

ระบาดวิทยาทางอณูโมเลกุลของเชื้อไวรัสเด็งกีแยกจากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกี ในประเทศไทย ปีค.ศ. 2015 *

Molecular Epidemiology of Dengue Virus Isolated from Sera of Patients with Suspected Dengue Fever in Thailand, 2015

ชุมชล ไชยโย (Kumchol Chaiyo)**

จันทร์ดี ระเบบเบสิศ (Jundee Rabablert)***

บทคัดย่อ

โรคไข้เด็งกี (dengue fever; DF) และโรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever; DHF) มีผลกระทบต่อประเทศไทยเป็นเวลานานมากกว่า 50 ปี และยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในประเทศไทย มีหลายรายงานระบุว่า มีผู้ป่วยโรคไข้เด็งกีและผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในกรุงเทพมหานคร ประเทศไทยทุกปี ในการศึกษารุ่นนี้ ผู้วิจัยศึกษาการระบาดของเชื้อไวรัสเด็งกี (dengue virus, DENV) จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีในกรุงเทพมหานครในปีค.ศ. 2015 โดยใช้วิธีทางอณูโมเลกุล ซึ่งได้แก่ วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), DNA sequencing และ Phylogenetic tree ผลการทดลองระบุว่า วิธี RT-PCR ตรวจพบเชื้อไวรัสเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยจำนวน 19 ใน 26 ราย (73%) โดยมีเชื้อ DENV-3 (7 ราย) > DENV-4 (6 ราย) > DENV-1 (3 ราย) และ DENV-2 (3 ราย) ตามลำดับ วิธี DNA sequencing และ Phylogenetic tree โดยการใช้ส่วนยีน E ของเชื้อไวรัสเด็งกี ตรวจพบ DENV-1 genotype I (จีโนทัยป์ดั้งเดิม) และ DENV-2 Asian I genotype (จีโนทัยป์ดั้งเดิม), DENV-3 genotype III (จีโนทัยป์อุบัติใหม่), DENV-4 genotype I (จีโนทัยป์ดั้งเดิม) และ genotype II (จีโนทัยป์อุบัติใหม่) แสดงว่าความหลากหลายของจีโนทัยป์และจีโนทัยป์อาจเป็นสาเหตุการระบาดของโรคไข้เด็งกีในกรุงเทพมหานครในปีค.ศ. 2015 ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกีในกรุงเทพมหานครอาจจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาและสายวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสเด็งกีต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสเด็งกี; โรคไข้เด็งกี; การหาลำดับนิวคลีโอไทด์; phylogeny

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ เรื่อง ระบาดวิทยาทางอณูโมเลกุลของเชื้อไวรัสเด็งกีและการสร้างโคลนติดเชื้อเด็งกีซีโรทัยป์ 4 สายพันธุ์ PDK40

** นักศึกษาหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
(Student of Doctor of Philosophy, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University.
e-mail: kumchol@hotmail.com)

*** อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
(Advisors : Assistant Professor Doctor, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University.
e-mail: jundee04@gmail.com)

Abstract

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) has affected Thailand for the last five decades and become a major health problem in many cities in the country. Several reports revealed that there were patients with DF and patients with DHF in Bangkok, Thailand annually. In this study, we investigated epidemiology of dengue virus (DENV) from patient sera suspected with DF in Bangkok, 2015 using molecular technique such as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), DNA sequencing and phylogenetic tree. The results revealed that the DENV analyzed by RT-PCR was from 19 of 26 patient sera (73%); DENV-3 (n=7) > DENV-4 (n=6) > DENV-1 (n=3) and DENV-2 (n=3), respectively. In addition, DENV-1 genotype I (native) and DENV-2 Asian I genotype (native), DENV-3 genotype III (emerging), DENV-4 genotype I (native) and genotype II (emerging) were detected by analysis of DNA sequence and phylogenetic tree using E gene of DENV. This study suggests that diversity of serotypes and genotypes may be the cause of dengue fever in Bangkok, 2015. Genetic information of DENV in Bangkok may be useful for further application of epidemiologic and evolution study.

Key words: Dengue virus; Dengue fever; DNA sequencing; Phylogeny

บทนำ

เชื้อไวรัสเด็งกี (Dengue virus, DENV) ซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4, สกุล *Flavivirus*, วงศ์ *Flaviviridae* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไข้เด็งกี (Dengue fever, DF) และโรคไข้เลือดออก (Dengue haemorrhagic fever, DHF) หรือโรคไข้เลือดออกที่มีอาการช็อกเกรว (Dengue shock syndrome, DSS) (Paudel, et al., 2011; Najioullah et al., 2014) เชื้อไวรัสเด็งกีมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวบวก (positive single strand RNA) ถอดรหัสสร้างโปรตีนโครงสร้าง (Structural protein) และโปรตีนไม่ใช่ โครงสร้าง (Nonstructural protein) โปรตีนโครงสร้างประกอบด้วย Capsid (C), Precursor to membrane (prM), และ Envelop (E) โปรตีนไม่ใช่ โครงสร้างประกอบด้วย NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5 (Guzman et al., 2010; Medina et al., 2012) เชื้อไวรัสเด็งกีติดต่อสู่คนผ่านทางยุงลายบ้าน *Aedes aegypti*, ยุงลายสวน *Aedes albopictus* ในบริเวณเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้นทั่วโลก (Rezza, 2012)

รายงานก่อนหน้านี้ระบุว่าประชากรจำนวน 390 ล้านคน เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกีทุกปี โดยประชากรจำนวน 96 ล้านคน ติดเชื้อไวรัสเด็งกีโดยไม่แสดงอาการ (asymptomatic) (Bhatt et al., 2013) ส่วนผู้ป่วยโรคไข้เด็งกีแสดงอาการทางคลินิก (clinical symptom) คือ มีไข้ (fever) ปวดศีรษะ (headache) ปวดกระดูกหรือข้อต่อ (bone or joint pain) และ/หรือมีผื่นแดงตามลำตัว (skin rash) คล้ายโรคหัด (Kyle & Harris, 2008) ในขณะที่ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกแสดงอาการทางคลินิกคือมีไข้มีอาการเลือดออก (bleeding) ซึ่งเกิดจากพลาสมารั่ว (plasma leakage) เกร็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกบางรายมีอาการช็อกเกรวและอาจเสียชีวิตในเวลาต่อมา (Halstead, 2007) สำหรับประเทศไทย มีรายงานผู้ป่วยโรค

ไข้เลือดออกรายแรกซึ่งเดิมเรียกว่าไข้หวัดใหญ่เลือดออก (flu hemorrhage) ในปี พ.ศ. 2492 ต่อมาเกิดการระบาดใหญ่ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 ในเขตกรุงเทพมหานครพบผู้ป่วยจำนวน 2,518 ราย คิดเป็นอัตราป่วยเท่ากับ 8.8 ต่อประชากร 100,000 คน มีอัตราป่วยร้อยละ 13.90 (ศิริเพ็ญและสุจิตรา, 2551) รายงานของนายแพทย์วงวัฒน์ ลีวลักษณ์ (วงวัฒน์, 2556) ระบุจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในกรุงเทพมหานครปี พ.ศ. 2556 มีผู้ป่วยไข้เลือดออกจำนวน 14,929 ราย โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุระหว่าง 10-14 ปี (2,383 ราย, 15.96%) ปัจจัยที่มีความสำคัญของการแพร่กระจายโรคคือ ภูมิทัศน์ทางของประชากร ความหนาแน่นของประชากร การเคลื่อนย้าย ชนิดของเชื้อไวรัสเด็งกี และชนิดของยุงพาหะ (ศิริเพ็ญและคณะ 2556)

โรคไข้เด็งกีและโรคไข้เลือดออก เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย จากการศึกษาเวชระเบียนย้อนหลังที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล พบผู้ป่วยเด็กที่มีอาการเข้าได้กับโรคไข้เลือดออกประปรายตั้งแต่ปีค.ศ. 1949 เป็นต้นมา ต่อมามีการระบาดในปี ค.ศ. 1958 โดยพบผู้ป่วยเฉพาะในกรุงเทพมหานคร ประมาณ 2,518 ราย คิดเป็นอัตราป่วยเท่ากับ 8.8 ต่อประชากรแสนคน มีอัตราตายร้อยละ 13.90 และมีการแพร่กระจายเกือบทั่วประเทศมีผู้ป่วย 23,786 ราย (ศิริเพ็ญและคณะ 2556) และมีรายงานการระบาดของโรคไข้เลือดออก ปีค.ศ. 2013 ระบุอัตราป่วย 0.241 % และอัตราตาย 0.09 % (สำนักโรคติดต่อทางแมลง. 2556) และในปีค.ศ. 2015 มียอดผู้ป่วยสะสม ณ วันที่ 1 ธันวาคม ค.ศ. 2015 จำนวน 123,169 ราย และจำนวนผู้ป่วยตาย 116 (สำนักโรคติดต่อทางแมลง. 2558)

การศึกษาทางระบาดวิทยา (Epidemiology) และทางสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogeny) เป็นข้อมูลสำคัญเกี่ยวกับการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ (geographical distribution) ของ genotype DENV ในบริเวณที่แตกต่างกัน รายงานของ Rico-Hesse (1990) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของเชื้อ DENV-1 และ DENV-2 โดยการใช้จีโนมจาก E/NS1 gene junction และ complete E gene พบว่าแต่ละซีโรทัยป์มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence divergence) น้อยกว่า 6 % รายงานของ Twiddy et al. (2002) ซึ่งใช้วิธี DNA sequencing โดยการใช้ primer จากส่วน E gene ประกอบกับ Phylogenetic analysis เพื่อทำการตรวจเชื้อ DENV-2 จากซีรัมผู้ป่วยชาวเวียดนามระยะไข้เฉียบพลัน จำนวน 147 ราย พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ DENV-2 จัดอยู่ในสายพันธุ์จากลิงในป่า (sylvatic cluster) แสดงว่ามีการแทนที่ของ DENV-2 จาก sylvatic cluster แทนที่สายพันธุ์ที่ระบาดทั่วโลก (Cosmopolitan genotype cluster) การศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อ DENV ซึ่งแยกจากซีรัมผู้ป่วยหรือยุงมีความก้าวหน้าเพิ่มมากขึ้นทำให้เข้าใจความชุกชุมของ genotype (genotype abundance) การแทนที่ของสายพันธุ์ใหม่ อาจนำไปสู่การระบาดและการก่อโรคที่รุนแรงเพิ่มขึ้น (Weaver & Vasilakis, 2009)

ในการศึกษาค้นคว้านี้ ผู้วิจัยจึงใช้วิธี RT-PCR เพื่อตรวจและจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัส และใช้วิธี DNA sequencing ร่วมกับวิธี Phylogenetic tree ในการจำแนกจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1, 2, 3 และ 4

วิธีการวิจัย

1. เชื้อไวรัส

DENV-1 สายพันธุ์ 16007, DENV-2 สายพันธุ์ 16681, DENV-3 สายพันธุ์ 16562 และ DENV-4 สายพันธุ์ 1036 strain ปริมาณความรุนแรง (Viral titers) ประมาณ 1×10^5 plaques forming units/ml ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สุธี ยกส้าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ซึ้ร้มผู้ป่วย

ซึ้ร้มผู้ป่วยที่มีอาการแสดงทางคลินิกของโรคไข้เด็งกีหรือโรคไข้เลือดออกจากโรงพยาบาลรามาริบัติ และโรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร จำนวน 26 ราย ในปีค.ศ.2015 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สุธี ยกส้าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยซึ้ร้มทั้งหมดเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

3. การตรวจด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

สกัด RNA จากซึ้ร้มผู้ป่วย โดยการใช้ชุดสกัด Viral RNA Mini Kit (Omega bio-tek, GA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต สังเคราะห์ cDNA โดยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, California, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เพิ่มปริมาณยีนส่วน Envelope (E) ของ DENV ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป KAPA Taq ReadyMix PCR (KAPA biosystems, Massachusetts, USA). ตามคำแนะนำของผู้ผลิต กล่าวโดยย่อ เติม cDNA template ปริมาตร 4 μl ลงในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 100 μl ซึ่งประกอบด้วย KAPA Taq ReadyMix, 0.5 μM ของ DENV แต่ละไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) และ Nuclease-free Water ตามลำดับ โดยการใช้เครื่อง T Persernal Thermocycler (Biometra) ภายใต้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยจำนวน 35 รอบของ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที, 60°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจขนาด PCR products โดยการใช้ 1.5% Agarose gel electrophoresis อ่านผลภายใต้แสง UV

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยวิธี Phylogenetic tree

ส่ง PCR product ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR Product ไปยังบริษัท 1stBASE Laboratories เมือง Seri Kembangan ประเทศมาเลเซีย เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน E ของ DENV แต่ละตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) และเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.5 วิเคราะห์หาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationship) ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตรวจกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากเชื้อ DENV สายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เกณฑ์การจำแนกตามรายงานของ Klungthong et al. (2008) สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) โดยการใช้โมเดล Neighbor joining (NJ) วิเคราะห์จำนวน 1,000 ซ้ำ

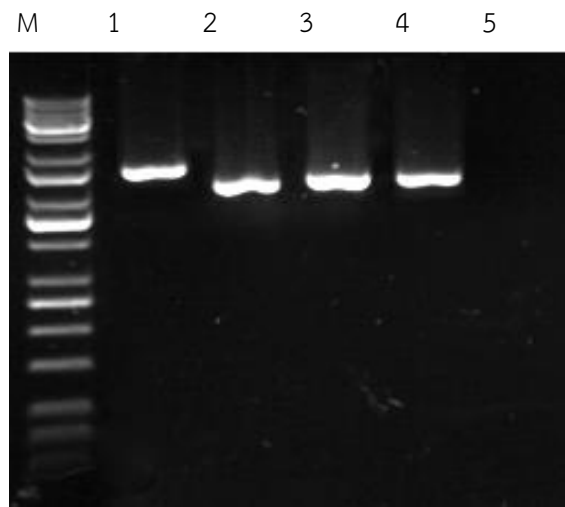
ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ของ DENV สำหรับวิธี RT-PCR

DENV serotype	Primer name	Primer sequence	Position
DENV-1	DG1 (E1)-F	5' AGT-AGA-GAC-TTG-GGC-TCT-GA 3'	802
	DG1 (E2)-R	5' CCA-GTT-GAT-TAC-ACA-TCC-CG 3'	2443
DENV-2	DG2 (E1)-F	5' CAG-CTG-TCG-CTC-CTT-CA 3'	914
	DG2 (E2)-R	5' GCT-CTA-GAT-CGG-CCT-GCA-CCA-T 3'	2423
DENV-3	DG3 (E1)-F	5' GCC-CAT-TAC-ATA-GGC-ACT-TCC 3'	857
	DG3 (E2)-R	5' ACA-CAY-CCC-ATG-TCA-GCT-TG 3'	2427
DENV-4	DG4 (E1)-F	5' CTC-TTG-GCA-GGA-TTY-ATG-GC 3'	843
	DG4 (E2)-R	5' CAC-TCC-ATG-ACA-CCA-CAC-AAC-C 3'	2460

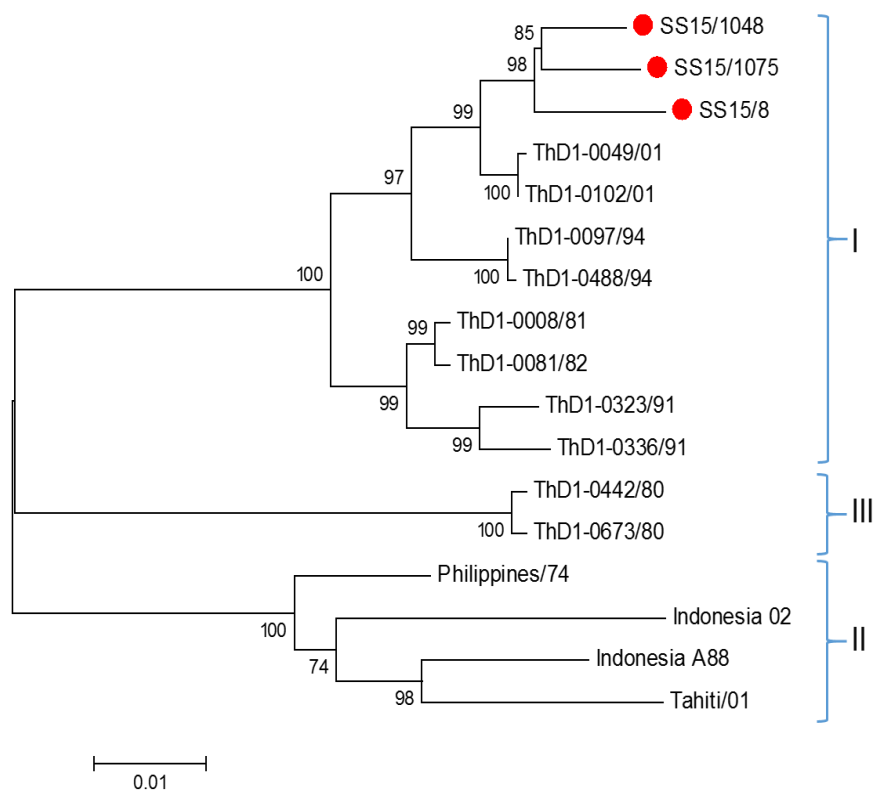
ผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยตรวจและจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการแสดงทางคลินิกของโรคไข้เด็งกีหรือโรคไข้เลือดออกจำนวน 26 ราย โดยวิธี RT-PCR ซึ่งผลการศึกษา พบ DENV จำนวน 19 ใน 26 ราย คิดเป็นร้อยละ 73 จำแนกออกเป็น DENV-1 จำนวน 3 ราย, DENV-2 จำนวน 3 ราย, DENV-3 จำนวน 7 ราย และ DENV-4 จำนวน 6 ราย (**ตารางที่ 2**) โดย DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 1,642 bp, 1,510 bp, 1,571 bp และ 1,618 bp ตามลำดับ (**ภาพที่ 1**)

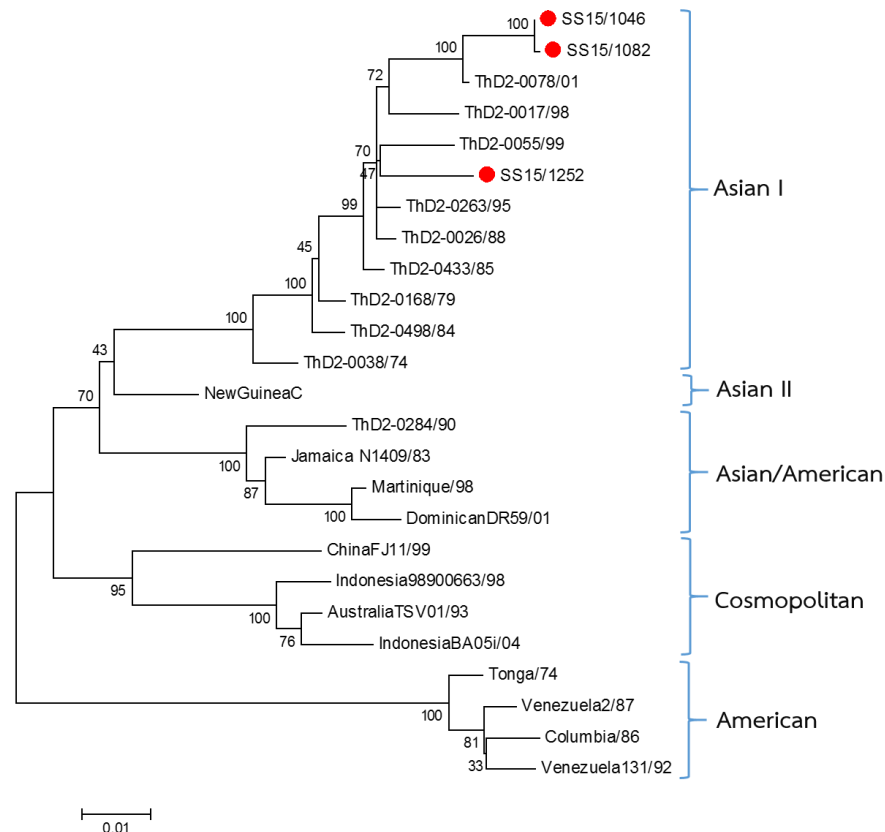
นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี DNA sequencing และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยวิธี phylogenetic tree ร่วมกับข้อมูลจาก GenBank เพื่อการจำแนกจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีซีโรทัยป์ 1, 2, 3, และ 4 ผลการศึกษา ระบุว่า DENV-1 จำนวน 3 ราย จัดอยู่ใน genotype I (**ภาพที่ 2**), DENV-2 จำนวน 3 ราย จัดอยู่ใน Asian I genotype (**ภาพที่ 3**), และ DENV-3 จำนวน 7 ราย จัดอยู่ใน genotype III (**ภาพที่ 4**) ในขณะที่ DENV-4 จำนวน 3 ราย (SS15/4, SS15/22 และ SS15/3) จัดอยู่ใน genotype I และอีก 3 ราย (SS15/1070, SS15/1045 และ SS15/1085) จัดอยู่ใน genotype II (**ภาพที่ 5**)



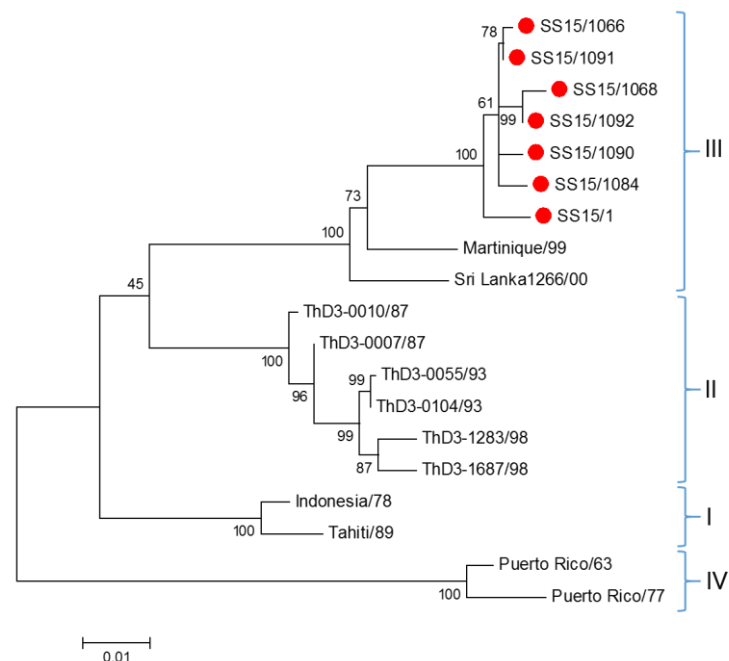
ภาพที่ 1 วิธี Agarose gel electrophoresis แสดงขนาดโมเลกุลของ ช่อง 1; DENV-1 (1,642 bp), ช่อง 2; DENV-2 (1,510 bp), ช่อง 3; DENV-3 (1,571 bp) และช่อง 4 DENV-3 (1,618 bp)



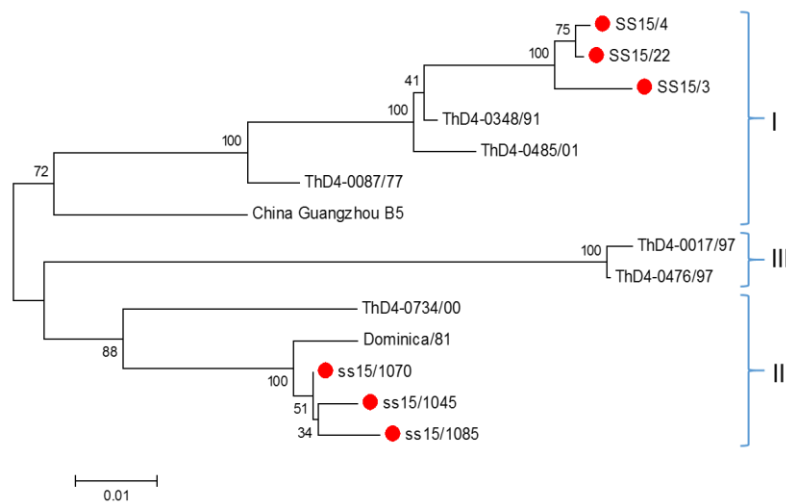
ภาพที่ 2 Neighbor-joining phylogenetic trees ของเชื้อ DENV-1 จากซีรัมผู้ป่วย (วงกลมสีแดง) โดยสร้างจากส่วนของยีน E เปรียบเทียบกับ DENV-1 ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 14 sequences



ภาพที่ 3 Neighbor-joining phylogenetic trees ของเชื้อ DENV-2 จากซีรัมผู้ป่วย (วงกลมสีแดง) โดยสร้างจากส่วนของยีน E เปรียบเทียบกับ DENV-2 ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 22 sequences



ภาพที่ 4 Neighbor-joining phylogenetic trees ของเชื้อ DENV-3 จากซีรัมผู้ป่วย (วงกลมสีแดง) โดยสร้างจากส่วนของยีน E เปรียบเทียบกับ DENV-3 ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 12 sequences



ภาพที่ 5 Neighbor-joining phylogenetic trees ของเชื้อ DENV-4 จากซีรัมผู้ป่วย (วงกลมสีแดง) โดยสร้างจากส่วนของยีน E เปรียบเทียบกับ DENV-4 ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 8 sequences

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยใช้วิธี RT-PCR เพื่อตรวจและจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยจำนวน 26 ราย และใช้วิธี DNA sequencing ร่วมกับวิธี Phylogenetic tree โดยการใช้ไพรเมอร์ E จำแนกจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยที่ให้ผลบวกด้วยวิธี RT-PCR

วิธี RT-PCR ตรวจพบ DENV จำนวน 19 ใน 26 ราย (73%) โดยมี DENV-3 > DENV-4 > DENV-1 = DENV-2 สอดคล้องกับรายงานของสำนักระบาดวิทยา (2558) ระบุว่า DENV-3 และ DENV-4 เป็นซีโรทัยป์ที่โดดเด่น แสดงว่าในปีค.ศ. 2015 มีการระบาดของ DENV-3 และ DENV-4

วิธี DNA sequencing และวิธี Phylogenetic tree ระบุว่า DENV-1 มี 3 genotypes ได้แก่ genotype I, II และ III ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน genotype I (Zhang et al., 2005; Klungthong et al., 2008) ส่วนน้อยจัดอยู่ใน genotype II (1964) (Halstead et al., 1970) และ genotype III (1980-1983) (Zhang et al., 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบ genotype I ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงหมุนเวียนอยู่ในกรุงเทพมหานคร วิธี DNA sequencing และวิธี Phylogenetic tree ระบุว่า DENV-1 มี 3 genotypes ได้แก่ genotype I, II และ III (Klungthong et al., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบ genotype I เพียงจีโนทัยป์เดียว สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Zhang et al., 2005; Klungthong et al., 2008) แสดงว่า genotype I ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงหมุนเวียนอยู่ในกรุงเทพมหานคร ถึงแม้ว่าในปีค.ศ. 1964 มีรายงานพบ genotype II (Halstead et al., 1970) และ ปีค.ศ. 1980-1983 พบ genotype III (Zhang et al., 2005) DENV-2 มี 5 genotypes ได้แก่ Asian I, Asian II, Asian/American, Cosmopolitan และ American (Klungthong et al., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบ Asian I genotype เพียงจีโนทัยป์เดียว สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Zhang et al., 2006; Klungthong et al., 2008) แสดงว่า Asian I genotype ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงหมุนเวียนอยู่ในกรุงเทพมหานคร ถึงแม้ว่าในปีค.ศ. 1969 และ 1998 มีรายงานพบ Cosmopolitan genotype

(Twiddy et al., 2002; Zhang et al., 2006) และในปีค.ศ. 1980-1991 มีรายงานพบ Asian/American genotype (Zhang et al., 2006; Klungthong et al., 2008) DENV-3 มี 4 genotypes ได้แก่ genotype I, II, III และ IV (Klungthong et al., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบ genotype III สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศไทย (Wongwiwat et al. 2012; Ha et al., 2015) และประเทศลาว (Lao et al., 2014) อย่างไรก็ตามรายงานนี้แตกต่างจากรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า genotype II เป็น genotype ที่โดดเด่นในประเทศไทย (Lanciotti et al., 1994; Zhang et al., 2005; Klungthong et al., 2008) DENV-4 มี 3 genotypes ได้แก่ genotype I, II และ III การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพบ genotype I และ II สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Wang et al., 2000; Klungthong et al., 2004; 2008; Kittichai et al., 2015) แสดงว่า genotype I และ II ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงหมุนเวียนอยู่ในกรุงเทพมหานคร ถึงแม้ว่าในปีค.ศ. 1997-2001 มีรายงานพบ genotype III (1997-2001) (Klungthong et al., 2004)

สรุปผลการวิจัย

วิธี RT-PCR ตรวจไวรัสเชื้อเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยต้องสงสัยโรคไข้เด็งกีพบ DENV-3 มีการระบาดมากที่สุด รองลงมาคือ DENV-4, DENV-1 และ DENV-2 ตามลำดับ วิธี DNA sequencing และวิธี phylogenetic tree ตรวจพบ DENV-1 genotype I (จีโนทัยป์ดั้งเดิม) และ DENV-2 Asian I genotype (จีโนทัยป์ดั้งเดิม), DENV-3 genotype III (จีโนทัยป์อุบัติใหม่), DENV-4 genotype I (จีโนทัยป์ดั้งเดิม) และ genotype II (จีโนทัยป์อุบัติใหม่) ข้อมูลทางพันธุกรรมเชื้อไวรัสเด็งกีในกรุงเทพมหานครอาจจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาและสายวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสเด็งกีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หมายเลข SRF-JRG-2559-04

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- วงวัฒน์ ลีวลักษณ์. (2556). การเปลี่ยนแปลงทางระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในกรุงเทพฯ. วารสารกุมารเวชศาสตร์, 52(3), 250-254.
- ศิริเพ็ญ กัลยาณรจ และสุจิตรา นิมมานนิตย์. (2551). แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคไข้เลือดออกเดงกี (พิมพ์ครั้งที่ 2). นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข
- ศิริเพ็ญ กัลยาณรจ, มุกดา หวังวีรวงศ์, และวารุณี วัชรเสวี. (2556). แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคไข้เลือดออกเดงกี ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรชามหาราชินี (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: กระทรวงสาธารณสุข.
- สำนักโรคติดต่อทางแมลง. (2558). D.H.F, Total. สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2559, จาก <http://www.boe.moh.go.th/boedb/surdata/disease.php?ds=262766>
- สำนักโรคติดต่อทางแมลง. (2556). สถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2556. สืบค้น 27 ตุลาคม 2558, จาก <http://www.thaivbd.org/n/dengues/view/374>.
- สำนักโรคติดต่อทางแมลง. (2558). สถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2558. สืบค้น 5 ธันวาคม 2558, จาก <http://www.thaivbd.org/n/dengues/view/482>.

ภาษาต่างประเทศ

- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., & Myers, M. F. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E, et al. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8, S7-S16.
- Ha, T.L.N., Duoc, V.T., Yang, C.-F., Su, C.-L., Hsu, T.-C., Linh, N.T.H., . . . Shu, P.-Y. (2015). Dengue virus 3 strain D3/Thailand/1209bTw envelope glycoprotein gene, partial cds. Retrieved June 17, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP176707>.
- Halstead, S.B., Udomsakdi, S., Simasthien, P., Singharaj, P., Sukhavachana, P., & Nisalak, A. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 42(5), 261-275.
- Halstead, S. B. (2007). Dengue. *The Lancet*, 370(9599), 1644-1652.
- Kittichai, V., Sriprapun, M., Konklong, P., Thonsangin, N., Chompoosri, J., Tawatsin, A., . . . Siriyasatien, P. (2015). Double dengue serotypes in asymptomatic populations living in an area of Thailand endemic for dengue hemorrhagic fever. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(2), 205-212.

- Klungthong, C., Zhang, C., Mammen, M. P., Jr., Ubol, S., & Holmes, E. C. (2004). The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*, 329(1), 168-179.
- Klungthong, C., Putnak, R., Mammen, M. P., Li, T., & Zhang, C. (2008). Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *Journal of Virological Methods*, 154(1-2), 175-181.
- Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annual Review of Microbiology*, 62, 71-92.
- Lanciotti, R. S., Lewis, J. G., Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology*, 75(1), 65- 75.
- Lao, M., Caro, V., Thiberge, J. M., Bounmany, P., Vongpayloth, K., Buchy, P., . . . Grandadam, M. (2014). Co-circulation of dengue virus type 3 genotypes in Vientiane capital, Lao PDR. *PLoS One*, 9(12), e115569.
- Medina, F., Medina, J. F., Colón, C., Vergne, E., Santiago, G. A., & Muñoz-Jordán, J. L. (2012). Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology*, 15D-2.
- Najioullah, F., Viron, F., & Césaire, R. (2014). Evaluation of four commercial real-time RT-PCR kits for the detection of dengue viruses in clinical samples. *Virology Journal*, 11(1), 1.
- Paudel, D., Jarman, R., Limkittikul, K., Klungthong, C., Chamnanchanunt, S., Nisalak, A., & Chokejindachai, W. (2011). Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional Nested RT-PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. *North American Journal of Medical Sciences*, 3(10), 478.
- Rezza, G. (2012). *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. *BMC public health*, 12(1), 1.
- Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 In nature. *Virology*, 174(2), 479-493.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.
- Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Chau, N. V., Wills, B., Gould, E. A., Gritsun, T., & Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*, 298(1), 63-72.

- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D., Watowich, S. J., Gubler, D. J., & Weaver, S. C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of Virology*, 74(7), 3227-3234.
- Weaver, S.C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution* 9(4), 523-540.
- Wongwiwat, W., Noisakran, S., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Malasit, P., . . . Srean, G. (2012). Dengue virus 3 isolate 2-1969-9 envelope protein gene, partial cds. Retrieved June 17, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ740881>.
- Zhang, C., Mammen, M. P., Jr., Chinnawirotpisan, P., Klungthong, C., Rodpradit, P., Monkongdee, P., . . . Holmes, E. C. (2005). Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *Journal of Virology*, 79(24), 15123-15130.
- Zhang, C., Mammen, M. P., Jr., Chinnawirotpisan, P., Klungthong, C., Rodpradit, P., Nisalak, A., . . . Holmes, E. C. (2006). Structure and age of genetic diversity of dengue virus type 2 in Thailand. *Journal of General Virology*, 87(Pt 4), 873-883.