลลิลิตร
ddH_2O	900	มิลลิลิตร

4. การเตรียม Tris-Borate EDTA (10X TBE)

ละลาย	Tris base	54	กรัม
	Boric acid	55	กรัม
	0.5 M EDTA (ph 8.0)	40	มิลลิลิตร

ในน้ำกลั่น 1000 ลิตร แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ

5. การเตรียม Tris-Borate EDTA (1X TBE)

TBE 10X	100	มิลลิลิตร
ddH_2O	900	มิลลิลิตร

6. การเตรียม agarose gel ความเข้มข้น 2%

ละลาย	Agarose	2	กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ใน 1X TBE 100 มิลลิลิตร

รอจน agarose เย็นลง แล้วเท agarose ลงบนถาดเจล จากนั้นปล่อยให้แข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วจึงดึงหวีออกจากเจลตรงๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชลนิภา บุญสนอง เกิดเมื่อวันอาทิตย์ที่ 4 มีนาคม พ.ศ.2533 ณ โรงพยาบาลศิริราช จังหวัดกรุงเทพมหานคร

จบการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จากวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2554 ปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่ในระดับบัณฑิตศึกษา แขนงวิชาอณูชีววิทยาทางการแพทย์และพันธุศาสตร์ของมนุษย์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน ประจำปีการศึกษา 2556 และ 2557 จาก บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี พ.ศ. 2557 เป็นกลุ่มผู้วิจัย ในการนำเสนอโปสเตอร์ (หัวข้อ “การติดเชื้อร่วมระหว่างไวรัสเดงกีซีโรไทป์สองและสามในเซลล์เพาะเลี้ยง ” ณ การ การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ครั้งที่ 4: ในวันที่ 6 – 8 พฤษภาคม 2557

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University