

การตรวจเชื้อไวรัสเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR *

Detection of Dengue Viruses from Patient Sera with Suspected Dengue Fever by Multiplex qRT-PCR

ชนัญชิตา ฤทธิรักษา (Chanunchida Ritruksa)**

จันทรดี ระเบบเบส (Jundee Rabablert)***

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี (dengue viruses, DENV) เป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคไข้เด็งกี (dengue fever, DF), โรค ไข้เลือดออก (dengue haemorrhagic fever, DHF) และโรคไข้เลือดออกที่มีการช็อคร่วม (dengue shock syndrome, DSS) วิธีการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันโดยการใช้ DEN nonstructural (NS)1 antigen (Ag) และ anti-DEN IgM antibody (Ab) จำกัสำหรับผู้ป่วยติดเชื้อ DENV ระยะไข้เฉียบพลัน เนื่องจากวิธีตรวจมีค่าความไวและความแม่นยำต่ำ วิธี *Toxorhynchites (Tx.) splendens* mosquito isolation ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานที่มีการใช้ในบางห้องปฏิบัติการ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะใช้เวลานานสำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วยในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพัฒนาวิธี Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) โดยการใช้ primer ส่วน E/prM เพื่อตรวจเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีซึ่งให้ผลบวกด้วยวิธี Immunochromatography (IC) เปรียบเทียบกับวิธี *Toxorhynchites (Tx.)* mosquito isolation วิธี IC ตรวจพบผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีที่มีผลบวกต่อ DEN NS1 Ag หรือ anti-DEN IgM/IgG Ab จำนวน 68 ใน 76 ราย (89.5%) วิธี Multiplex qRT-PCR และ วิธี *Tx.* mosquito isolation ตรวจพบเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วย 49 ราย (72.1%) และ 48 ราย (70.6%) ตามลำดับ วิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจพบเชื้อ DENV-1 จากซีรัมผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ DENV ซ้ำ (DEN NS1⁺, anti-DEN IgM/IgG⁺) ในขณะที่วิธี *Tx.* Mosquito isolation ตรวจไม่พบเชื้อ DENV วิธี Multiplex qRT-PCR และ วิธี *Tx.* mosquito isolation ตรวจพบ DENV-3 (19, 38.8%; 19, 39.6%) > DENV-4 (16, 32.7%; 16, 33.3%) > DENV-1 (8, 16.3%; 7, 14.6%) > DENV-2 (6, 12.2%; 6, 12.5%) ตามลำดับ ค่าความไว, ค่าความจำเพาะและค่าความแม่นยำของวิธี Multiplex qRT-PCR เปรียบเทียบกับวิธี *Tx.* mosquito isolation เท่ากับ 93.8%, 80.0% และ 89.7%

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของปริญญานิพนธ์ เรื่อง การตรวจและจำแนกซีโรทัยปของเชื้อไวรัสเด็งกีจากซีรัมผู้ป่วยโรค ไข้เลือดออกด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีการแยกเชื้อไวรัสเด็งกีผ่านทางยุง

** นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

(Student of Bachelor of Computer Science, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University.
e-mail : r.chanunchida@gmail.com)

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

ตามลำดับ ดังนั้น วิธี Multiplex real-time RT-PCR น่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจเชื้อ DENV หรือประยุกต์ใช้ตรวจเชื้อไวรัสชนิดอื่นต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสเด็งกี, โรคไข้เด็งกี, วิธี Multiplex qRT-PCR , วิธี Mosquito isolation

Abstract

Dengue viruses (DENV) cause dengue fever (DF), dengue haemorrhagic fever (DHF), and dengue shock syndrome (DSS) worldwide. Immunological diagnostics based on IgM and/or nonstructural protein 1 (NS1) antigen are limited for acute dengue infection due to low sensitivity and accuracy. *Toxorhynchites (Tx.) splendens* mosquito isolation continues to be gold standard performed in some laboratories, though the prolonged turn-around time for clinical diagnosis. In this study, we developed Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) using E/prM primers to detect DENV from Immunochromatography (IC)-positive patient sera suspected with DF compared with Tx. mosquito isolation. IC method examined 68 of 76 (89.5%) patients suspected with DF who had positive DEN NS1 Ag or anti-DEN IgM/IgG Ab. Multiplex qRT-PCR and Tx. mosquito isolation detected DENV from 49 (72.1%) and 48 (70.6%) patient sera, respectively. Multiplex qRT-PCR could detect DENV-1 from one patient who had secondary infection (DEN NS1⁺, anti-DEN IgM/IgG⁺) whereas Tx. mosquito isolation could not detect. Multiplex qRT-PCR and Tx. mosquito isolation showed DENV-3 (19, 38.8%; 19, 39.6%) > DENV-4 (16, 32.7%; 16, 33.3%) > DENV-1 (8, 16.3%; 7, 14.6%) > DENV-2 (6, 12.2%; 6, 12.5%), respectively. Sensitivity, specificity and accuracy of Multiplex qRT-PCR compared with Tx. mosquito isolation were 93.8%, 80.0% and 89.7%, respectively. Therefore, Multiplex qRT-PCR may be alternative method for DENV detection and apply to examine the other viruses later.

Key words: dengue virus, dengue fever, Multiplex qRT-PCR, Tx. mosquito isolation

บทนำ

โรคไข้เด็งกี (dengue fever, DF) โรคไข้เลือดออกเด็งกี (dengue haemorrhagic fever, DHF) และโรคไข้เด็งกีที่มีอาการช็อกกร่วม (dengue shock syndrome, DSS) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสเด็งกี (dengue viruses, DENV) ซึ่งมีทั้งหมด 4 ซีโรทัยป์ ได้แก่ DENV-1, DENV-2, DENV-3, และ DENV-4 มีรายงานการหมุนเวียนของเชื้อ DENV และ จัดอยู่ในสกุล *Flavivirus*, วงศ์ *Flaviviridae* มีรายงานการหมุนเวียนของเชื้อ DENV ในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 120 ประเทศ ในบริเวณเขตร้อนและเขตกึ่งเขตร้อนทั่วโลก (Shepard et al., 2014; Stanaway et al., 2016) มีรายงานผู้ป่วยโรคไข้เด็งกีส่วนใหญ่เป็นเด็กและวัยรุ่นประมาณ 390 ล้าน

คนต่อปี โดยผู้ป่วยจำนวน 1 ใน 4 ของโรคไข้เด็งกีไม่แสดงอาการ (Brady et al., 2012; Bhatt et al., 2013) ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายประมาณ 5% มีอาการรุนแรงของโรคไข้เลือดออก (Ahmed & Broor, 2014) ปัจจัยที่เป็นสาเหตุทำให้การแพร่กระจายของโรคไข้เด็งกีเพิ่มขึ้น คือ จำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นในชุมชน, การเคลื่อนย้ายที่อยู่ของประชากรภายในและภายนอกประเทศ, อุณหภูมิสูงขึ้น รวมทั้งการดื้อยาฆ่าแมลงของยุงลาย *Aedes spp.* (Gubler, 2011; Weaver et al., 2013) ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันและยารักษาโรคไข้เลือดออก

การตรวจผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีนิยมตรวจคัดกรองผู้ป่วยโดยใช้วิธี Immunochromatographic (IC) ตรวจ DEN nonstructural protein (NS) 1 antigen (Ag) ร่วมกับ anti-DEN IgM/IgG antibody (Ab) จากซีรัมผู้ป่วย การตรวจพบ DEN NS1 Ag แสดงว่า ผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีกำลังติดเชื้อ (recent infection) (Lapphra et al., 2008) โดยปริมาณ DEN NS1 Ag แปรตามระดับไวรัสในกระแสเลือด (viremic level) (Srivastava et al., 2011) การตรวจพบ anti-DEN IgM Ab แสดงว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อครั้งแรก ในขณะที่การตรวจพบ anti-DEN IgM และ IgG Ab แสดงว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อครั้งสอง (Shu & Huang 2004) วิธี IC เป็นวิธีที่รวดเร็วแปลผลภายใน 30 นาที แต่มีความไวแปลตามประวัติการติดเชื้อ DENV ของผู้ป่วย โดยวิธี IC มีค่าความไวในการตรวจ DEN NS1 Ag จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีที่ติดเชื้อครั้งแรกสูงกว่าซีรัมผู้ป่วยติดเชื้อครั้งที่สอง (Muller & Young, 2012; Tittarelli et al., 2016) นอกจากนี้การตรวจพบ anti-DEN IgM Ab อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ Japanese encephalitis virus (JEV) ซึ่งเป็นสมาชิกในสกุล *Flavivirus* เช่นเดียวกับเชื้อ DENV (Cardosa et al., 1991; A-Nuegoonpipat et al., 2008)

มีหลายรายงานระบุวิธีตรวจ DEN Ribonucleic acid (RNA) จากซีรัมผู้ป่วยโรคไข้เด็งกีระยะไข้เฉียบพลัน Lanciotti et al., (1992) พัฒนา วิธี Nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) ตรวจและจำแนก DENV-1 – DENV 4 โดยใช้ 1 ซีโรทัยป์/หลอด(singleplex) ต่อมา Harris et al., (1998) ประยุกต์เป็นวิธี Multiplex RT-PCR ตรวจเชื้อ DENV-1 – DENV 4 ภายในหลอดเดียวกัน (fourplex) วิธี Nested RT-PCR และวิธี Multiplex RT-PCR มีค่าความไวสูง แต่มีค่าความจำเพาะเจาะจงต่ำ ใช้เวลาในการตรวจนานเนื่องจากต้องการ วิธี Agarose gel electrophoresis ในการแปลผล

วิธี quantitative RT-PCR (qRT-PCR) ถูกพัฒนาสำหรับตรวจวัดปริมาณของเชื้อไวรัส (viral load) และจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อ DENV โดยใช้สปีฟลูออเรสเซนซ์ ในการแปลผลแทนขั้นตอน post-PCR วิธี qRT-PCR มีข้อดีกว่าวิธี RT-PCR คือ (1) มีค่าความไวสูง (2) ใช้เวลาน้อยกว่า 4 ชั่วโมง และ (3) สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมาก (Chien et al., 2006) การทราบปริมาณและซีโรทัยป์ของ DENV ทำให้ทราบความรุนแรงและการเกิดพยาธิสภาพของโรคไข้เด็งกีในผู้ป่วย มีประโยชน์อย่างยิ่งด้านการรักษาและการเฝ้าระวังโรค (Vaughn et al., 2000) ต่อมา มีการประยุกต์วิธี Multiplex qRT-PCR เพื่อตรวจเชื้อ DENV-1 – DENV-4 แบบ fourplex ซึ่งมีข้อดีกว่าวิธี qRT-PCR แบบ singleplex คือ ลดค่าใช้จ่ายและปริมาณของซีรัมในการตรวจ (Johnson et al., 2005; Lai et al., 2007) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยา Multiplex qRT-PCR ต้องมีการหาค่าการเพิ่มประสิทธิภาพ (optimization) เพื่อให้ได้ผลการตรวจวัดปริมาณที่แม่นยำ (Duvigneau et al., 2005)

วิธีการแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation) โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อ DENV ในยุงยักษ์ *Toxorynchites spendens* และการจำแนกซีโรทัยป์ (serotyping) ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐานดั้งเดิมที่มีค่าความจำเพาะ 100% มีค่าความไวในการแยกเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้

เด็งก็ติดเชื้อครั้งแรก(primary infection) สูงกว่าซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งก็ติดเชื้อครั้งที่สอง (secondary infection) (Samuel & Tyagi, 2006; Jarman et al., 2011) ถึงแม้ว่าวิธี Tx. mosquito isolation จะมีค่าความไว 80% ความจำเพาะ 100% แต่เป็นวิธีที่ใช้และใช้เวลาในการแปลผลนานประมาณ 7-14 วัน ไม่เหมาะต่อการรักษาผู้ป่วย ยังไม่มีข้อมูลของวิธี Multiplex qRT-PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานดั้งเดิม Tx. mosquito isolation ในการตรวจเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งก็

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยต้องการพัฒนาวิธี Multiplex qRT-PCR โดยการใช้ primer ส่วน E/prM เพื่อตรวจเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งก็ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานดั้งเดิม Tx. mosquito isolation

วิธีการวิจัย

1. เชื้อไวรัส DENV

เชื้อ DENV-1 (16007 strain), DENV-2 (16681 strain), DENV-3 (16562 strain), DENV-4 (1036 strain), หรือ เชื้อ JEV (Beijing strain) ปริมาณความรุนแรง $\sim 1 \times 10^7$ plaque forming units (pfu)/ml เตรียมโดย นายสุพจน์ ราชคำ นักวิทยาศาสตร์ 5 ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันวิทยาศาสตร์ชีวโมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล เชื้อ JEV จะนำไปใช้ทดสอบค่าความจำเพาะ (specificity) ของวิธี Multiplex qRT-PCR

2. รีคอมบิแนนต์พลาสมิด (recombinant plasmids)

pDENV-1, pDENV-2, pDENV-3, และ pDENV-4 เตรียมจากพลาสมิด pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Massachusetts, USA) เชื่อมต่อกับส่วนยีน NS5 ของ DENV-1, ส่วนยีน Envelope (E) ของ DENV-2, ส่วนยีน premembrane (prM) ของ DENV-3 และส่วนยีน prM ของ DENV-4 ตามลำดับ โดยนายชุมพล ไชโย นักศึกษาระดับปริญญาเอก หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร pDENV-1 – pDENV-4 จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และค่าจำกัดในการตรวจ (limit of detection) ของวิธี Multiplex qRT-PCR

3. ยุงยักซ์ *Tx. splendens*

ยุงยักซ์ *Tx. splendens* เพศผู้และเพศเมีย เลี้ยงด้วยอาหารน้ำตาล (10% sugar+ 2% vitamin B) ในกรง ขนาด 60x60x60 ลูกบาศก์เซนติเมตร ภายใต้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (°C) ค่าความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% ความสว่างของแสง 16 ชั่วโมงและความมืด 8 ชั่วโมง ภายใต้การดูแลของ นายประวุฒิ จิบบัณการ พนักงานราชการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันวิทยาศาสตร์ชีวโมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ยุงยักซ์ *Tx. splendens* คละเพศอายุ 2-5 วัน จะถูกนำไปแยกเชื้อ DENV ด้วยวิธี Tx. mosquito isolation

4. ซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งก็

เก็บเลือดผู้ป่วยระยะไข้เฉียบพลัน (1-6 วัน) และมีอาการแสดงทางคลินิกของโรคไข้เด็งก็ ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (ศิริเพ็ญ, 2552) จำนวน 76 ราย ภายใต้การวินิจฉัยของ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงกุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ หน่วยกุมารเวชกรรมและหน่วยโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลศิริราช และ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ หน่วยโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ส่งเลือดผู้ป่วยไปยังห้องปฏิบัติการเลขที่ 304อาคารที่ 1ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล

มหาวิทยาลัยมหิดล ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นตกเลือดเพื่อแยกซีรัม สุ่มซีรัมเพื่อตรวจคัดกรองซีรัมผู้ป่วยโรคไข้
เด็งกีด้วยวิธี IC เก็บซีรัมส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อตรวจเชื้อ DENV ด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR และ
วิธี *Tx. mosquito isolation*

5. วิเคราะห์ค่าความเป็นเส้นตรง, ค่าจำกัดในการตรวจ, ค่าความจำเพาะของวิธี Multiplex qRT-PCR

สำหรับการวิเคราะห์ค่าความเป็นเส้นตรงและค่าจำกัดในการตรวจ-เจือจาง DNA template ของ
pDENV-1, pDENV-2, pDENV-3 หรือ pDENV-4 (100 ng, 10^{10} copies/ul) แบบ 10 เท่า (10^1 - 10^9) สำหรับ
ตัวควบคุมลบใช้ Diethyl pyrocarbonate (DEPC) water เตรียมปฏิกิริยา Multiplex qRT-PCR ปริมาตร 20
μl ประกอบด้วย DNA หรือ RNA templates, 1X KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix, 1X KAPA RT
Mix, 0.2 μM DENV primer sets, และ 0.15 μM DENV probe, (Johnson et al., 2005), ดังแสดงใน
ตารางที่ 1 โดยการใช้เครื่อง Chromo 4 Real-time PCR detector (Bio-Rad Laboratories Inc., California,
USA) ภายใต้อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA, อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ
ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RT, อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 3 วินาที เพื่อให้ DNA เสื่อมสภาพ และ 60 °ซ
เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณยีน อ่านผลจากการเปล่งแสงของสี fluorescence ซึ่งอยู่
เหนือค่า threshold cycle (Ct) และใช้ข้อมูลที่ได้เป็นค่ามาตรฐาน (standard curve) ในการระบุปริมาณ
ของเชื้อ

สำหรับการวิเคราะห์ค่าความจำเพาะใช้ JEV RNA template (100 ng) เตรียมปฏิกิริยา Multiplex
qRT-PCR ปริมาตร 20 μl เหมือนข้างต้น แบบ singlex ตรวจค่าความจำเพาะโดยใช้ DENV-1 primers &
probe, DENV-2 primers & probe, DENV-3 primers & probe, และ DENV-4 primers & probe
ตามลำดับ

6. การตรวจคัดกรองผู้ป่วยสงสัยโรคเด็งกี ด้วยวิธี IC

ตรวจคัดกรองซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกี โดยใช้ชุดตรวจ SD BIOLINE Dengue Duo (SD
Standard diagnostic, Korea) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต กล่าวโดยย่อ สำหรับการตรวจ DEN NS1 Ag
หยดซีรัมจำนวน 3 หยด (~100 μl) ลงในหลุม S ของแถบ DEN NS1 Ag บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
อ่านผลจากแถบสีตำแหน่ง C และ T ด้วยตาเปล่า ผู้ป่วยที่มี DENV NS1 Ag (+) -พบแถบสีแดงตำแหน่ง C และ
T) ในทางตรงข้ามผู้ป่วยที่มี DENV NS1 Ag (-) พบแถบสีแดงตำแหน่ง C เท่านั้น สำหรับการตรวจ anti-DEN
IgM/IgG Ab หยดซีรัมปริมาตร ~10 μl ลงในหลุม S เติม assay diluent 4 หยด ลงในหลุมกลมใต้หลุม S บ่ม
ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที อ่านผลจากแถบสีตำแหน่ง C, M และ G ด้วยตาเปล่า ผู้ป่วยที่มี anti-DEN
IgM (+), IgG (-) จะพบแถบสีแดงตำแหน่ง C และ M ส่วนผู้ป่วยที่มี anti-DEN IgM (+), และ anti-DEN IgG (+)
จะพบแถบสีแดงตำแหน่ง C, M และ G ส่วนผู้ป่วยที่มี anti-DEN IgM (-), และ anti-DEN IgG (+) จะพบแถบสี
แดงตำแหน่ง C และ G

7. การตรวจและจำแนกเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี M qRT-PCR

7.1 การสกัด RNA

สกัด RNA จาก ซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีโดยใช้ชุดสกัด E.Z.N.A. viral RNA kit (OMEGA bio-tex, Norcross, Georgia, USA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต กล่าวโดยย่อ ทำให้เซลล์แตกโดยการเติม QVL Lysis Buffer ปริมาตร 500 μ l ลงในซีรัมปริมาตร 150 μ l เติม Carrier RNA ปริมาตร 5 μ l เพื่อรักษาสภาพ RNA เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที ตกตะกอน RNA โดยใช้ 100% ethanol ปริมาตร 350 μ l เติมสารผสม (mixture) ปริมาตร 750 μ l ลงใน HiBind RNA Mini Column ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 15 วินาที ล้างตะกอน RNA โดยการเติม VHB Buffer ปริมาตร 500 μ l และ RNA Wash Buffer II ปริมาตร 500 μ l ตามลำดับ ปั่นตกที่ความเร็วและเวลาเหมือนข้างต้น สะล้าง RNA จาก HiBind RNA Mini Column โดยการเติม DEPC water ปริมาตร 50 μ l ปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บ RNA ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในการตรวจด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR

7.2 สังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณ

เตรียมปฏิกิริยา Multiplex qRT-PCR ปริมาตร 20 μ l ประกอบด้วย RNA template, 1X KAPAPROBE FAST qPCR Master Mix, 0.2 μ M DENV primers (DENV-1, DENV-2, DENV-3, และ DENV-4), 0.15 μ M DENV Probes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, และ DENV-4), และ 1X KAPA RT Mix โดยใช้เครื่อง Chromo 4 Real-time PCR detector (Bio-Rad Laboratories) ภายใต้อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 5 นาที, อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที, อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 วินาที และ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ อ่านผลจากการเปล่งแสงของสี fluorescence ซึ่งอยู่เหนือค่า threshold cycle (Ct)

8. การตรวจและจำแนกเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วย

8.1 การแยกเชื้อ DENV ในยุงยักซ์ *Tx. splendens* (*Tx. mosquito isolation*) เจือจางซีรัมผู้ป่วย ปริมาตร 50 μ l แบบ 10 เท่า (10^{-1} - 10^{-5}) ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 และ 2% FCS ฉีดแต่ละค่าความเจือจางของซีรัมปริมาตร 0.34 μ l ลงบริเวณช่องอก (intrathoracic) ของยุงยักซ์ *Tx. splendens* คละเพศ อายุ 2-5 วัน จำนวน 30 ตัว/แต่ละค่าความเจือจาง ภายใต้กล้อง stereomicroscope (Olympus optical, Japan) สำหรับตัวควบคุมบวกฉีด DENV-1, DENV-2, DENV-3, หรือ DENV-4 สำหรับตัวควบคุมลบฉีด PBS+2% FCS เลี้ยงยุงที่อุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 14 วัน นับจำนวนยุงรอดชีวิต แบ่งเก็บยุงรอดชีวิต 5 ตัว/หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อตรวจและจำแนกซีโรทัยป์ของ DENV จากส่วนหัวยุงยักซ์ *Tx. splendens* ด้วยวิธี IFA

8.2 การตรวจและจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีด้วยวิธี IFA

วางและบดส่วนหัวยุงยักซ์ *Tx. splendens* จำนวน 6 หัว/สไลด์ วางสไลด์อีกแผ่นทับบนสไลด์ที่มีหัวยุงวางอยู่ เก็บสไลด์แผ่นที่สองที่ (-20 °C) บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 45 นาที ตรึงเซลล์ด้วย prechilled acetone (-20 °C) บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เติม anti-DEN-1 Ab (1-F-1, ATCC HB-47), anti-DEN-2 Ab (3-H-5, ATCC HB-46), anti-DEN-3 Ab (5-D-4, ATCC HB-49), anti-DEN-4 Ab (1-H-10, ATCC HB-48), anti-DEN group (2-H-2, ATCC HB-114) และ anti-Flavivirus group (4-G-2, ATCC HB-112) ตามลำดับ ปริมาตร 10 μ l/หัว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ล้างสไลด์ด้วย

prechlilled PBS pH7.4 (4 °ซ) ที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง เติม fluorescence isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Grand Island, New York, USA) ปริมาตร 10 μ L/หัว และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 60 นาที ล้างสไลด์เหมือนข้างต้น เติม 50% buffered glycerol (Glycerol, Sigma, Steinheim, Germany) ปริมาตร 100 μ L/สไลด์ อ่านผลภายใต้ กล้อง Immunofluorescence (Olympus, Japan) บันทึกผลการทดลอง การแปลผลบวก(เซลล์ติดเชื้อ DENV)- ส่วน ไซโตพลาสซึมติดสีเขียวเรืองแสงสว่าง (bright green apple) การแปลผลลบ (เซลล์ไม่ติดเชื้อ DENV) – ส่วนไซโต พลาสซึมติดเซลล์สีเขียวแบบมืด (dull green apple) หรือติดสีเหลือง (yellow)

ผลการศึกษา

1. การตรวจค่าความเป็นเส้นตรง, ค่าจำกัดในการตรวจ, ค่าความจำเพาะของวิธี M qRT-PCR

ค่าความเป็นเส้นตรงของสมการถดถอย (Regression analysis, R^2) ของ pDENV-1, pDENV-2, pDENV-3, และ pDENV-4 เท่ากับ 0.989, 0.971, 0.990 และ 0.993 ดังแสดงในรูปที่ 1

ค่าจำกัดในการตรวจ (limit of detection) ของ pDENV-1, pDENV-2, pDENV-4 เท่ากับ 4.27, 12.02, และ 10.23 copies/ul ในขณะที่ pDENV-3 เท่ากับ 1.41×10^2 copies/ul แสดงว่า วิธี Multiplex qRT-PCR มีค่าความไวในการตรวจเชื้อ DEN-1, DEN-2, และ DEN-4 มากกว่า DEN-3 นอกจากนี้วิธี Multiplex qRT-PCR ไม่สามารถตรวจเชื้อ JEV แสดงว่า โพรเมอร์และไพรเมอร์ของเชื้อ DEN-1 – DEN-4 มีความจำเพาะสูง

2. การตรวจ DEN NS1 Ag และ anti-DEN IgM/IgG Ab จากซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี IC

วิธี IC ตรวจพบผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกี จำนวน 68 ใน 76 ราย (89.5%) (ตารางที่ 2) โดยจำแนกผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ I- ผู้ป่วยที่มี DEN NS1 Ag (+) แต่ไม่มี anti-DEN IgM (-), IgG (-) จำนวน 55 ราย, กลุ่มที่ II-ผู้ป่วยที่มี DEN NS1 Ag (+) และมี anti-DEN IgM (+), IgG (+) จำนวน 1 ราย, และกลุ่มที่ III-ผู้ป่วยที่มี DEN NS1 Ag (-) แต่มี anti-DEN IgM (+), IgG (+) จำนวน 12 ราย, และกลุ่มที่ IV-ผู้ป่วยที่มี anti-DEN IgM (+) เพียงอย่างเดียว จำนวน 9 ราย ตามลำดับ ผู้ป่วยที่ให้ผลบวกด้วยวิธี IC จำนวน ทั้งหมด 68 รายจะถูกนำไปตรวจด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR และวิธี IFA

3. การแยกและจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยในยุ่งยักซ์ Tx. Splendens ด้วยวิธี IFA

วิธี IFA ตรวจพบ เชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีในยุ่งยักซ์ Tx. splendens จำนวน 48 ใน 68 ราย (70.6%) โดยตรวจพบเชื้อ DENV จาก กลุ่ม (I) ซีรัมผู้ป่วยที่มี DEN NS1 Ag (+) แต่ไม่มี anti-DEN IgM (-), IgG (-) จำนวน 46 ใน 55 ราย (83.6%) และกลุ่ม (III) ซีรัมผู้ป่วยที่มี DENV NS1 Ag (-) แต่มี anti-DEN IgM/IgG Ab (+) จำนวน 2 ใน 12 ราย (16.7%) ในทางตรงข้าม วิธี IFA ตรวจไม่พบ เชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยกลุ่ม (II) ที่มี DEN NS1 Ag (+), anti-DEN IgM (+) และ IgG (+) การจำแนก DEN serotypes ด้วยวิธี IFA พบ DENV-1 จำนวน 7 ราย (DEN NS1 Ag+, 6 ราย; DEN NS1 Ag-, 1 ราย), DENV-2 จำนวน 6 ราย (DEN NS1 Ag+, 5 ราย; DEN NS1 Ag-, 1 ราย), DENV-3 จำนวน 19 ราย (DEN NS1 Ag+), และ DENV-4 จำนวน 16 ราย (DEN NS1 Ag+) โดย DENV-3 พบมากที่สุด ในทางตรงข้าม DENV-2 พบน้อยที่สุด (ตารางที่ 2)

4. การตรวจ DEN RNA จากซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR

วิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจพบ เชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกี จำนวน 49 ใน 68 ราย (72%) โดยตรวจพบเชื้อ DENV จาก กลุ่ม (I) จำนวน 45 ใน 55 ราย (81.8%), กลุ่ม (III) จำนวน 3 ใน 3 ราย (100 %) นอกจากนี้วิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจพบเชื้อ DENV-1 จาก กลุ่ม (II) จำนวน 1 ราย ในขณะที่วิธี IFA ตรวจไม่พบเชื้อ DENV (ตารางที่ 2) วิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจพบ DENV-1 จำนวน 8 ราย (DEN NS1 Ag+, 6 ราย; DEN NS1 Ag-, 2 ราย), DENV-2 จำนวน 6 ราย (DEN NS1 Ag+, 4 ราย; DEN NS1 Ag+, anti-DEN IgM/IgG+ 1 ราย; DEN NS1 Ag-, 1 ราย), DENV-3 จำนวน 19 ราย (DEN NS1 Ag+), และ DENV-4 จำนวน 16 ราย (DEN NS1 Ag+) วิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจพบ DENV-3 > DENV-4> DENV-1> DENV-2 ตามลำดับ สอดคล้องกับวิธี IFA เปรียบเทียบวิธี Multiplex qRT-PCR กับวิธี Tx. mosquito isolation พบว่าวิธี Multiplex qRT-PCR มีความไวเท่ากับ 93.8% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 80% และค่าความแม่นยำเท่ากับ 89.7%

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

Johnson et al., (2005) พัฒนาริธี Multiplex qRT-PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ส่วน E/prM ตรวจเชื้อ DENV-1, DENV-2, DENV-3, และ DENV-4 จำนวน 7, 10, 9, และ 10 สายพันธุ์ ตามลำดับ ค่าจำกัดในการตรวจ (limit of detection) ของ DENV-1 เท่ากับ 0.5 PFU/ml ในขณะที่ DENV-2, DENV-3, และ DENV-4 เท่ากับ 0.002 PFU/ml ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยพัฒนาริธี Multiplex qRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ส่วน E/prM ตรวจ pDENV-1 (16007), pDENV-2 (16681), pDENV-3(16562), pDENV-4 (1036) พบว่ามีค่าจำกัดในการตรวจของ DENV-1, DENV-2, DENV-3, และ DENV-4 เท่ากับ 0.427, 1.202, 1.41 และ 1.02 PFU/ml ค่าจำกัดในการตรวจครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของ Johnson et al., (2005) เนื่องจากผู้วิจัยใช้ pDENV แทนที่เชื้อ DENV รายงานก่อนหน้านี้ระบุว่าการใช้ plasmid มีความเสถียรและมีความเที่ยงตรงมากกว่าเชื้อ DENV

การตรวจคัดกรองผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีนิยมนตรวจด้วยวิธี IC เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความรวดเร็วสามารถตรวจ DEN NS1 Ag และ anti-DEN IgM Ab จากซีรัมผู้ป่วยโรคไข้เด็งกี หลังการติดเชื้อเป็นเวลา 2-6 วัน การตรวจพบ DEN NS1 Ag แสดงว่าผู้ป่วยมีเชื้อไวรัสในกระแสเลือด (viremia) (Alcon et al., 2002) การตรวจพบ anti-DEN IgM แสดงว่าผู้ป่วยกำลังติดเชื้อ DENV และเพิ่งติดเชื้อเป็นครั้งแรก (primary infection) การตรวจพบ anti-DEN IgG แสดงว่าผู้ป่วยติดเชื้อ DENV ซ้ำ (secondary infection) (Tittarelli et al., 2016)

ในการศึกษาครั้งนี้ วิธี IC ตรวจพบเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยจำนวน 68 ใน 76 ราย จำแนกผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามประวัติการติดเชื้อ ได้แก่ (1)- ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรก จำนวน 64 ราย โดยพบผู้ป่วยมี DEN NS1 Ag (+) จำนวน 55 ราย หรือ ผู้ป่วยมี anti-DEN IgM (+) จำนวน 9 ราย และ (2) ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งสอง พบผู้ป่วยมี DEN NS1 Ag (+), anti-DEN IgM/IgG (+) และ DEN NS1 Ag (-), anti-DEN IgM/IgG (+) จำนวน 4 ราย

วิธี Multiplex qRT-PCR และ/หรือ วิธี Tx. mosquito isolation ตรวจไม่พบเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยที่มี anti-DEN IgM Ab (+) จำนวน 9 ราย มีหลายรายงานระบุว่า anti-DEN IgM Ab มีปฏิกิริยาข้ามกับ anti-JEV IgM Ab เนื่องจากเชื้อ JEV อยู่ในสกุล *Flavivirus* เช่นเดียวกับเชื้อ DENV (Cardosa et al., 1991;

A-Nuegoonpipat et al., 2008) นอกจากนี้รายงานของ Prince et al., (2008) ระบุว่า anti-DEN IgM/Ab มีปฏิกิริยาข้ามกับ anti-malaria Ab แสดงว่าผู้ป่วยที่มีอาการแสดงทางคลินิกคล้ายโรคไข้เด็งกี จำนวน 9 ราย อาจป่วยเป็นโรคชนิดอื่น ต้องมีการวินิจฉัยต่อไป

วิธี Multiplex qRT-PCR และ วิธี Tx. mosquito isolation ตรวจพบเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยจำนวน 49 และ 48 ราย ตามลำดับ วิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจพบเชื้อ DENV-2 จากซีรัมผู้ป่วยที่มี DEN NS1 Ag (+), anti-DEN IgM/IgG (+) (secondary infection) ในขณะที่วิธี Tx. mosquito isolation ไม่สามารถตรวจเชื้อ DENV เนื่องจากวิธี Multiplex qRT-PCR ตรวจ RNA ของเชื้อไวรัส ในขณะที่วิธี Tx. mosquito isolation ตรวจเชื้อไวรัส การฉีดซีรัมผู้ป่วยโรคไข้เด็งกีที่มี immune complex ไปในยุง *Tx. splendens* เชื้อ DENV ในรูปของ immune complex ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในยุง สอดคล้องกับรายงานของ Jarman et al., (2011) ระบุว่า anti-DEN Ab ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในยุงยักซ์ *Tx. splendens* และยุงลาย *Aedes aegypti*

ถึงแม้ว่าวิธี Multiplex qRT-PCR จะเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว มีความไว และมีความจำเพาะ แต่ไม่สามารถใช้ทดแทนวิธี Tx. mosquito isolation เนื่องจากลักษณะทางฟิโนทัยป์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถระบุความแตกต่างของสายพันธุ์ไวรัสซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญด้านการสำรวจเชื้อไวรัส (viral surveillance) และการศึกษาพยาธิสภาพ (pathogenesis) การวิเคราะห์ซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีมีความสำคัญในด้านระบาดวิทยาและการศึกษาพยาธิสภาพของโรค ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยตรวจและจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกีด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อแต่ละซีโรทัยป์ของเชื้อ DENV เปรียบเทียบกับวิธี Tx. mosquito isolation ร่วมกับวิธี IFA โดยใช้ MAb ที่จำเพาะต่อแต่ละซีโรทัยป์ของเชื้อ DENV ผลการศึกษาผู้วิจัยพบว่าวิธี Multiplex qRT-PCR และวิธี Tx. mosquito isolation มีประสิทธิภาพในการตรวจซีโรทัยป์ของเชื้อ DENV ไม่แตกต่างกัน การตรวจพบเชื้อ DENV1- DENV4 แสดงว่า ในปีค.ศ 2016 มีการหมุนเวียนของเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในกรุงเทพมหานคร โดยมีเชื้อ DENV-3 เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไข้เด็งกีมากที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Nisalak et al., (2003) ระบุว่ามีการระบาดของเชื้อ DENV-3 ในปี ค.ศ 1987 ในขณะที่รายงานวิจัยหลายฉบับระบุว่า การระบาดของโรคไข้เด็งกีส่วนใหญ่เป็นเชื้อ DENV-2 (Barbazan et al., 2002; Wichmann, et al., 2011; Limkittikul et al., 2014; Polwing, 2016)

สรุปผลการวิจัย

วิธี Multiplex qRT-PCR มีความไวมากกว่าวิธี Tx. mosquito isolation ในการตรวจเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำ (DEN NS1⁺, anti-DEN IgM/IgG⁺) วิธี Multiplex qRT-PCR และ Tx. mosquito isolation มีประสิทธิภาพในการจำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อ DENV เท่ากัน ค่าความไว, ค่าความจำเพาะ และค่าความแม่นยำของวิธี Multiplex qRT-PCR เปรียบเทียบกับวิธี Tx. mosquito isolation เท่ากับ 93.8%, 80.0% และ 89.7% ตามลำดับ ดังนั้น วิธี Multiplex qRT-PCR น่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจเชื้อ DENV หรือประยุกต์ใช้ตรวจเชื้อไวรัสชนิดอื่นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ศิริเพ็ญ กัลป์ยานรุต, สุจิตรา นิมมานนิตย์. (2552). แนวทางการวินิจฉัย และรักษาโรคไข้เลือดออกเด็งกี. ฉบับแก้ไขปรับปรุงครั้งที่ 2. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

ภาษาต่างประเทศ

Ahmed, N.H. and Broor, S. (2014). "Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase."

Journal of Vector Borne Diseases, 51(3): 194–199.

Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., and Flamand, M. (2002).

"Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections." Journal of Clinical Microbiology, 40(2): 376-381.

A-Nuegoonpipat, A., Panthuyosri, N., Anantapreecha, S., Chanama, S., Sa-Ngasang, A.,

Sawanpanyalert, P., and Kurane, I. (2008). "Cross-reactive IgM responses in patients with dengue or Japanese encephalitis." Journal of Clinical Virology, 42(1), 75-77.

Barbazan, P., Yoksan, S., & Gonzalez, J.P. (2002). "Dengue hemorrhagic fever epidemiology in Thailand: description and forecasting of epidemics." Microbes and Infection, 4(7), 699-705.

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., et al., (2013). "The global distribution and burden of dengue." Nature, 496(7446): 504–507.

Brady, O.J., Gething, P.W., Bhatt, S., Messina, J.P., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Moyes, C.L., et al., (2012). "Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus." PLOS Neglected Tropical Disease, 6(8): e1760.

Cardosa, M.J. and Zuraini, I. (1991). "Comparison of an IgM capture ELISA with a dot enzyme immunoassay for laboratory diagnosis of dengue virus infections." The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 22(3): 337-40.

Chien, L.J., Liao, T.L., Shu, P.Y., Huang, J.H., Gubler, D.J., and Chang, G.J. (2006). "Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses." Journal of Clinical Microbiology, 44(4): 1295-1304.

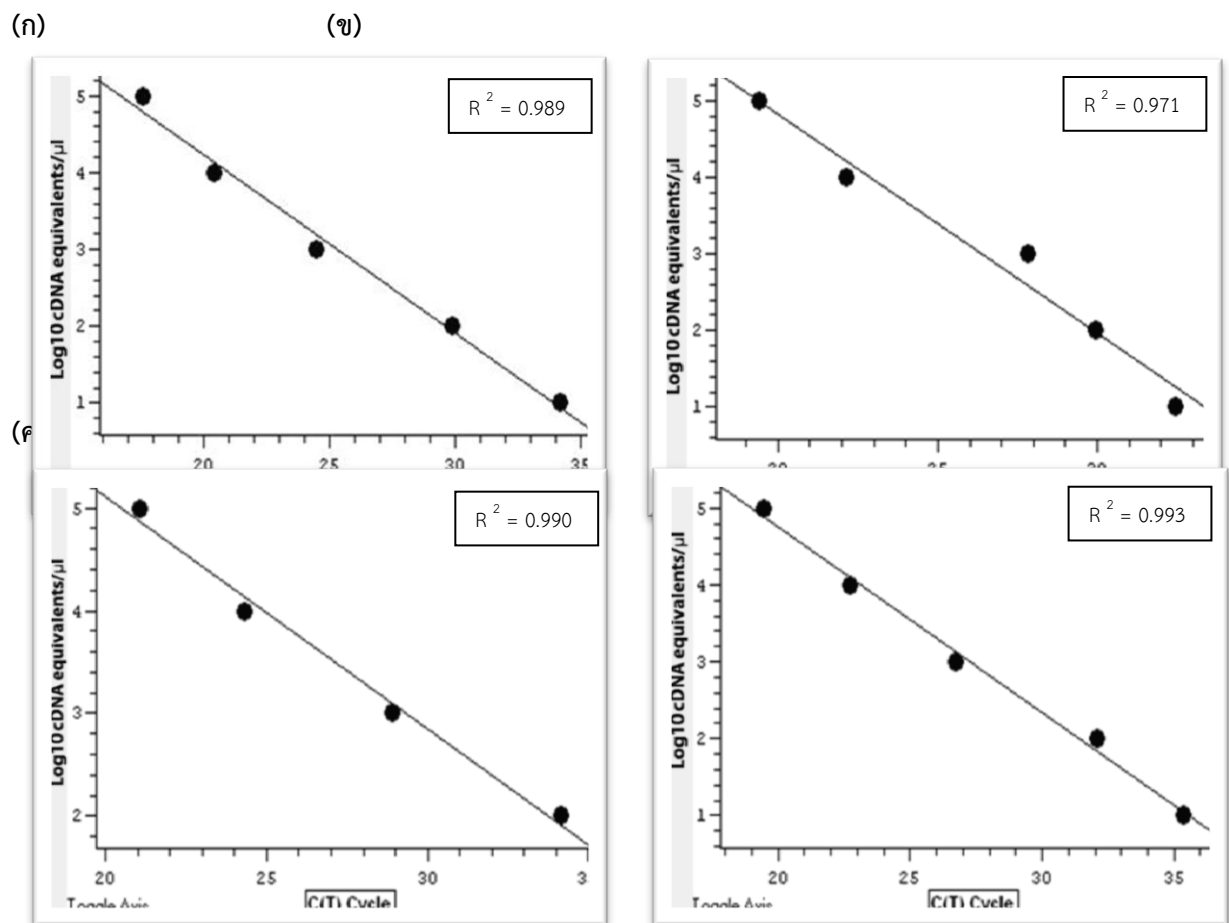
Duvigneau, J.C., Hartl, R.T., Groiss, S., and Gemeiner, M. (2005). "Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines." Journal of Immunological Methods, 306(1-2): 16-27.

- Gubler, D.J. (2011). "Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century." *Tropical Medicine and Health*, 39(4): 3–11.
- Harris, E., Roberts, T.G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L.D., Valle, S., Sandoval, E., et al., (1998). "Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR." *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9): 2634-2639.
- Jarman, R.G., Nisalak, A., Anderson, K.B., Klungthong, C., Thaisomboonsuk, B., Kaneechit, W., Kalayanaroj, S., et al., (2011). "Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2): 218–223.
- Johnson, B.W., Russell, B.J., and Lanciotti, R.S. (2005). "Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay." *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10): 4977-4983.
- Lai, Y.L., Chung, Y.K., Tan, H.C., Yap, H.F., Yap, G., Ooi, E.E., and Ng, L.C. (2007). "Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus." *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3): 935–941.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., and Vorndam, A.V. (1992). "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction." *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3): 545–551.
- Lapphra, K., Sangcharaswichai, A., Chokephaibulkit, K., Tiengrim, S., Piriyaakarnsakul, W., Chakorn, T., Yoksan, S., et al., (2008). "Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(4): 387-391.
- Limkittikul, K., Brett, J. and L'Azou, M. (2014). "Epidemiological Trends of Dengue Disease in Thailand (2000–2011): A Systematic Literature Review." *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3241.
- Muller, D. and Young, P.R. (2012). "The Many Faces of the Flavivirus Nonstructural Glycoprotein NS1". In *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*, 51-75. Edited by Yong SP. United Kingdom: Caister Academic Press.

- Nisalak, A., Endy, T.P., Nimmannitya, S., Kalayanaroj, S., Thisyakorn, U., Scott, R.M., Burke, D.S., et al., (2003). "Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(2): 191-202.
- Prince, H.E., Yeh, C., Lapé-Nixon, M. (2008). "Development of a more efficient algorithm for identifying false-positive reactivity results in a dengue virus immunoglobulin M screening assay. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15(8), 1304–1306.
- Polwiang, S. (2016). "Estimation of dengue infection for travelers in Thailand." *Travel Medicine and Infectious Disease*, 14(4): 398-406.
- Samuel, P.P. and Tyagi, B.K. (2006). "Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes." *Indian Journal of Medical Research*, 123(5): 615-628.
- Shepard, D.S., Undurraga, E.A., Betancourt-Cravioto, M., Guzman, M.G., Halstead, S.B., Harris E, Mudin, R.N., et al., (2014). "Approaches to refining estimates of global burden and economics of dengue." *PLOS Neglected Tropical Disease*, 8(11): e3306.
- Shu, P.Y. and J. H. Huang, J.H. (2004). "Current advances in dengue diagnosis." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4): 642-650.
- Srivastava, A., Dash, P.K., Tripathi, N.K., Sahni, A.K., Gopalan, N., and Lakshmana Rao, P.V. (2011). "Evaluation of a commercial dengue NS1 enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of dengue infection." *Indian Journal of Medical Microbiology*, 29(1): 51–55.
- Stanaway, J.D., Shepard, D.S., Undurraga, E.A., Halasa, Y.A. Coffeng, L.E., Brady, O.J, Hay, S.I. et al. (2016). "The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013." *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 712-723.
- Tittarelli, E., Barrero, P.R., Mistchenko, A.S., and Valinotto, L.E. (2016). "Secondary dengue virus infections during the 2009 outbreak in Buenos Aires." *Tropical Medicine and Health*, 21(1): 28-32.
- Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanaroj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., et al., (2000). "Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity." *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1): 2-9.
- Weaver, S.C. (2013). "Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention." *Trends in Microbiology*, 21(8): 360–363.

Wichmann, O., Yoon, I., Vong, S., Limkittikul, K., Gibbons, R., Mammen, M.P., Ly, S. et al. (2011).

“Dengue in Thailand and Cambodia: an assessment of the degree of underrecognized disease burden based on reported cases.” PLOS Neglected Tropical Diseases, 5(3), e996.



รูปที่ 1 ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และค่าจำกัดในการตรวจ (limit of detection) ของวิธี Multiplex qRT-PCR สำหรับ (ก) pDENV-1 (16007 strain) (ข) pDENV-2 (16681 strain) (ค) pDENV-3 (16562 strain) และ (ง) pDENV-4 (1036 strain)

ตารางที่ 1 DEN primers และ DEN probes สำหรับวิธี Multiplex qRT-PCR (Johnson et al., 2005)

Virus serotype	Nucleotide sequences	Genome position	Fluorophore
DEN-1 F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	8973	FAM/BHQ-1
DEN-1 C	CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC	9084	
DEN-1 probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998	
DEN-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	1605	HEX/BHQ-1
DEN-2 C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	1583	
DEN-2 probe	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	1008	
DEN-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	740	TR/BHQ-2
DEN-3 C	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	813	
DEN-3 probe	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	762	
DEN-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG	904	Cy5/BHQ-3
DEN-4 C	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	992	
DEN-4 probe	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG	960	

ตารางที่ 2. การตรวจเชื้อ DENV จากซีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกีด้วยวิธี Multiplex qRT-PCR เปรียบเทียบกับวิธี IFA

Group	DEN	anti-DEN		Multiplex qRT-PCR (n=49)				Total	IFA (n=48)				Total
		IgM	IgG	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEV-4		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	
I. (n=55)	+	-	-	6	4	19	16	45	6	5	19	16	46
II. (n=1)	+	+	+	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
III. (n=3)	-	+	+	2	1	0	0	3	1	1	0	0	2
IV. (n=9)	-	+	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				8	6	19	16	49	7	6	19	16	48
				16.3%	12.2%	38.8%	32.7%		14.6%	12.5%	39.6%	33.3%	