

NUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS IN NON-STRUCTURAL 3 (NS3) REGION
OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 2 ISOLATED FROM BLOOD AND SECRETIONS
OF THAI PATIENTS

Miss Wanna Kawang



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

ความหลากหลายของลำดับเบส บริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2
ที่แยกได้จากเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ในผู้ป่วยไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรรณภา กะหวัง : ความหลากหลายของลำดับเบส บริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่แยกได้จากเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ในผู้ป่วยไทย (NUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS IN NON-STRUCTURAL 3 (NS3) REGION OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 2 ISOLATED FROM BLOOD AND SECRETIONS OF THAI PATIENTS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. วันลา กุลวิจิต, 105 หน้า.

ไข้เลือดออก เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus; DENV) จัดเป็นโรคในกลุ่มโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ (emerging and reemerging Infectious disease) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยและประเทศต่างๆ ทั่วโลก ทั้งนี้เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มียาหรือวัคซีนเพื่อการรักษาที่จำเพาะ ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงพยาธิสภาพในการก่อโรคหรือความรุนแรงของโรค จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาความหลากหลายของลำดับเบส บริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 (DENV2-NS3) ที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกจากสิ่งส่งตรวจเลือด ได้แก่ พลาสมาและเม็ดเลือดขาว และสิ่งคัดหลั่งอื่นๆ ได้แก่ ปัสสาวะและน้ำลายในผู้ป่วยไทยที่มีการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน โดยจากการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของบริเวณ DENV2-NS3 ขนาด 295 bp กับฐานข้อมูลสากล NCBI พบว่าลำดับเบสส่วนใหญ่มีความเหมือนกับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และประเทศเพื่อนบ้าน โดยไวรัสที่พบในพลาสมามีความหลากหลายของลำดับเบสที่บริเวณดังกล่าวมากกว่าไวรัสจากสิ่งส่งตรวจอื่น และเมื่อวิเคราะห์ตามช่วงเวลาที่เกี่ยวข้องอย่างส่งตรวจ พบว่าตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในช่วงระยะแรกที่เข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย มีความหลากหลายของลำดับเบสมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในช่วงระยะหลัง อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่พบนั้นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน นอกจากนี้การทำแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายของลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวมีแนวโน้มที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ผลจากการศึกษานี้อาจนำไปใช้เพื่อเพิ่มความเข้าใจกลไกพยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี การหลบหลีกจากการถูกกำจัดจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการออกแบบเพื่อพัฒนาวัคซีนต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5574155730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: DENGUE VIRUS / NS3 REGION / GENETIC VARIATIONS / BLOOD / SECRETION

WANNA KAWANG: NUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS IN NON-STRUCTURAL 3 (NS3) REGION OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 2 ISOLATED FROM BLOOD AND SECRETIONS OF THAI PATIENTS. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., 105 pp.

Dengue fever is caused by infection with dengue virus (Dengue virus; DENV). Dengue fever is a disease in a group of emerging and reemerging Infectious disease, which is a major problem in public health of the country around the world because there is currently no specific treatment or vaccine. This research aims to analyze the variety of sequencing from the non-structural 3 (NS3) region of dengue virus serotype 2 (DENV2-NS3) in blood compartments (plasma, peripheral blood mononuclear cells) and secretions (saliva, urine) in Thai patients with acute infections. By comparing the DNA sequences of 295 bp in size of DENV2-NS3 with the database NCBI nucleotide sequences that are most similar to strains which found in Thailand and neighboring countries. Plasma showed the highest genetic variations among all specimens. When analyzed on a periodic collection of specimens. Specimens that were collected on early days of admitted at King Chulalongkorn Memorial Hospital (KCMH) tend to have more diversity than those collected on later days. However, the change of the DNA sequence that do not impact of changes in the amino acid sequence. In addition, the phylogenetic tree shows a variety of DNA sequences in these areas tend to correlate with the severity of the dengue virus infection. Results from this study may add up to our understanding the pathogenesis of dengue virus infection, viral clearance, and basic information for further vaccine development.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.นพ.วันลา กุลวิจิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ที่ท่านได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อชี้แนะ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วิไล อโนมะศิริ และ รศ.ดร.ภญ.ปริมณีเยน มุ่งการดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่มีความยินดีและกรุณาสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนกรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ต่องานวิจัยฉบับนี้อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์และประสาทวิชาความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณอภิญา บุตรลี เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณเกษิณี อรุณยิ่งมงคล นักวิทยาศาสตร์ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคติดเชื้อแห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และคุณบัณฑิตา ขำนิพัทธ์ เจ้าหน้าที่ธุรการ หน่วยโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกทางด้านต่างๆ ด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา ภูมิ ดร.เมธี ศรีประพันธ์ และนิสิตปริญญาเอก วศิน มนุประเสริฐ ที่คอยแนะนำเทคนิคและช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมไปถึงคำปรึกษา ตลอดจนการทำงานวิจัย และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ร่วมห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคติดเชื้อแห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการทำวิจัยและเป็นกำลังใจให้กันตลอดมา

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะแล้วเสร็จไม่ได้ หากไม่ได้รับการสนับสนุนทางการศึกษาจากบิดาและมารดา ตลอดจนญาติพี่น้องในครอบครัวและบรรดาเพื่อนๆ ที่คอยเป็นกำลังใจสำคัญตลอดมา คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้

วรรณภา กะหวัง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย	4
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
1.4 สมมติฐานการวิจัย	4
1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย.....	5
1.6 คำสำคัญ	1
1.7 รูปแบบการวิจัย	1
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย.....	1
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	2
1.10 อุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข.....	3
1.11 ข้อพิจารณาทางด้านจริยธรรม	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature).....	4
2.2 ไวรัสเดงกี (Dengue Virus)	5
2.3 ระบาดวิทยา (Epidemiology of DENV infection).....	6

2.4 พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกี (Pathogenesis of Dengue Virus Infection).....	7
2.5 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue Virus Replication).....	8
2.6 ลักษณะอาการทางคลินิก (Clinical Manifestations).....	9
2.7 การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมในสิ่งส่งตรวจเลือดและไม่ใช่เลือด (Laboratory Diagnosis)	10
2.8 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกี (Genetic variation of DENV).....	11
2.9 คุณสมบัติของโปรตีน NS3	12
2.10 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์	14
2.10.1 เทคนิคปฏิกิริยาโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR).....	14
2.10.2 เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real Time PCR หรือ Quantitative Real Time PCR; qPCR).....	17
2.10.3 เทคนิคการโคลนยีน (Gene Cloning Technique)	20
2.10.4 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing).....	22
2.11 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 รูปแบบการวิจัย	26
3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย.....	26
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	28
3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	29
3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	30
3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	31
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	31
3.8 วิธีดำเนินการวิจัย	32
3.8.1 สุ่มตัวอย่างผู้ป่วย	32

3.8.2 การสกัด RNA จากตัวอย่างผู้ป่วย (RNA Extraction).....	32
3.8.3 ตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของ RNA (Quantitative analysis for RNA)	32
3.8.4 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR).....	33
3.8.4.1 One Step RT-PCR β 2- microglobulin เพื่อตรวจหา housekeeping gene [48]	33
3.8.4.2 Semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol) เพื่อตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี.....	34
3.8.4.3 One Step RT-PCR DENV2 - NS3 เพื่อตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัส.....	37
การออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 บริเวณ NS3.....	37
ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ DENV2-NS3 (Specificity)	38
ตรวจหาความไวต่ำสุดของไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่สามารถตรวจจับไวรัสเดงกี (Sensitivity)	39
ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยวิธี One Step RT-PCR DENV2 - NS3.....	40
3.8.5 การตรวจวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis	40
3.8.6 การโคลนยีนบริเวณ DENV2-NS3 (Cloning DENV2-NS3 region).....	41
3.8.7 ตรวจสอบการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีนที่สนใจ โดยวิธี Colony PCR	44
3.8.8 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Germany).....	45
3.8.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) บริเวณ DENV2-NS3 จากตัวอย่างผู้ป่วย ..	46
3.8.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) บริเวณ DENV2-NS3 จากตัวอย่างผู้ป่วย.....	46

3.8.11 การตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกี โดยวิธี Real time RT-PCR	47
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
4.1 จำนวนตัวอย่างผู้ป่วย.....	50
4.2 ผลการตรวจสอบคุณภาพ RNA.....	53
4.3 ผลการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี.....	56
4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์บริเวณ NS3 ของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2	57
4.4.1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะในการตรวจหาไวรัสของไพรเมอร์ DENV2-NS3 (specificity)	57
4.4.2 ผลการตรวจสอบความไวต่ำสุดในการตรวจหาไวรัสของไพรเมอร์ DENV2-NS3 (sensitivity)	58
4.4.3 ผลการตรวจหาไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่บริเวณ NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วย	59
4.5 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ DENV2-NS3 โดยเทคนิค Colony PCR.....	64
4.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	66
4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ DENV2-NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วยกับฐานข้อมูล NCBI.....	72
4.8 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ	75
4.9 การตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกี โดยวิธี Real time RT-PCR.....	78
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	83
ข้อเสนอแนะ	87
รายการอ้างอิง	88
ภาคผนวก.....	93
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	94
ภาคผนวก ข ผลการทำ multiple sequence alignment บริเวณ DENV2-NS2 ในตัวอย่าง ผู้ป่วย.....	95

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 105



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers β - microglobulin.....	33
ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR (β - microglobulin).....	34
ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition).....	34
ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol) .	35
ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol)...	35
ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition).....	36
ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol)...	36
ตารางที่ 8 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition).....	37
ตารางที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้.....	38
ตารางที่ 10 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR (DENV2 - NS3).....	39
ตารางที่ 11 แสดงขั้นตอน PCR (Gradient Thermal cycles condition).....	39
ตารางที่ 12 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition).....	40
ตารางที่ 13 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา DNA ligation (pCR [®] 8/GW/TOPO [®])....	43
ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Colony PCR.....	45
ตารางที่ 15 แสดงขั้นตอน Colony PCR (Thermal cycles condition).....	45
ตารางที่ 16 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Real time RT-PCR.....	48
ตารางที่ 17 แสดงขั้นตอน Real time RT-PCR (Thermal cycles condition).....	49
ตารางที่ 18 ข้อมูลตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกีและตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA.....	51
ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพยีน β - microglobulin ในตัวอย่างผู้ป่วย.....	54
ตารางที่ 20 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยเทคนิค PCR.....	61
ตารางที่ 21 สรุปผลการตรวจหาไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยเทคนิค PCR.....	63

ตารางที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดความหลากหลายของลำดับเบสในตัวอย่างผู้ป่วย.....	67
ตารางที่ 23 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างผู้ป่วย DENV2-NS3 กับฐานข้อมูล NCBI.....	72
ตารางที่ 24 แสดงผล Identity matrix.....	77
ตารางที่ 25 แสดงผลการตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วย.....	80



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 สมาชิกไวรัสใน genus <i>Flavivirus</i>	4
รูปที่ 2 โครงสร้างสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี	5
รูปที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเดงกี	6
รูปที่ 4 สถานการณ์การระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2516-2556	7
รูปที่ 5 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี	8
รูปที่ 6 ขั้นตอนต่างๆ ของเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ	16
รูปที่ 7 การตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยสี SYBR Green I	18
รูปที่ 8 วิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยวิธีการ Dideoxy Chain Termination (Sanger)	23
รูปที่ 9 พลาสมิด pCR 8/GW/TOPO TA Cloning สำหรับ clone ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR	42
รูปที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อ DENV2 จำแนกตาม WHO criteria	52
รูปที่ 11 ผลการตรวจสอบยีน β 2- microglobulin ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	53
รูปที่ 12 ผลการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีโดยใช้ Lanciotti primers	56
รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ (Specificity) ในการตรวจหาไวรัสในตระกูล Flaviviruses	58
รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบความไวต่ำสุด (Sensitivity)	59
รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบไวรัสเดงกี DENV2-NS3 ในตัวอย่างเลือด (Plasma, PBMCs) ของผู้ป่วย	60
รูปที่ 16 ผลการตรวจสอบไวรัสเดงกี DENV2-NS3 ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย	60
รูปที่ 17 แสดงลักษณะของโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar	65
รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วน DENV2-NS3	65
รูปที่ 19 แสดงผลจากการทำ DNA Sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของ DENV2-NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วย (แสดงผลบางส่วน)	66

รูปที่ 20 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส โดยการทำให้ multiple sequence alignment ของตัวอย่าง U119	69
รูปที่ 21 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับอะมิโน โดยการทำให้ multiple sequence alignment ของตัวอย่าง U119.....	70
รูปที่ 22 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของตัวอย่างผู้ป่วยกับข้อมูลอ้างอิง.....	71
รูปที่ 23 แสดงลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างผู้ป่วย U23 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง...	71
รูปที่ 24 แสดงผลแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	76
รูปที่ 25 เส้นกราฟมาตรฐานของไวรัสแดงที่สร้างขึ้น โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.99321	78
รูปที่ 26 แสดงกราฟ amplification plot.....	79
รูปที่ 27 แสดงกราฟ melting curve analysis	79
รูปที่ 28 แสดงผลการศึกษาหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างผู้ป่วยโดยวิธี qRT-PCR	79
รูปที่ 29 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณไวรัสในตัวอย่างปัสสาวะ.....	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยมาเป็นเวลานานกว่า 50 ปี และในปัจจุบันกำลังกลายเป็นปัญหาระดับโลก เนื่องจากไวรัสเดงกีได้แพร่ระบาดเข้าไปมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลก มีประชากรมากกว่า 2500 ล้านคนที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ เนื่องจากอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาด และจากการสำรวจขององค์การอนามัยโลก พบว่าในแต่ละปีมีประชากรติดเชื้อไวรัสเดงกีประมาณ 50-100 ล้านคน และมีผู้ป่วยประมาณ 500,000 คน ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยโรคไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic fever: DHF) และมีอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีมากกว่า 5% ของพื้นที่ต่อปี [1]

เชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus; DENV) เป็นโรคในกลุ่ม emerging and reemerging infectious disease เนื่องจากกำลังระบาดไปทุกพื้นที่โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น (Tropical) และภูมิภาคกึ่งเขตร้อน (Subtropical) [2, 3] มีสายพันธุกรรมแบบ linear, single stranded RNA virus จัดอยู่ใน Family Flaviviridae, Genus *Flavivirus* แบ่งออกเป็น 4 serotypes คือ DEN1, DEN2, DEN3 และ DEN4 โครงสร้างโปรตีนของไวรัสเดงกีประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural) จำนวน 3 ตัว และโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้าง (non-structural: NS) อีก 7 ตัว เรียงลำดับต่อกันดังนี้ C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4a-NS4B-NS5 ไข้เลือดออกเป็นโรคติดต่อในคนโดยมีแมลงเป็นพาหะสำคัญ (arthropod-borne viral diseases) โดยเฉพาะยุงลาย *Aedes aegypti* และ *Ae. albopictus* [1] การติดเชื้อไวรัสเดงกีเริ่มจากคนที่ถูกยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเดงกีกัด เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) โดยวิธี receptor - mediated endocytosis แล้วเชื้อจะเพิ่มจำนวน (replication) ในเซลล์ การติดเชื้อไวรัสเดงกีจะส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติไปจากสถานะของการติดเชื้อทั่วไป โดยพบความบกพร่องทั้งในแง่ของ cellular responses และ antibody function เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์หนึ่งแล้ว จะสามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่ป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 6-12 เดือน [4] การติดเชื้อไวรัสเดงกีก่อให้เกิดกลุ่มอาการของโรคที่แสดงออกแตกต่างกัน โดยองค์การอนามัยโลกได้จำแนกกลุ่มอาการดังกล่าวของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีตามความรุนแรงของโรคจากน้อยไปมากไว้ดังนี้ คือ Undifferentiated, Dengue fever (DF) และ Dengue Hemorrhagic fever (DHF)/ Dengue Shock Syndrome (DSS) ซึ่ง

DHF/DSS จะมีการรั่วของพลาสมาออกมานอกหลอดเลือด ซึ่งอาจเกิดภาวะช็อกตามมา ส่งผลให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ [5]

ประเทศไทยเริ่มมีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 และจากข้อมูลของสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีจากอดีตถึงปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนสูงขึ้นเรื่อยๆ และล่าสุดข้อมูลการเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออก ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม – 12 สิงหาคม 2556 พบผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวน 99,452 ราย และมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อจำนวน 94 ราย และจากรายงานข้อมูลจากกลุ่มระบาดวิทยา และข่าวกรอง สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค แสดงแผนภูมิคำร้อยละของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี จำแนกตามกลุ่มอายุ ตั้งแต่ปี 2548-2554 พบว่า มีการระบาดของไวรัสเดงกีมากที่สุดในช่วงอายุ 5-24 ปี ทั้งในกลุ่มอาการ DF, DHF และ DSS [6] อุบัติการณ์การเกิดและการแพร่ระบาดของไวรัสเดงกี และ DHF นั้นเกิดจาก 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ ความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นของยุง *Ae. aegypti* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญมาสู่คน และ อัตราการแพร่ระบาด (virus transmission) โดยเฉพาะการเดินทางจากภูมิภาคหนึ่งไปสู่อีกหนึ่ง ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของไวรัสต่างชนิด (serotypes) และต่างจีโนไทป์ (genotypes) จากที่หนึ่งไปยังที่อื่นๆ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของ DF/DHF ในประเทศที่ไม่เคยมีการระบาดมาก่อน [7] จากการศึกษาในประเทศไทยพบว่า 99% ของผู้ป่วย DHF นั้นเกิดจากการติดเชื้อไวรัส 2 ครั้ง โดยการติดเชื้อในครั้งแรก (primary infection) และครั้งที่สอง (secondary infection) เป็นไวรัสต่างชนิด (serotype) กัน ซึ่งการติดเชื้อครั้งแรกด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1 และติดเชื้อซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด ความรุนแรงของโรค หรือ DHF และในการติดเชื้อไวรัสครั้งที่ 2 ด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 และ 3 นั้น จะทำให้เกิดความรุนแรงของโรคมากกว่าการติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิดอื่นๆ [8, 9]

จากการศึกษาในประเทศไทยพบว่า ความรุนแรงของโรคนี้อาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณไวรัสในระดับสูงที่พบในเลือด จากการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งที่ 2 (secondary dengue virus infection) ซึ่งส่วนใหญ่ที่พบเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 แต่มีรายงานพบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาพบการติดเชื้อด้วยไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 ซ้ำครั้งที่สอง (secondary infection) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้เกิด DHF และในปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบถึงกลไกในการทำให้เกิด DHF/DSS ที่แน่นอน แต่ทั้งนี้ก็มีผู้ตั้งทฤษฎีเพื่ออธิบายถึงสาเหตุของความรุนแรงของโรคไว้หลายทฤษฎีด้วยกัน แต่ที่กล่าวถึงกันมาก คือ immune enhancement, cross-reactive, nonneutralizing antibodies การติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสที่ต่างซีโรไทป์กันจากการติดเชื้อในครั้งแรก ทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น [10, 11] โดยแอนติบอดีจำเพาะจะจับส่วน Fc เกาะติดกับ Fc receptor บนแมคโครฟาจหรือโมโนไซต์แล้วใช้ส่วน Fab จับกับแอนติเจนบนอนุภาคไวรัสทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้นและเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับไวรัสที่เกิดขึ้นในการติดเชื้อครั้งแรก นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับความ

รุนแรงของโรค เช่น สายพันธุ์ของไวรัส ปัจจัยเสี่ยงของแต่ละบุคคล ได้แก่ อายุ เพศ ภาวะโภชนาการ การติดเชื้อซ้ำครั้งที่สอง การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการอาศัยอยู่บริเวณ แหล่งระบาดของโรค [12]

ในปัจจุบันนี้การศึกษาโรคติดเชื้อไวรัสเดงกียังไม่มี animal models ที่สามารถใช้แทนมนุษย์ได้ และยังขาดความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิสภาพในการก่อโรคหรือความรุนแรงของโรค อีกทั้งยังไม่มียา วัคซีนและการรักษาที่จำเพาะ [13] จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อใช้อธิบายให้เข้าใจถึงกลไกการก่อโรค การ फैาระวังอย่างใกล้ชิด และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ สำหรับโรคไข้เลือดออกเดงกีจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยโรคอย่างยิ่ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจยืนยันว่าการป่วยนั้นเกิดจากไวรัสเดงกีหรือไม่ และยังมีความสำคัญในแง่ของการ फैาระวังการระบาดของโรคไข้เลือดออก ซึ่งในปัจจุบันนี้การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีทางอณูชีววิทยาได้รับการยอมรับอย่างมาก เนื่องจากสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีได้ตั้งแต่วันที่ 1 - 5 นับจากที่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการ และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีได้แม้จะมีปริมาณน้อย จึงเป็นวิธีที่มีความไวและแม่นยำสูง[14, 15]

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความหลากหลายของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งเกิดขึ้นได้จาก 2 ขบวนการ คือ การเปลี่ยนแปลงชนิดของเบส (point mutation) และการแลกเปลี่ยนสาย RNA (Recombination) โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสเป็นการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ที่ผิดพลาดโดยเกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์สาย RNA ใหม่ของเชื้อไวรัส [16]

ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้ก่อให้เกิดกลุ่มเชื้อไวรัสที่คล้ายๆ กันแต่ไม่เหมือนกันทีเดียวในผู้ที่ติดเชื้อแต่ละคน เรียกลักษณะความหลากหลายเช่นนี้ว่า quasispecies [17] ส่วนการแลกเปลี่ยนสาย RNA (Recombination) นั้นพบได้ไม่บ่อย โดยอาศัยกลไกการเคลื่อนที่จากสาย RNA แม่แบบเส้นหนึ่งไปสู่เส้นที่สองในระหว่างที่เอนไซม์ทำการสังเคราะห์สาย RNA เส้นใหม่ขึ้นจากแม่แบบภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดสาย RNA โมเลกุลที่เป็นผลลัพธ์มีบางส่วนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นตามสาย RNA แม่แบบเส้นแรก ในขณะที่ส่วนอื่นตรงกับสาย RNA แม่แบบเส้นที่สอง การแลกเปลี่ยนสาย RNA แบบนี้น่าจะเกิดขึ้นในเซลล์ของคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ 2 จีโนไทป์ พร้อมกัน (Mix Infection) [18]

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีนั้น นักวิจัยส่วนใหญ่เน้นศึกษาในช่วง Structural protein ในส่วนของ Non-structural protein ยังมีการศึกษาน้อย และพบว่าในบริเวณ Non-structural 3 (NS3) ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาความหลากหลายของลำดับเบส บริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ในผู้ป่วย

1.2 คำถามของการวิจัย

1.2.1 บริเวณ NS3 สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของ DENV2 จากสิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และในช่วงเวลาที่มีการเก็บสิ่งส่งตรวจแตกต่างกันได้หรือไม่

1.2.2 ในสิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และมีการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกันนั้นมีปริมาณไวรัสเดงกีแตกต่างกันหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ DENV2 ที่บริเวณ NS3 ในสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน และในช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างแตกต่างกัน

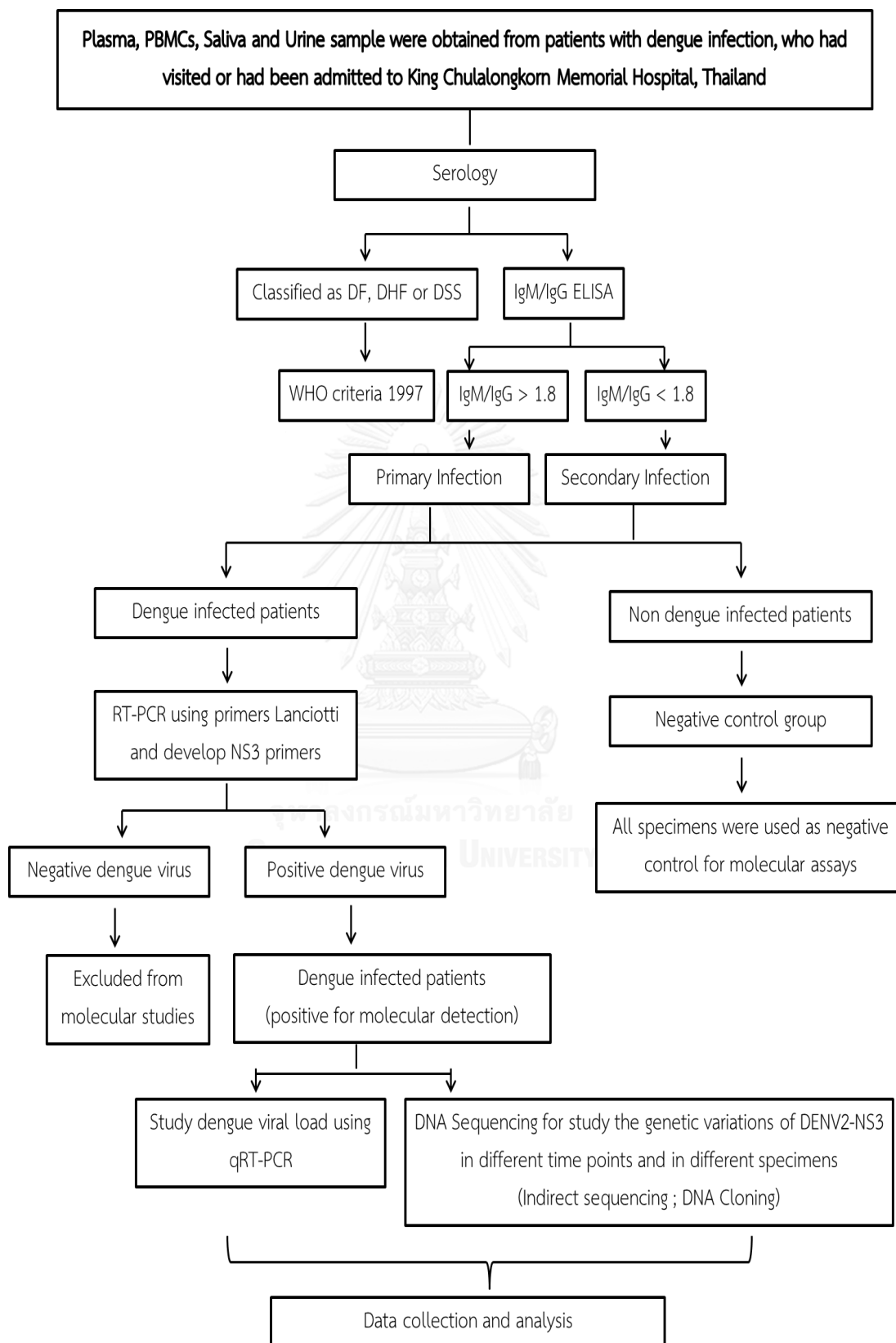
1.3.2 เพื่อศึกษาหาปริมาณไวรัสเดงกีในสิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และมีการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

1.4 สมมติฐานการวิจัย

1.4.1 สิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และเก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกันสามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของ DENV2 บริเวณ NS3 ได้

1.4.2 สิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และมีการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกันนั้น มีปริมาณไวรัสเดงกีแตกต่างกันด้วย

1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย



1.6 คำสำคัญ

Dengue virus
NS3 region
Genetic variations
Blood
Secretion

1.7 รูปแบบการวิจัย

เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study : retrospective)

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

Dengue virus : ไวรัสเดงกี เป็นเชื้อต้นเหตุก่อโรคไข้เลือดออก ที่นำโดยยุงลาย (Aedes mosquitoes) มีสารพันธุกรรมแบบ single stranded RNA virus อยู่ใน Family Flaviviridae มี 4 serotypes คือ DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4 ซึ่งมี antigen ของกลุ่มบางชนิดร่วมกัน ทางทฤษฎีการติดเชื้อเดงกีจึงมีได้ถึง 4 ครั้ง เป็นที่ยอมรับกันว่าการติดเชื้อ serotype หนึ่งแล้ว จะสามารถป้องกันการติดเชื้อ serotype นั้นได้ตลอดชีวิต แต่ป้องกันการติดเชื้อ serotype อื่น ในช่วงระยะสั้นๆ ประมาณ 6-12 เดือน

Blood specimens : ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเป็นเลือด ซึ่งเก็บมาจากผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี

Non blood (secretions) : ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือด ซึ่งเก็บมาจากผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี ได้แก่ ปัสสาวะ และน้ำลาย

Genetic variation : ความหลากหลายของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งเกิดขึ้นได้จาก 2 ขบวนการ คือ การเปลี่ยนแปลงชนิดของเบส (point mutation) และการแลกเปลี่ยนสาย RNA (Recombination)

Clade :	กลุ่มที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน
Out group :	สิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกับโดยมีต้นกำเนิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน แต่เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการแยกออกจากสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่ทำการศึกษา
Phylogenetic tree :	แผนภูมิวิวัฒนาการ หรือ แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ เป็นการศึกษความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นกลุ่มต่างๆ จากลักษณะทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลทางชีวโมเลกุล เช่น การศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ หรือโปรตีนที่นำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้แผนภูมิวิวัฒนาการ
Bootstrap test :	การทดสอบความเชื่อมั่นทางสถิติของกลุ่มสิ่งมีชีวิตในแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธีการสุ่มข้อมูลซ้ำ (resampling) จากข้อมูลเริ่มต้นหลายๆ ครั้ง ซึ่งจะทำให้การสุ่มซ้ำ 100 ครั้ง ถึง 1,000 ครั้ง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.9.1 สามารถทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมและปริมาณไวรัสในแต่ละตัวอย่าง ที่เก็บในช่วงเวลาแตกต่างกัน เพื่อเป็นฐานข้อมูลของเดงกีไวรัสที่พบในประเทศไทย สามารถใช้ศึกษาต่อไปในอนาคตได้

1.9.2 การทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสเดงกี การตรวจวินิจฉัย และการพัฒนาวัคซีน เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้

1.9.3 ได้องค์ความรู้ที่เกิดจากการศึกษาโครงสร้างและกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี รวมถึงความหลากหลายทางวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสเดงกี และกลไกการหลบหลีกของเชื้อไวรัสต่อการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

1.10.1 เนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา เป็นสิ่งส่งตรวจที่เหลือจากโครงการวิจัยในห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์นายแพทย์วันลา กุลวิจิต จึงมีปริมาณตัวอย่างจำกัด ประเภทของสิ่งส่งตรวจบางชนิดถูกใช้แล้วหมดไป จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ในระหว่างกลุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยคนเดียวกัน

1.10.2 เนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา เป็นสิ่งส่งตรวจที่เหลือจากโครงการวิจัยอื่นในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างมานานแล้ว ประกอบกับเชื้อไวรัสเดงกี มีสารพันธุกรรมเป็น RNA virus จึงง่ายต่อการถูกทำลาย (RNA degradation) และเกิดปนเปื้อนได้ง่าย

1.10.3 ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยแต่ละวัน อาจมีการคลาดเคลื่อนได้

1.11 ข้อพิจารณาทางด้านจริยธรรม

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 188/57, COA No. 354/2014)

ในงานวิจัยนี้ได้ยึดหลักจริยธรรมการทำวิจัยในคน คือ

1.11.1 หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนจนผู้ที่ได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการวิจัยเข้าใจเป็นอย่างดี และตัดสินใจอย่างอิสระในการยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของอาสาสมัครโดยไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวอาสาสมัครส่วนการใช้เลือด และปัสสาวะที่เก็บไว้ของโครงการ 357/49 ซึ่งเป็นโครงการวิจัยของ นพ.วันลา กุลวิจิต เก็บไว้ที่ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์โรคติดเชื้อแห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้วิจัยไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วย จึงจะขอยกเว้นการขอยินยอมจากผู้ป่วย / ผู้ได้รับเชิญให้เข้าร่วมการวิจัย ทั้งนี้ผู้วิจัยได้รับอนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์แล้ว

1.11.2 หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะไม่ได้รับประโยชน์ และความเสียหายจากอันตรายใดๆ จากการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากเป็นสิ่งส่งตรวจเหลือใช้จากโครงการเก่า ไม่ได้ติดต่อเพื่อขอเก็บตัวอย่างใหม่เพิ่มเติมจากอาสาสมัครโดยตรง

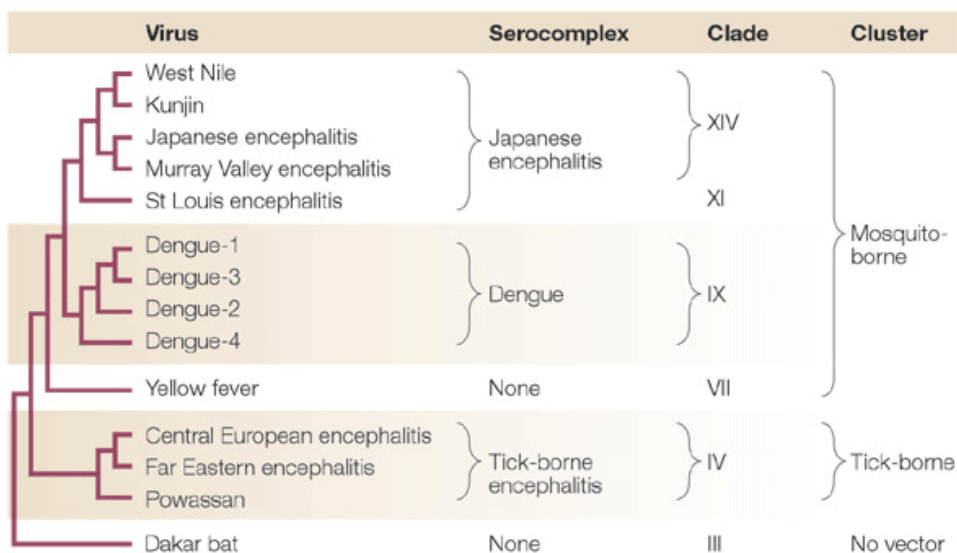
1.11.3 หลักความยุติธรรม (Justice) คือ มีเกณฑ์การคัดเลือกและออกที่ชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน และไม่มีการแสวงหาผลประโยชน์จากการทำวิจัยในกลุ่มคน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

เชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus, DENV) เป็น RNA virus จัดอยู่ใน genus *Flavivirus* ภายใน family *Flaviviridae* [19] อนุภาครูปทรงกลม ส่วนเปลือกหุ้ม (envelope) ประกอบด้วยเยื่อไขมัน (lipid bilayer) และโปรตีนสองชนิด คือ E และ prM ยื่นออกด้านนอกของอนุภาค ภายในส่วนแกนกลาง (core, nucleocapsid) ซึ่งอยู่ถัดเข้ามาจากเนื้อเยื่อไขมัน ประกอบด้วยโปรตีน C และสาย RNA ซึ่งเป็น RNA สายเดี่ยวยาวประมาณ 10.7 kb โดยโปรตีน E และ C มีการเรียงตัวในลักษณะที่ก่อให้เกิดสมมาตรแบบ icosahedral symmetry [20] genus *Flavivirus* มีไวรัสสมาชิกอีกประมาณ 70 ชนิด ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับเชื้อ dengue virus สมาชิกเหล่านี้รวมถึงเชื้อไวรัสที่ก่อโรครุนแรง และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, Murray Valley encephalitis virus, tick-borne encephalitis virus เป็นต้น [21]

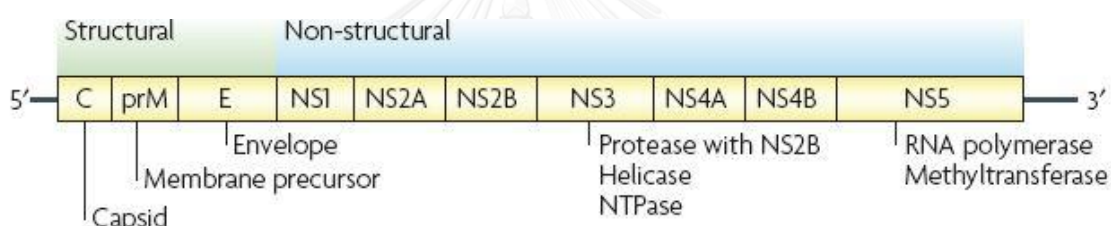


รูปที่ 1 สมาชิกไวรัสใน genus *Flavivirus*

(ที่มา: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n1/fig_tab/nrmicro1067_F1.html)

2.2 ไวรัสเดงกี (Dengue Virus)

เชื้อไวรัสเดงกีมีสารพันธุกรรมเป็นแบบ positive single stranded RNA virus อนุภาครูปทรงกลม 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 ดังแสดงในรูปที่ 2 เชื้อไวรัสเดงกีสามารถแบ่งได้เป็น 4 ซีโรไทป์ คือ ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 (DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4) เมื่อมีการติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งในครั้งแรก (primary infection) แล้วนั้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่สามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น การติดเชื้อครั้งที่สอง (secondary infection) ด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรกผู้ป่วยมักมีการแสดงออกของโรคที่รุนแรง

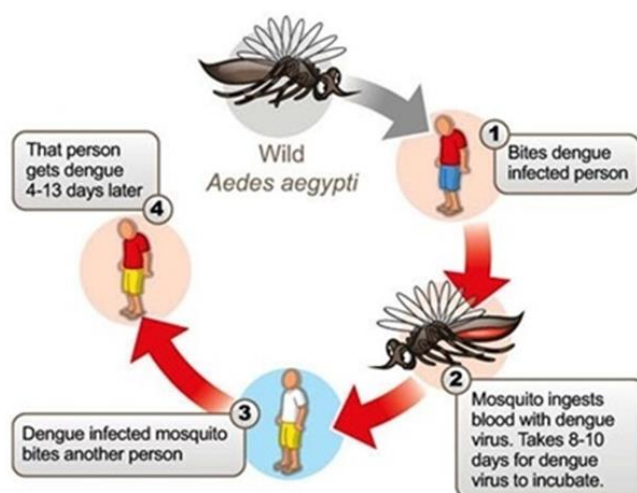


รูปที่ 2 โครงสร้างสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี

(ที่มา: <http://www.nature.com/cuml1.md.chula.ac.th/nrmicro/journal/v5/n7/pdf/nrmicro1690.pdf>)

เชื้อไวรัสเดงกีมีพาหะนำโรคสำคัญ คือ ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และ ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) เชื้อไวรัสเดงกีมีระยะฟักตัวในยุงประมาณ 8-10 วัน เชื้อไวรัสเดงกีจะเข้าสู่กระเพาะยุงและเพิ่มจำนวนมากขึ้น แล้วเคลื่อนที่เข้ามาอาศัยอยู่บริเวณต่อมน้ำลายของยุงเพศเมีย เมื่อยุงลายดูดกินเลือดคนหรือสัตว์จะปล่อยเชื้อเข้าสู่คนหรือสัตว์ได้ เชื้อไวรัสเดงกีจะมีระยะฟักตัวในคนประมาณ 3-5 วัน โดยไวรัสจะเข้าไปเจริญในร่างกายนผู้ป่วยและออกมาในกระแสเลือด ทำให้ผู้ป่วยมีไข้สูง ระยะไข้ประมาณ 2-7 วัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีเชื้อไวรัสอยู่ในเลือดไม่เกิน 7 วัน นับตั้งแต่เริ่มมีไข้ [15] จากนั้นผู้ป่วยจะเริ่มสร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายไวรัสในกระแสเลือด เมื่อไวรัสถูกทำลายและหมดไปจากร่างกาย ไข้จะลดลงด้วย ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีอาจมีอาการแตกต่างกัน เช่น ไม่แสดงอาการป่วย (asymptomatic) หรือมีอาการป่วย เช่น มีไข้แต่ไม่แสดงอาการเลือดออกเรียกว่า dengue fever (DF) หรือมีอาการเลือดออกและมีการรั่วซึมของพลาสมาออกนอกหลอดเลือด เรียกว่า

dengue hemorrhagic fever (DHF) และผู้ป่วยบางรายอาจมีภาวะช็อกร่วมด้วย เรียกว่า dengue shock syndrome (DSS) ซึ่งอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ [1]



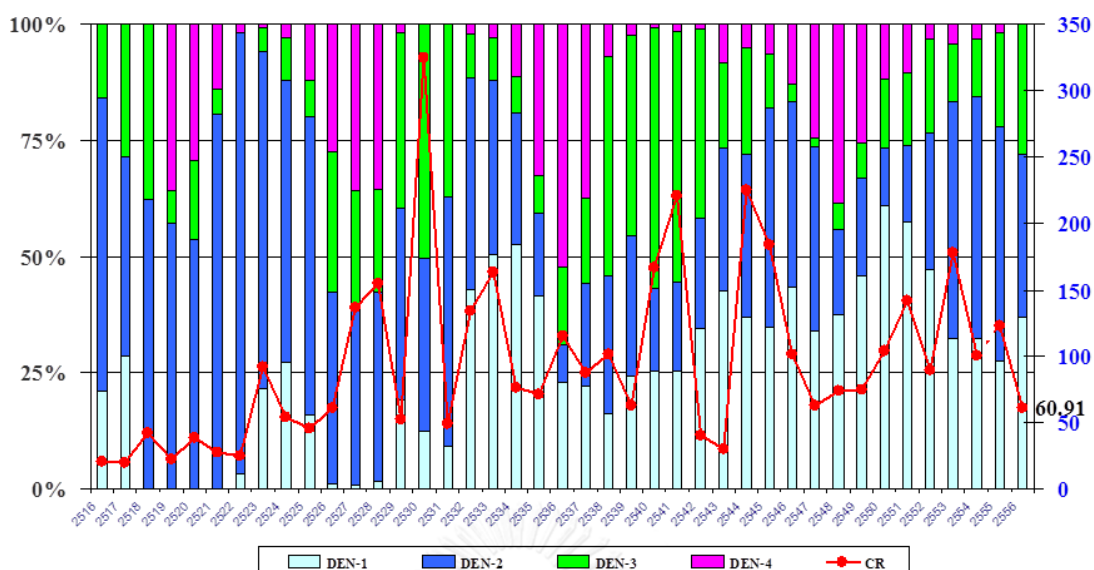
รูปที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเดงกี

(ที่มา: http://www.medicinemcq.com/index.php/journals/sub_details/86/19%20/DENGUE-FEVER)

2.3 ระบาดวิทยา (Epidemiology of DENV infection)

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกีมีรายงานพบมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนและเขตร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทยด้วย ประชากรมากกว่า 2,500 ล้านคนอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาด องค์การอนามัยโลกได้ทำการสำรวจและพบว่าประชากรทั่วโลก 50-100 ล้านคน ได้รับเชื้อไวรัสเดงกี โดยมีผู้ป่วย 250,000-500,000 คน ที่ป่วยเป็น Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) และมีผู้เสียชีวิต 24,000 รายในแต่ละปี ปัจจุบันโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีจึงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก

สำหรับสถานการณ์การระบาดของไวรัสเดงกีในประเทศไทย พบผู้ป่วยได้ตลอดทั้งปี แต่จะพบผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคมของทุกปี จากรายงานข้อมูลของกลุ่มระบาดวิทยาและข่าวกรอง สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค พบว่า มีการระบาดของไวรัสเดงกีจำแนกตามกลุ่มอายุ ตั้งแต่ปี 2548-2554 พบการระบาดมากที่สุดในช่วงอายุ 5-24 ปี ทั้งในกลุ่มอาการ DF, DHF และ DSS และจากรายงานย้อนหลังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2516-2556 โดยสำนักโรคติดต่อฯ กรมควบคุมโรค พบว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 แต่ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2556 มีการรายงานการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 1 เพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งนี้ไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ยังคงพบการติดเชื้อมากเช่นเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 สถานการณ์การระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2516-2556
(ที่มา: ข้อมูลรายงาน 506 สำนักโรคพิษวิทยา กรมควบคุมโรค ณ วันที่ 4 มิถุนายน 2556)

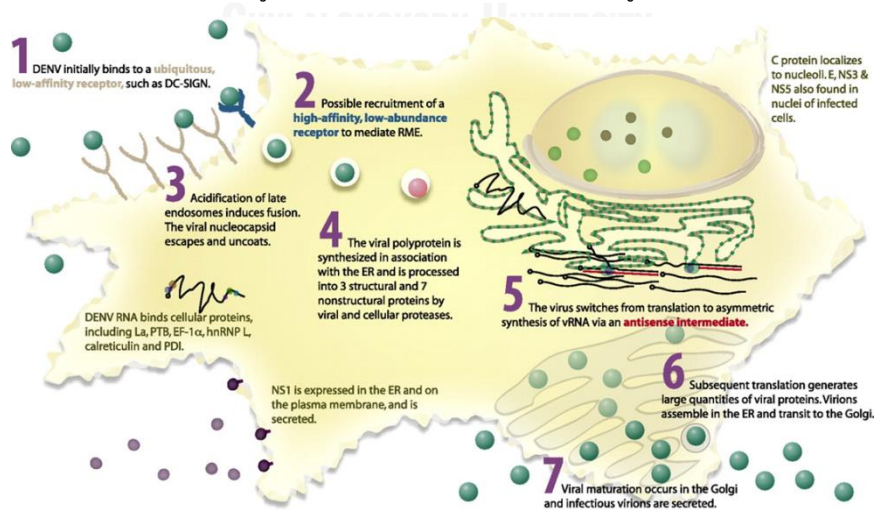
2.4 พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกี (Pathogenesis of Dengue Virus Infection)

พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออกเดงกีก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การติดเชื้อไวรัสต่างๆ ไปนั้น ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ภายในร่างกายมนุษย์จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำครั้งที่สอง แต่โรคไข้เลือดออกเดงกีก็มีความแตกต่างออกไป คือ เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรกผู้ป่วยอาจไม่มีอาการแสดงออกของโรคหรืออาจมีอาการแสดงออกของโรคเหมือนการติดเชื้อไวรัสต่างๆ ไป แต่จะมีอาการแสดงออกของโรคที่รุนแรงที่ชัดเจนเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำครั้งที่สองด้วยเชื้อไวรัสเดงกีที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งแรก ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไม่สามารถยับยั้ง (neutralize) เชื้อไวรัสได้ แต่กลับไปส่งเสริมให้มีการเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เป้าหมายมากขึ้น เรียกว่าเป็นการเกิด antibody dependent enhancement (ADE) เมื่อมีการติดเชื้อซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งในครั้งแรกแล้วนั้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์นั้นได้ตลอดชีวิต แต่ป้องกันการติดเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ จึงทำให้การติดเชื้อซ้ำครั้งที่สองด้วยซีโรไทป์ที่แตกต่างจากครั้งแรกผู้ป่วยมักมีอาการแสดงออกของโรคที่รุนแรง นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคนั้นยังเป็นผลมาจากปัจจัยอื่น เช่น จำนวนของไวรัส (Viral load) พบว่าปริมาณของไวรัสนั้นมีผลต่อเซลล์เป้าหมายโดยตรง สืบเนื่องมาจากปริมาณไวรัสที่มากทำให้สามารถติดเชื้อต่อเซลล์เป้าหมายได้มาก จึงส่งผลให้มีการแสดงอาการรุนแรงได้ชัดเจนขึ้น จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสเดงกีในเลือดมาก ไม่ว่าจะในระยะไข้หรือระยะที่ไข้หายแล้วมีแนวโน้มที่จะมีอาการรุนแรงกว่าผู้ที่มีปริมาณเชื้อไวรัสในเลือดน้อยกว่า อีกทั้งสายพันธุ์ของไวรัส

(Viral strain) มีผลต่อความรุนแรงของอาการ โดยมีการศึกษาพบว่า การติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์อาจทำให้ความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน การติดเชื้อซ้ำครั้งที่สองโดยเฉพาะด้วยซีโรไทป์ 2 มักทำให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรงมาก [22] รวมไปถึงปัจจัยจากผู้รับเชื้อ เช่น อายุ เพศ โรคประจำตัว ภาวะโภชนาการ และลักษณะทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล [23] มีการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ต่างๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปี ในอดีตเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 มีบทบาทสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคในประเทศไทย แต่ในระยะหลังพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 3 เพิ่มมากขึ้น และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงเพิ่มขึ้น

2.5 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue Virus Replication)

วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเดงกีเริ่มจากการที่เชื้อไวรัสเดงกีสามารถจับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์เป้าหมาย แล้วกระตุ้นให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการที่เรียกว่า Receptor-mediated endocytosis (RME) โดยจะเกิดการสร้าง endosome ในเซลล์ซึ่งภายใน endosome มีสถานะเป็นกรดซึ่งมีคุณสมบัติเป็น viral fusion protien ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ E โปรตีนเป็นผลให้ RNA ของไวรัสหลุดออกจาก envelop (uncoat) จากนั้น RNA (replication) ของไวรัสจะเริ่มสร้างโปรตีนต่างๆ (translation) ที่บริเวณ ER-derived membrane และจะหยุดสร้างโปรตีนเมื่อมีการสร้างสาย RNA ของไวรัส โปรตีนและสาย RNA ที่สร้างขึ้นจะประกอบตัวกัน (assembly) ที่ Endoplasmic Reticulum (ER) แล้วเคลื่อนต่อไปที่ Golgi compartment เพื่อให้การประกอบตัวสมบูรณ์และไวรัสมีสภาพเป็นตัวเต็มวัย (mature form) ดังในรูปที่ 5 แล้วเซลล์เป้าหมายนี้จะปล่อยไวรัสที่เกิดใหม่และมีความสมบูรณ์ออกจากเซลล์เดิมกระจายไปสู่เซลล์เป้าหมายเซลล์อื่นๆ ต่อไป [23]



รูปที่ 5 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี

(ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cuml1.md.chula.ac.th/pmc/articles/PMC1642597/figure/f1/>)

2.6 ลักษณะอาการทางคลินิก (Clinical Manifestations)

การติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้นก่อให้เกิดอาการจำแนกตามความรุนแรง แบ่งตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกได้ 2 กลุ่ม คือ 1. ผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ไม่แสดงอาการของโรค (asymptomatic) และ 2. ผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแล้วผู้ป่วยจะมีอาการแสดงออกของโรค (symptomatic) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย คือ 1.) อาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (undifferentiated febrile illness) ผู้ป่วยมักมีอาการไข้สูงเฉียบพลันเพียงอย่างเดียว อาการจะเหมือนการติดเชื้อไวรัสทั่วไป แสดงอาการประมาณ 2-3 วัน อาการมักจะหายไปเอง 2.) ไข้เดงกี (Dengue fever) ผู้ป่วยมักมีอาการไข้สูง อาจมีการลดต่ำลงแล้วกลับมาสูงขึ้นอีกครั้ง ร่วมกับอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามข้อและกระดูก กระบอกตา กล้ามเนื้อต่างๆ ตามร่างกาย อาจมีผื่นและจุดเลือดออกบริเวณผิวหนัง การทดสอบ Tourniquet test ให้ผลบวก โดยทั่วไปผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีอาการไม่รุนแรง แสดงอาการประมาณ 5-7 วัน แล้วจึงหายเป็นปกติ 3.) ไข้เลือดออกเดงกี (Dengue hemorrhagic fever) พบอาการลักษณะเดียวกับไข้เดงกี (Dengue fever) แต่รุนแรงกว่ามาก ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีลักษณะอาการที่ชัดเจนคือ มีไข้สูงลอยร่วมกับอาการเลือดออก เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการจะพบว่ามีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำลง มีอาการตับโต และมีการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด ซึ่งถ้าพลาสมารั่วออกไปมากผู้ป่วยจะมีภาวะช็อกเกิดขึ้น เรียกว่า Dengue shock syndrome (DSS) การรั่วของพลาสมาสามารถตรวจพบได้จากการที่มีระดับ Hematocrit สูงขึ้น มีน้ำในเยื่อหุ้มช่องปอดและช่องท้อง ถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาไม่ทันจะเป็นอันตรายถึงตายได้ [1, 24]

ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีส่วนใหญ่มักไม่มีอาการ (asymptomatic) โดยพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ไม่มีอาการถึงร้อยละ 90 ของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งหมด ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีแล้วมีอาการแสดงออก (symptomatic) จะมีการดำเนินโรคเป็น 3 ระยะ คือ ระยะไข้ (Febrile phase) ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงเกิน 38.5°C นาน 2-7 วัน ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาจปวดท้องบริเวณลิ้นปี่หรือใต้ชายโครงด้านขวาเนื่องมาจากตับโต บางรายอาจมีอาการชก พบอาการหน้าแดง จุดเลือดออกบริเวณผิวหนัง อาจพบผื่นแบบ maculopapular ระยะวิกฤติ (Critical phase) ไข้มักจะลดลงอย่างรวดเร็ว ลักษณะสำคัญคือ จะพบการรั่วของพลาสมาจำนวนมากไปยังช่องปอดและช่องท้องจนทำให้เกิดภาวะช็อกในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง Dengue shock syndrome (DSS) ผู้ป่วยจะมีอาการกระสับกระส่าย ซีฟจรเบาลง ความดันโลหิตต่ำและแคบกว่า 20 มม.ปรอท (ความรุนแรงของโรคแบ่งได้เป็น 4 เกรด โดยจำแนกตามการเลือดออกและภาวะช็อก คือ เกรด 1 หมายถึงไม่พบอาการเลือดออก การทดสอบ Tourniquet test ให้ผลบวก เกรด 2 หมายถึงมีอาการเลือดออก เกรด 3 หมายถึงมีซีฟจรเบา ความดันโลหิตต่ำและแคบ เกรด 4 หมายถึงวัดความดันโลหิตไม่ได้) และระยะพักฟื้น (Recovery phase)

เกิดค่อนข้างเร็ว ผู้ป่วยมีอาการทั่วไปดีขึ้น เป็นระยะที่มีการดูดกลับของพลาสมาเข้ากระแสโลหิต อาจพบผื่น convalescent rash ในช่วงท้าย ซึ่งมักมีอาการคัน [1, 23]

2.7 การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมในสิ่งส่งตรวจเลือดและไม่ใช้เลือด (Laboratory Diagnosis)

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการมี 3 วิธีการหลักๆ คือ การแยกเชื้อไวรัส การตรวจหาสารพันธุกรรม (RNA) ของไวรัส และการตรวจหาภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส โดยในที่นี่จะพูดถึงเฉพาะวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรม (RNA) ของไวรัส คือการทำ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะสูง สามารถแยกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสได้ และเป็นวิธีการที่รวดเร็ว สามารถทราบผลได้ภายใน 3-4 ชั่วโมง แต่วิธีนี้ก็มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถบอกได้ว่าไวรัสที่ตรวจพบเป็นไวรัสที่ยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ [15]

การตรวจหาสารพันธุกรรม (RNA) ของไวรัสเดงกี ส่วนใหญ่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด ซึ่งได้แก่ Plasma, Serum, Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และ platelets ในระหว่างที่ผู้ป่วยกำลังติดเชื้อหรืออยู่ในภาวะไข้ [14] โดยไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในกระแสเลือดจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อส่วนใหญ่ จะตรวจพบได้ 5 วันภายหลังจากที่ติดเชื้อ หลังจากนั้นไวรัสในกระแสเลือดจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [25]

ปี ค.ศ. 1996 Yenichitsomanus และคณะ ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีบริเวณ E และ NS1 เพื่อตรวจหาไวรัสเดงกีในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออก และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ยูง (C6/36) พบว่าสามารถตรวจหาไวรัสเดงกีได้จำเพาะและมีความไวซึ่งสามารถตรวจพบไวรัสปริมาณน้อยที่สุดประมาณ 1 PFU/ml [26]

ปี ค.ศ. 1998 Harris และคณะ ทำการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ Multiplex RT-PCR ให้สามารถ ตรวจจำแนกไวรัสเดงกีพร้อมกันได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ภายในหลอดเดียวกันได้ พบว่าสามารถตรวจแยกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้อย่างจำเพาะและมีความไวที่ไวรัสปริมาณ 1-50 PFU/ml [27]

ปี ค.ศ. 2000 Wang และคณะ ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีที่ได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน พบว่า ปริมาณของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในสิ่งส่งตรวจที่เก็บในช่วงแรกของการมีไข้ (acute phase) มีปริมาณเชื้อไวรัสมากกว่าสิ่งส่งตรวจที่เก็บในช่วงระยะเวลาที่ไข้เริ่มลดลง หรือหลังจากมีไข้ไปแล้ว (convalescent) อย่างมีนัยสำคัญ คือ 73.2% และ 20.0% ตามลำดับ [25]

ปี ค.ศ. 2002 Kulwichit และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบเฉียบพลัน ซึ่งตรวจพบ RNA ของไวรัสเดงกีได้ทั้งในระยะท้าย

ของการมีไข้และระยะหลังจากไข้ลดลง [28] และในปี ค.ศ. 2003 คณะผู้วิจัยเดียวกันได้รายงานการ
ใช้วิธี RT-PCR ตรวจสอบเชื้อไวรัสเดงกีในพลาสมา เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (PBMCs) และ
ปัสสาวะที่เก็บจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและยืนยันทาง serology ว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยเก็บ
ตัวอย่างในระยะท้ายของไข้และหลังไข้ลดลงจำนวน 55 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม
(negative control) จำนวน 18 ตัวอย่าง พบว่าการตรวจพลาสมาให้ผลบวกร้อยละ 85.7 และ 87.5
ในระยะท้ายของไข้และหลังไข้ลดลงตามลำดับ การตรวจเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดให้ผลบวกร้อยละ
92.3 และ 87.5 ในระยะท้ายของไข้และหลังไข้ลดลงตามลำดับ และการตรวจปัสสาวะให้ผลบวก
ร้อยละ 76.9 และ 85.7 ในระยะท้ายของไข้และหลังไข้ลดลงตามลำดับ [29]

ปี ค.ศ. 2005 Tonry และคณะ รายงานกรณีศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ West Nile virus โดย
นำตัวอย่างผู้ป่วยที่เป็นซีรัมและปัสสาวะที่เก็บวันที่ 8 หลังจากมีอาการป่วย นำมาเพาะเชื้อในเซลล์
เพาะเลี้ยง และนำไปตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบว่าตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะให้
ผลบวก แต่ในซีรัมให้ผลลบ [30] และในปีเดียวกันนี้ Tonry และคณะ ได้ทดลองฉีดเชื้อ West Nile
virus เข้าไปในหนู Golden hamster พบว่ามีการติดเชื้อแบบเรื้อรังในปัสสาวะ ซึ่งสามารถตรวจหา
ปริมาณเชื้อ West Nile virus โดยวิธี plaque assay สามารถตรวจพบได้เป็นระยะเวลาจนถึง 52
วัน [31]

ปี ค.ศ. 2007 Yingsiwaphat และคณะ ได้ทำการทดลองโดยนำปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับการ
การวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกีมาเพาะเลี้ยงในยุง *Ae. aegypti* พบว่าปัสสาวะในระยะท้ายของไข้
และหลังไข้ลดลงสามารถพบไวรัสที่มีชีวิตได้ และมีปัสสาวะของผู้ป่วย 1 รายที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ
ขึ้นหลังจากไข้ลดลงแล้ว 14 วัน [32]

2.8 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกี (Genetic variation of DENV)

เชื้อไวรัสที่มีสายพันธุกรรมเป็น RNA ส่วนใหญ่มีความหลากหลายสูงทั้งในด้านโครงสร้าง
และคุณสมบัติทางชีววิทยา ความหลากหลายของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี เกิดขึ้นได้จาก 2
ขบวนการ คือ การเปลี่ยนแปลงชนิดของเบส (point mutation) และการแลกเปลี่ยนสาย RNA
(Recombination) โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบส (point mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงของ
สายพันธุกรรมที่เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ที่ผิดพลาดโดยเกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์
สาย RNA ใหม่ของเชื้อไวรัส [16] ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้ก่อให้เกิดกลุ่มเชื้อไวรัสที่คล้ายๆ กันแต่ไม่
เหมือนกันทีเดียวในผู้ที่ติดเชื้อแต่ละคน เรียกลักษณะความหลากหลายเช่นนี้ว่า quasispecies [17]
ส่วนการแลกเปลี่ยนสาย RNA (Recombination) นั้นพบได้ไม่บ่อย โดยอาศัยกลไกการโยกย้ายตัวเอง

จากสาย RNA แม่แบบเส้นหนึ่งไปสู่เส้นที่สองในระหว่างที่เอนไซม์ทำการสังเคราะห์สาย RNA เส้นใหม่ขึ้นจากแม่แบบภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดสาย RNA โมเลกุลที่เป็นผลลัพธ์ที่มีบางส่วนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นตามสาย RNA แม่แบบเส้นแรก ในขณะที่ส่วนอื่นตรงกับสาย RNA แม่แบบเส้นที่สอง การแลกเปลี่ยนสาย RNA แบบนี้น่าจะเกิดขึ้นในเซลล์ของคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ 2 จีโนไทป์พร้อมกัน (Mix Infection) [18]

ปี ค.ศ. 2003 Chen และคณะ ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 บริเวณ E/NS1 ใน mammalian cell line (Vero cells) และ mosquito cell line (C6/36 cells) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อจำนวนครั้งในการ passaged เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าวนี้จะมีความสัมพันธ์กับการเกิด quasispecies population แต่จะเกิดขึ้นใน mammalian cell มากกว่าใน insect cell [33]

ปี ค.ศ. 2005 Ding และคณะ ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ West Nile virus โดยทำการติดเชื้อในหนูแฮมสเตอร์ แล้วเก็บปัสสาวะของหนูมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง E, NS1, NS2B, NS5 และ 3'NTR และเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง E, NS1, NS2B และ NS5 [34]

ปัจจุบันการศึกษาคความหลากหลายทางสายพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ส่วนใหญ่เน้นศึกษาในช่วง Structural protein ในส่วนของ Non-structural protein ยังมีการศึกษาน้อย และพบว่าในบริเวณ NS3 ยังไม่มีการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกีดังกล่าว

2.9 คุณสมบัติของโปรตีน NS3

โปรตีน NS3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 618 ตัว และมีขนาดประมาณ 69 kDa พบในไซโตพลาสซึมบริเวณรอบๆ นิวเคลียส [35] เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส โดยสามารถทำงานได้หลายหน้าที่ คือ เป็นเอนไซม์ serine protease, RNA helicase, RNA-stimulated nucleoside 5'- triphosphatase (NTPase) และ RNA 5'- triphosphatase (RTPase) [36] โครงสร้างสามมิติของโปรตีน NS3 มีลักษณะโดยรวมคล้ายกับเอนไซม์ serine protease ชนิดอื่น และเอนไซม์ NS3-NS4 ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ C ส่วนปลาย N-terminus และ C-terminus ของโปรตีน NS3 ทำหน้าที่แตกต่างกัน ในส่วน N-terminus กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 1-167 จับกับโปรตีน NS2B และทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ serine protease โดยที่มี catalytic triad อยู่ที่ตำแหน่ง His51, Asp75 และ Ser135 เอนไซม์ NS2A-NS3 protease ทำหน้าที่ตัด polyprotein ของไวรัส ที่บริเวณส่วนต่อระหว่าง NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A และ NS4B-NS5

นอกจากนี้ยังตัดโปรตีน C เพื่อให้ได้ mature C และตัดภายในโมเลกุลโปรตีน NS4, โปรตีน NS2A และโปรตีน NS3 อีกด้วย [37]

การทำงานของเอนไซม์ NS2B-NS3 protease ค่อนข้างจำเพาะ มักตัดหลังบริเวณที่มีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกสองตำแหน่งติดกัน เช่น Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Lys, Arg-Arg รวมไปถึง Glu-Arg ด้วย กรดอะมิโนที่อยู่หลังต่อจุดตัดมักมีขนาดเล็กและไม่มีประจุ เช่น Ser, Ala หรือ ใดๆก็ตาม เอนไซม์ NS2A-NS3 protease ไม่ได้ตัดทุกตำแหน่งในโปรตีนขนาดยาวที่มีลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าว

ด้านปลาย C-terminus ตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 171-618 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RNA helicase, RNA triphosphatase (RTPase) และ RNA-Stimulated nucleotide triphosphatase (NTPase) โครงสร้างสามมิติของส่วนที่เป็นเอนไซม์ helicase/NTPase มีลักษณะคล้ายกับส่วนย่อย helicase ของเอนไซม์ที่พบในเชื้อไวรัสตับอักเสบบี C และเชื้อไวรัสไข้เหลือง โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ domain I (ตำแหน่ง 181-326), domain II (ตำแหน่ง 326-481) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกัน, domain III (ตำแหน่ง 482-618) ส่วนที่เป็น active site ของเอนไซม์ NTPase และ RTPase อยู่ในบริเวณเดียวกันที่ร่องตรงกลางระหว่าง domain I และ domain II ซึ่ง nucleoside triphosphate (NTP) จะเข้ามาจับและถูกสลายโดยการตัดเอาหมู่ฟอสเฟตด้านนอกสุดออกไป บริเวณตรงกลางของโมเลกุลมีช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่าง domain III และ domain I-II ขนาดของช่องนี้ใหญ่มากพอที่จะรับกรดนิวคลีอิกสายเดี่ยวยาวประมาณ 6 เบสต่อกัน บริเวณนี้จะเป็นเอนไซม์ helicase ซึ่งทำหน้าที่คลายเกลียวโมเลกุล RNA สายคู่ออกเป็น RNA สายเดี่ยว [38]

ในระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรม NS3 จะจับกับ NS5 ส่งผลให้การทำงานของ NTPase และ RTPase สูงขึ้น [37] NTPase ทำหน้าที่สลาย nucleoside triphosphate เพื่อสร้างพลังงานให้ helicase นำไปใช้ในการคลายเกลียวของสาย RNA และสังเคราะห์สาย RNA เส้นใหม่ ในขณะที่เอนไซม์ RTPase ร่วมกับเอนไซม์ guanylyltransferase จากเซลล์ที่ติดเชื้อ ทำหน้าที่ในการเติม cap เข้าที่ปลาย 5' ของ RNA ที่สังเคราะห์ใหม่

นอกจากการทำหน้าที่ของโปรตีน NS3 ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสาย RNA และการตัด polyprotein แล้ว โปรตีน NS3 อาจมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงของผนัง endoplasmic reticulum และ Golgi apparatus ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ เนื่องจากพบว่าโปรตีน NS3 สามารถจับกับโปรตีน nuclear receptor binding protein, microtubules และ tumor susceptibility gene 101 protein [39]

และนอกจากนี้ NS3 ยังมี epitope ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ cytotoxic T cell response [40] และชักนำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ [41]

ปี ค.ศ. 2010 Duangchinda และคณะ ทำการศึกษาโครงสร้างโปรตีนของไวรัสเดงกีที่มีความสัมพันธ์ต่อกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ T cell responses ซึ่งมีผลต่อความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วย Dengue fever (DF) และ Dengue Hemorrhagic fever (DHF) พบว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ T cell responses ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 2 แบบ ตอบสนองต่อโครงสร้างโปรตีนบริเวณ NS3 มากที่สุด โดยดูจากการสร้าง cytokine คือ IFN- γ และ TNF- α พบว่าบริเวณ NS3 มีค่าสูงกว่าโครงสร้างโปรตีนบริเวณอื่น และการตอบสนองต่อ T cell ของ NS3 นั้นยังมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคด้วย โดยดูจาก DHF กับ DF ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [42]

ปี ค.ศ. 2012 Malavige และคณะ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสเดงกีบริเวณ NS3 specific ต่อ T cells, cytokine และ chemokine levels ที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคในกลุ่มผู้ป่วย DHF จำนวน 112 ราย พบว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบรุนแรง (DHF) จะมีระดับการหลั่ง T cells ต่ำ แต่ในบริเวณ DV-NS3 specific T cells persisted จะมีระดับของ IFN- γ สูง [43]

2.10 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์

2.10.1 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) ถูกคิดค้นโดย Dr. Kary B. Mullis ในปี ค.ศ. 1983 ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์นี้เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้หลักการพื้นฐานของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต (replication) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้องอาศัยโปรตีนหลายชนิด โดยดีเอ็นเอต้องถูกแยกออกจากกัน (unwound) และดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละเส้นจะทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่โดยอาศัยการจับคู่ของเบสตามหลักของ Watson-Crick

พีซีอาร์อาศัยหลักการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติแต่เป็นการทำในหลอดทดลอง โดยเป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการโดยอาศัยโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ หรือไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดขอบเขตหรือขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ดังนั้นในการทำพีซีอาร์จึงจำเป็นต้อง

ทราบลำดับดีเอ็นเอตรงขอบเขตที่ต้องการเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่เกิดขึ้นได้โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) ซึ่งประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP

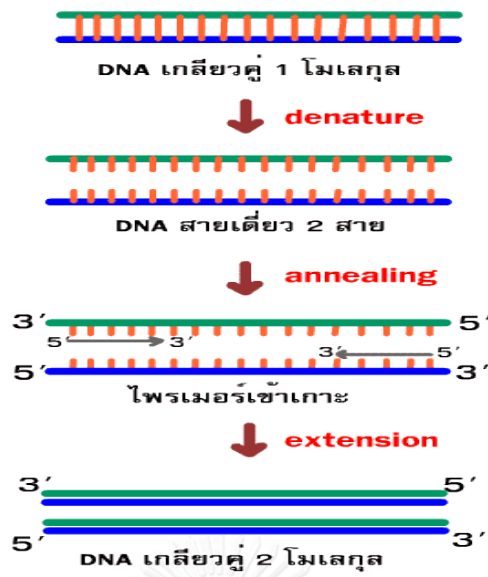
ในการทำพีซีอาร์นั้นเริ่มจากการผสมสารละลายที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template), dNTPs, ไพรเมอร์, เอนไซม์ DNA polymerase, และบัฟเฟอร์ (ในกรณีที่ เป็น RNA จะต้องมีเอนไซม์ Reverse transcriptase ด้วย) ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปใส่เครื่อง thermal cycler ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถตั้งโปรแกรมเพื่อควบคุมอุณหภูมิและเวลาที่ต้องการได้

ขั้นตอนต่างๆ ของพีซีอาร์ คือ

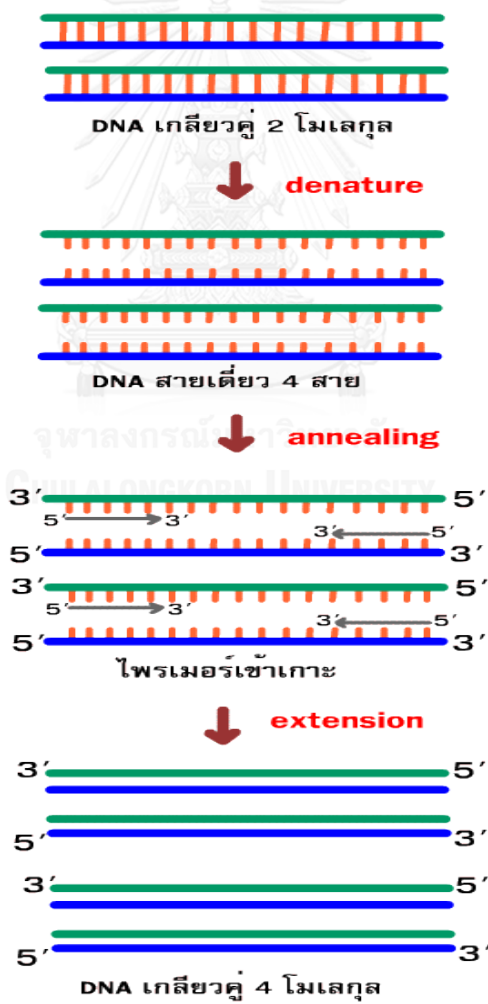
1. Denaturation step ทำการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกันโดยใช้ความร้อน ส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C ซึ่งจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดดีเอ็นเอเส้นคู่ ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกัน
2. Annealing step ลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 40-60 °C จะทำให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ขนาดประมาณ 20-30 เบส ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสในดีเอ็นเอต้นแบบ จะเข้ามาจับกับดีเอ็นเอตรงบริเวณที่จำเพาะ
3. Extension step เพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 72-74 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ Taq DNA polymerase (เป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ที่อาศัยอยู่บริเวณน้ำพุร้อน) เอนไซม์นี้จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ไปในแนวทาง 5' ไปยัง 3' โดยอาศัย dNTPs เป็นสารตั้งต้น จะเห็นว่าเมื่อทำพีซีอาร์ 1 รอบ ถ้าเริ่มจากดีเอ็นเอเส้นคู่ 1 โมเลกุลจะทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ 2 โมเลกุล

เมื่อจบ 1 รอบ หรือ 1 cycle จะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มจาก 1 ชุด เป็น 2 ชุด ซึ่งจะสามารถใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนในรอบต่อไป โดยสายดีเอ็นเอจำนวน 2 ชุด จะแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวจำนวน 4 สาย เมื่อได้รับความร้อน (Denaturation step) และเมื่อลดอุณหภูมิลงไพรเมอร์ ซึ่งมีปริมาณอยู่มากกว่าก็จะเข้ามาแย่งจับกับดีเอ็นเอ (Primer annealing) เกิด Extension step ต่อไปจนได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 4 ชุด เมื่อจบรอบที่ 2 และเมื่อจบรอบที่ 3 จะได้ดีเอ็นเอทั้งหมด 8 ชุด จำนวนการเพิ่มของดีเอ็นเอจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential) และสามารถคำนวณจำนวนชุดดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้โดยใช้สูตร 2^n โดย n มีค่าเท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา

รูปที่ 1



รูปที่ 2



รูปที่ 6 ขั้นตอนต่างๆ ของเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

(ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/dna/chapter/chapter4application.htm>)

2.10.2 เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real Time PCR หรือ Quantitative Real Time PCR; qPCR)

เรียลไทม์พีซีอาร์ เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถตรวจติดตามและบ่งบอกปริมาณของ PCR products ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบได้ตลอดระยะเวลาที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์กำลังดำเนินอยู่ โดยการตรวจสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (fluorescent signal) ที่เปล่งจากสารที่ใช้ร่วมในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรง หลังจากสารนั้นได้รับพลังงานจากแสงเลเซอร์ของเครื่อง ดังนั้น จึงสามารถรายงานผลได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียง 1-2 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนการตรวจหา PCR products โดยวิธี agarose gel electrophoresis ด้วย ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้นที่แตกต่างกันจะทำให้จำนวนรอบที่เริ่มตรวจจับสัญญาณมีความแตกต่างกันด้วย สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ในแต่ละรอบจะถูกบันทึกและแสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ทันที จึงเรียกการตรวจวัดเช่นนี้ว่า On-Line and Real Time Detection และการตรวจวัดในแต่ละรอบ (Cycle by Cycle Monitoring) นี้เป็นการวัดผลแบบ Log-Linear Phase Analysis ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณหาความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอแม่แบบได้แม่นยำมากกว่าการวัดแบบ End-Point Analysis

การตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์สามารถทำได้จากการใช้เทคนิคการตรวจตามผลผลิตพีซีอาร์ที่สามารถก่อให้เกิดสัญญาณการเรืองแสงที่ตรวจวัดได้ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ ได้แก่

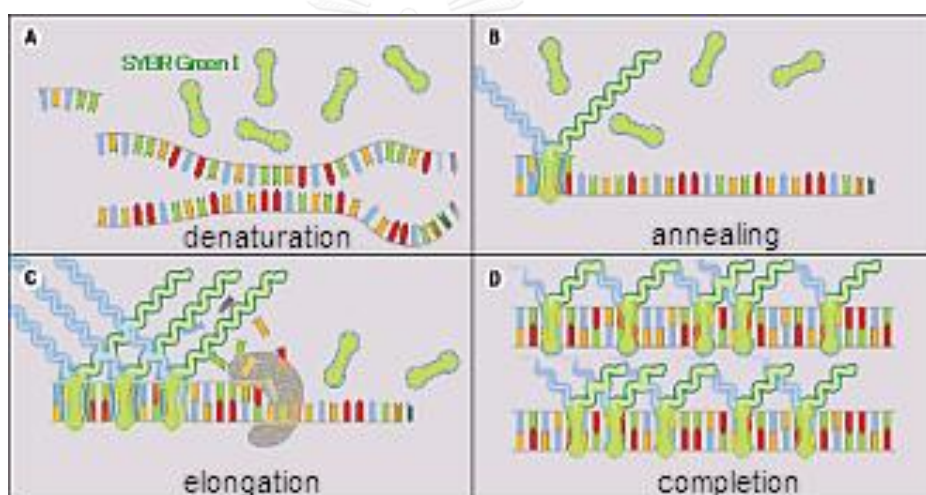
1. การใช้สีที่มีคุณสมบัติเกาะติดกับดีเอ็นเอสายคู่ (DNA binding dye)

สีที่มีคุณสมบัติเกาะติดกับดีเอ็นเอสายคู่อย่างไม่จำเพาะมีหลายตัว เช่น ethidium bromide, SYBR Green I, Yo-PRO เป็นต้น แต่สีที่นิยมใช้ในงานเรียลไทม์พีซีอาร์มากที่สุด คือ SYBR Green I ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงและมีความจำเพาะสูงกว่าและปลอดภัยมากกว่า ethidium bromide โดย SYBR Green I สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ตรงบริเวณ minor groove เท่านั้น เมื่อ SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงที่มีความยาวคลื่นเหมาะสม (~530 nm) จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่นยาวขึ้น ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ ในขั้นตอนของการ annealing และ extension ปริมาณสีที่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่สร้างขึ้นใหม่จะมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นและสูงสุดในช่วงท้ายของขั้นตอน extension และเมื่อเข้าสู่ขั้นตอน denaturation สายดีเอ็นเอแยกจากกัน ทำให้สีถูกปลดปล่อยจากสายดีเอ็นเอ ส่งผลให้การเรืองแสงลดลง ดังนั้นการบันทึกค่าความเข้มการเรืองแสงในระบบนี้เกิดขึ้นทุกรอบ ในช่วงสุดท้ายของขั้นตอน extension ซึ่งปริมาณความเข้มของการเรืองแสง จะแปรผันตามปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มขึ้น

แม้ว่าการจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่เป็นแบบไม่จำเพาะ คือ สามารถจับได้ทั้งผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะและไม่จำเพาะ รวมถึงไพเมอร์ไดเมอร์ (primer dimer) แต่ก็มีวิธีที่สามารถแยกสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจากไพเมอร์ไดเมอร์ หรือผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะออกจากผลผลิต

พีซีอาร์ที่จำเพาะได้ โดยใช้การเปรียบเทียบค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว หรือ melting temperature (Tm) โดยค่า Tm เป็นค่าอุณหภูมิที่ 50% ของดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกัน ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่จำเพาะสำหรับดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่ และแปรผันโดยตรงกับลำดับเบส ปริมาณ %GC และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่นั้น

การหาค่า Tm สามารถวิเคราะห์ได้จาก melting curve ที่สร้างขึ้นหลังการทำพีซีอาร์สิ้นสุดลง แต่อย่างไรก็ดี การวิเคราะห์ melting curve เพื่อหาค่า Tm ทำได้ไม่แม่นยำ โดยทั่วไปจะมีการเปลี่ยนกราฟ melting curve ให้เป็นกราฟ melting peak ซึ่งสามารถใช้ในการหาค่า Tm ได้สะดวก และถูกต้องแม่นยำกว่าการใช้ melting curve และโดยการสร้างเส้นกราฟ melting peak จะพบว่า ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แตกต่างกันจะมี melting peak ที่แยกจากกัน จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่า Tm ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์นั้น [44, 45]



รูปที่ 7 การตรวจวัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยสี SYBR Green I

(A) ในช่วงของการ denature เพื่อแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว สี SYBR Green I ยังไม่สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ (B) เมื่อไพรเมอร์เข้าจับกับแม่พิมพ์ดีเอ็นเอในช่วง annealing และ (C) เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี SYBR Green I จะเริ่มสอดแทรกเข้าสู่สายคู่ของดีเอ็นเอ และมีการเรืองแสงเกิดขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง (D) ในช่วงการสร้างสายดีเอ็นเอ สี SYBR Green I จะเข้าแทรกในดีเอ็นเอสายคู่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากและสูงสุดในช่วงท้ายของขั้นตอน extension ทำให้สามารถตรวจจับการเรืองแสงอย่างต่อเนื่อง ณ เวลาจริงได้ และเมื่อวงจรพีซีอาร์เวียนกลับมาสู่ช่วงของขั้นตอน denature สี SYBR Green I จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ การเรืองแสงจะลดลง

(ที่มา: <http://www.ngrl-japan.com/gene/gene.html>)

2. การติดฉลาก Hybridization probes

เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะเจาะจงมากกว่าการใช้ SYBR Green I โดยการติดฉลาก probe ที่จับจำเพาะกับ PCR product ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ ที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ

2.1 TaqMan Assay สามารถใช้ตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกสร้างขึ้นได้ โดย probe ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอ หรือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของผลผลิตพีซีอาร์ จะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 2 ชนิดที่ปลายของ probe ทั้งสองข้าง โดยสารตัวหนึ่งจะทำหน้าที่เป็น quenching ของ fluorescent group ของสารเรืองแสงอีกตัวหนึ่ง เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินไป มีการเติมเบสจากทั้งสองไพรเมอร์จนมาถึง probe เอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งมี 5'-3' exonuclease activity ก็จะทำลาย probe นี้ไปเรื่อยๆ ทำให้สารเรืองแสงทั้งสองชนิดที่ติดอยู่กับตัว probe หลุดออกเป็นอิสระ ความสามารถในการ quenching ของแต่ละสารก็หมดไป เนื่องจากระยะห่างของสารทั้งสองชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเรืองแสงขึ้นจากสารทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์หาค่าของผลผลิตพีซีอาร์ได้

2.2 FRET Assay เป็นการเติม hybridization probes 2 เส้นที่ถูกติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ 2 ชนิดที่แตกต่างกันเพิ่มเข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อ probes ทั้งสองจับกับผลผลิตพีซีอาร์ในบริเวณที่จำเพาะต่อกัน Fluorescein Dye จะถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์และปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียวออกมา จากการสารฟลูออเรสเซนต์ทั้งสองชนิดอยู่ในตำแหน่งใกล้กัน พลังงานที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก Fluorescein Dye จึงไปกระตุ้นสารฟลูออเรสเซนต์ LC Red ซึ่งติดอยู่กับ hybridization probes อีกเส้นหนึ่งให้ปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์สีแดงซึ่งมีความยาวคลื่นที่ยาวกว่าออกมา การถ่ายเทพลังงานเช่นนี้ เรียกว่า Fluorescence Resonancy Energy Transfer หรือ FRET โดยโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์ทั้งสองชนิดจะต้องอยู่ใกล้กันในระยะที่เหมาะสม (1-5 นาโนเมตร) จึงทำให้การถ่ายเทพลังงานเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ความเข้มของแสงที่ LC Red คายออกมาจะถูวัดด้วย detector ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นจะเป็นสัดส่วนตามปริมาณที่ต่อเมื่อ probes ทั้งสองเส้นจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จึงตรวจวัดได้ในขั้นตอน annealing เท่านั้น หลังจากขั้นตอน annealing อุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้น Taq DNA Polymerase จะเข้ามาแทนที่ hybridization probe เกิด strand displacement เมื่อสิ้นสุดขั้นตอน elongation แล้ว ผลผลิตพีซีอาร์จะอยู่ในรูปของดีเอ็นเอเกลียวคู่ และ probes ทั้งสองก็จะอยู่ห่างกัน จนไม่สามารถเกิด FRET ได้

2.10.3 เทคนิคการโคลนยีน (Gene Cloning Technique)

พันธุวิศวกรรม (genetic engineering หรือ recombinant DNA technology หรือ genetic manipulation) หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงหรือดัดแปลงสารพันธุกรรม (genetic material; DNA) ของสิ่งมีชีวิต โดยการถ่ายถอดยีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งเพื่อสร้างสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการ ซึ่งขั้นตอนการทำพันธุวิศวกรรม อาจเรียกว่า gene cloning คือ การเพิ่มปริมาณกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันซึ่งมียีนที่ต้องการอยู่ในเซลล์ให้ได้จำนวนยีนและจำนวนเซลล์ในปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ขั้นตอนการทำ Gene cloning

1. การเตรียมชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการ (DNA Preparing) เป็นขั้นตอนแรกของการทำ gene cloning ซึ่งดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นสามารถเตรียมได้ 4 วิธี คือ

1.1 Genomic DNA หรือ Chromosomal DNA ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ genomic DNA ที่ได้สามารถนำมาใช้ทำเป็น gene bank หรือ genomic DNA library เพื่อเป็นแหล่งเก็บรวบรวมยีนทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้น หรือเฉพาะบางยีนที่ต้องการของสิ่งมีชีวิตไว้ในหลอดทดลอง

1.2 cDNA (complementary DNA) คือ การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจาก mRNA โดยใช้ reverse transcriptase ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะบางเซลล์หรือบางเนื้อเยื่อในช่วงเวลาหนึ่งๆ เท่านั้น โดย mRNA นั้นจะมีแต่ส่วนของ exon (single copy DNA) เท่านั้น จึงสามารถถ่ายเข้าไปในพลาสมิดของ Prokaryote เพื่อประโยชน์ในการ cloning ได้ และเพื่อการศึกษาการแสดงออกของยีนได้

1.3 การเตรียม DNA ที่ต้องการจากปฏิกิริยา PCR ถ้าทราบลำดับบางส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บริเวณส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือยีนที่ต้องการ เราก็สามารถออกแบบไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งมีจำนวน copy = $[2^n - (n+1)]$ เมื่อ n คือ จำนวนรอบของการทำ PCR

1.4 การสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี

โดยใช้เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติ (automate DNA synthesizer) ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่มีขนาดยาว 50 นิวคลีโอไทด์ แต่ถ้าสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ

เอที่มีขนาดยาวมากๆ ก็สามารถทำได้โดยสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ หลายๆ สาย
แล้วนำมาต่อกันโดยใช้ DNA ligase

2. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการโคลนยีน (Restriction enzyme for gene cloning) ในการโคลนยีนต้องใช้เอนไซม์ที่จำเพาะในการตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพาหะ (vector) แล้วจึงถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell)
3. การเลือกใช้พาหะหรือเวกเตอร์ (Vector) และการทำยีนโคลนนิ่ง (Gene cloning) พาหะ (vector) คือ ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากๆ โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมาเชื่อมเข้าไปกับ DNA vector จะได้ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA; rDNA) จากนั้นนำ rDNA ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) โดยวิธีการ transformation เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ ปัจจุบันมีเวกเตอร์ต่างๆ มากมายที่ใช้สำหรับ gene cloning ซึ่งการเลือกใช้เวกเตอร์นั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งานที่ต้องการ การโคลนยีนในแบคทีเรียอาจเลือกใช้เวกเตอร์ที่เป็นพลาสมิด (plasmid), ฟาจ (phage) และคอสมิด (cosmid) หรือถ้าต้องการโคลนยีนในเซลล์สัตว์อาจใช้เวกเตอร์ที่เป็นไวรัส SV40 ในเซลล์พืชใช้ไวรัสพวก Cauliflower mosaic virus (CMV) และ Ti plasmid อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาเวกเตอร์ที่สามารถจำลองตัวเองได้ในเซลล์เจ้าบ้านมากกว่า 1 ชนิด ที่เรียกว่า Shuttle vector เช่น E.coli และ Yeast เป็นต้น
4. การถ่ายไฮบริดเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อทำ gene cloning (Transformation) หลังจากได้ rDNA แล้วก็นำไปถ่ายลงในเซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มปริมาณ ซึ่งสามารถทำได้โดยการสร้าง DNA library คือการนำ genomic DNA ของสิ่งมีชีวิตมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปถ่ายในเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อขยายปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ แล้วเก็บเซลล์เจ้าบ้านหรือเก็บเวกเตอร์ไว้ที่ -80°C เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป การสร้าง DNA library ในแบคทีเรียและไวรัส
5. การตรวจสอบ clone ที่ต้องการ (Screening hybrid vector) หลังจากใส่ดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าไปในเวกเตอร์แล้วนำเวกเตอร์ดังกล่าวมา transformation เข้าสู่ host cell ในขั้นตอนนี้อาจเป็นที่จะต้องมีวิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการจากประชากรทั้งหมดของเซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการนั้นออกมา เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป ซึ่งวิธีการตรวจสอบมีหลาย

วิธี เช่น การคัดเลือกจากพีโนไทป์, การตรวจสอบโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี, การตรวจสอบโดย Nucleic acid hybridization และ การตรวจสอบโคลนที่มียีนโดยการทำให้ PCR หรือเรียกว่า colony PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด

2.10.4 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

ข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) ของสิ่งมีชีวิตถูกจัดเก็บอยู่ในรูปของลำดับเบสของดีเอ็นเอ สิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน มีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไป ก็เนื่องมาจากมีลำดับเบสของดีเอ็นเอต่างกัน ส่งผลถึงการมีลำดับอะมิโนของโปรตีนต่างกัน มีชนิดของโปรตีนแตกต่างกันไป กลไกการดำเนินชีวิตของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้น การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอจึงสามารถนำมาเปรียบเทียบความใกล้ชิดของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน เพื่อใช้ในการจัดหมวดหมู่เชิงอนุกรมวิธาน ตลอดจนการศึกษาสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ดีขึ้น นอกจากนั้นความเข้าใจกลไกการดำเนินชีวิตของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ยังช่วยให้มนุษย์สามารถควบคุมและทำลายสิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุของการก่อโรค หรือดัดแปลงสิ่งมีชีวิตต่างๆ ให้เป็นประโยชน์แก่มวลมนุษยชาติได้

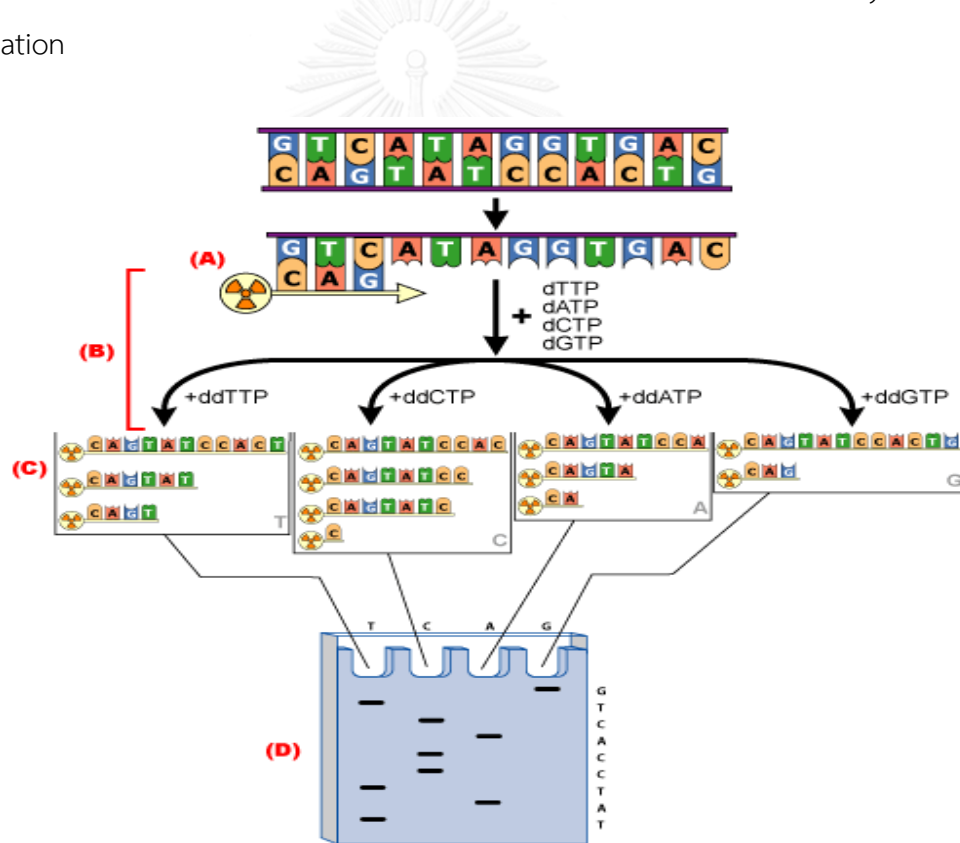
ปัจจุบันนี้เทคโนโลยีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ถูกพัฒนาให้รวดเร็ว ประหยัดและอัตโนมัติ ผนวกกับพลังความสามารถของคอมพิวเตอร์อันทรงประสิทธิภาพ (Supercomputer) ทำให้การศึกษาหาลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ประสบผลสำเร็จได้

วิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ มีการศึกษาและพัฒนาขึ้นหลากหลายวิธี เช่น วิธีการใช้สารเคมี, วิธีการใช้เอนไซม์ และ Automated DNA sequencing ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออก จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม กล่าวคือ วิธีการใช้สารเคมี จะเหมาะสำหรับการหาลำดับเบสสายสั้นๆ (10-100 เบส) เท่านั้น และมีวิธีการที่ยุงยาก ทำให้ไม่นิยมใช้กันแล้ว แต่อย่างไรก็ดีวิธีการนี้ก็ยังคงมีการนำมาใช้ทดสอบซ้ำเพื่อความถูกต้องของการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่อ่านได้ไม่ชัดเจนจากวิธีการใช้เอนไซม์หรือปัญหา secondary structure ภายในดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้เอนไซม์ DNA Polymerase I ไม่สามารถอ่านลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวได้ แต่ข้อดีของวิธีการใช้เอนไซม์ คือ เป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว จึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

เทคนิคการหาลำดับเบสด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ (Enzymatic Method) ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Sanger, F. และคณะ ในปี ค.ศ. 1975 โดยเลียนแบบกระบวนการจำลองสารพันธุกรรมในธรรมชาติ (DNA Replication) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA Polymerase I ในการเร่งให้เกิด phosphodiester bond ของ primer กับ nucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีเบสคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ แต่เนื่องจาก DNA Polymerase

I สามารถใช้ nucleotide analogues อื่นๆ เป็น substrate ได้ด้วย เช่น $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP, 2',3'-dideoxynucleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ดังนั้นหากใส่สารเหล่านี้ลงไปในการปฏิกิริยาด้วย สารเหล่านี้ก็จะสามารถถูกนำไปในสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ได้

2',3'-dideoxynucleotide เป็นสารที่ขาดหมู่ $3'\text{OH}^-$ ดังนั้นจึงไม่สามารถเกิด phosphodiester bond กับ nucleotide ตัวถัดไปที่จะเข้ามาต่อได้ ส่งผลให้สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่แต่ละสายสิ้นสุดการสร้างต่อ และมีขนาดความยาวแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับว่ามี ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP มาเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่งใด เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่เหล่านี้ไปแยกตามขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งมีความสามารถที่จะแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ แล้วนำแผ่นเจลมาประกบกับ X-ray film ก็จะสามารถเห็นแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ วิธีการนี้จึงเรียกได้อีกชื่อว่าวิธี Dideoxy Chain Termination



รูปที่ 8 วิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยวิธีการ Dideoxy Chain Termination (Sanger) ขั้นแรก ต้องให้สายโพลินิวคลีโอไทด์สั้นๆ จับคู่กับโพลินิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าเป็นไพรเมอร์ สำหรับการสร้างสายใหม่ที่ complement กับชิ้นส่วน DNA ที่เดิมเข้าไปในจัน เอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง คือ DNA Polymerase I นอกจากนี้ยังต้องมีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดคือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP รวมทั้งนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดแปลงชนิดหนึ่ง คือ dideoxynucleotide, dideoxy ATP ซึ่ง

สามารถเข้าไปอยู่ในสายพอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ เช่นเดียวกับดีออกซีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดดังกล่าว เมื่อ dideoxy ATP เข้าไปอยู่ในสายจะทำให้หยุดการสร้างสายต่อไป ทั้งนี้เพราะ dideoxy ATP ขาด หมู่ OH ที่ตำแหน่ง 3' ของน้ำตาล ซึ่งหมู่จำเป็นสำหรับการจับของนิวคลีโอไทด์หน่วยใหม่ ถ้าเติม dideoxy ATP ในปฏิกิริยาจะทำให้หยุดการเพิ่มความยาวที่ตำแหน่งตรงข้ามกับ ไธมิดีน (thymidine) ในสายแม่พิมพ์ แต่การหยุดการเพิ่มความยาวจะไม่เกิดขึ้นที่ T ตัวแรก เนื่องจากมี dATP อยู่ในสารละลาย dATP จะเข้าไปแทนที่ dideoxy ATP ผลของปฏิกิริยาจะได้สายใหม่ทุกสายมีความยาวแตกต่างกัน และแต่ละสายมีปลายเป็น dideoxy ATP เมื่อใช้ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dideoxy ATP, dideoxy TTP, dideoxy GTP และ dideoxy CTP สำหรับปฏิกิริยาการสร้างสายใหม่ ผลของปฏิกิริยาจะได้พอลินิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 4 ชนิด แต่ละชนิดมีปลายเป็น dideoxy ATP, dideoxy TTP, dideoxy GTP และ dideoxy CTP ขั้นตอนต่อไป คือ การแยกพอลินิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวต่างกันของแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) ผลที่ปรากฏให้เห็นเป็นแถบ (band) จำนวนมาก แต่ละแถบเป็นโมเลกุล DNA ที่มีความยาวแตกต่างกัน โดยทั่วไปโมเลกุล DNA ถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีจึงสามารถเห็นแถบได้โดยการทำ autoradiography

(ที่มา: <http://genetics.nbi.gov/images/sequence6.gif>)

2.11 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เป็นศาสตร์หนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาฐานข้อมูลเพื่อจัดเก็บและค้นหาข้อมูล รวมทั้งมีการใช้สถิติและกฎการคำนวณต่างๆ (algorithms) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลทางอณูชีววิทยา เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโน (โปรตีน) ในการค้นหาความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโนนั้นเป็นผลมาจากวิวัฒนาการระดับโมเลกุล ถ้าลำดับเหล่านั้นมีบรรพบุรุษร่วมกัน (common ancestor) ก็มักจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกัน รวมทั้งมักมีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกันด้วย สามารถกระทำได้โดยใช้การ BLAST ส่วนการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโน เรียกว่า sequence alignment เป็นการแยกความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันโดยบังเอิญ กับความคล้ายกันที่เป็นผลมาจากวิวัฒนาการและมีความสัมพันธ์กันในหน้าที่จริงๆ จากนั้นนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโนมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) [46]

การวิเคราะห์วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) เป็นการศึกษาประวัติหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต สามารถสร้างโดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับอะมิโนของโปรตีน จากยีนชนิดต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต ลักษณะของ phylogenetic tree มีลักษณะคล้ายต้นไม้ ซึ่งประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) โดยก้านอาจแตกออกเป็นสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multi-furcation) ตำแหน่งที่ก้านแตกออกเป็นกิ่งย่อย เรียกว่า โหนด (node) โดยที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบสหรือลำดับอะมิโนของสายพันธุ์ หรือ species ของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า แทกซอน (taxon) ซึ่งกลุ่มของแทกซอนที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน หรือร่วมกันจะเรียกว่า เคลด (clade) ในการสร้าง phylogenetic tree อาจจะมี clade เพียง clade เดียว ซึ่งเรียกว่า monophyletic tree หรือมีหลาย clade จะเรียกว่า polyphyletic tree ใน phylogenetic tree อาจมีจุดกำเนิดร่วมหรือมีราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งรวมของ taxa ทั้งหมด สามารถบอกได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดกันมา และรูปแบบที่ไม่มีราก (unrooted tree) ไม่สามารถระบุได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดกันมา ไม่สามารถบอกถึงความใกล้ชิดหรือความสัมพันธ์ เพราะไม่ทราบว่าจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการอยู่ที่ตำแหน่งใด สำหรับรูปแบบของ phylogenetic tree มี 2 แบบ คือ แบบ phylogram ซึ่งเป็น tree ที่มีความยาวของกิ่งไม่เท่ากันจะแสดงถึงระยะเวลาในการเกิดวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน และแบบ cladogram ซึ่งจะบอกเพียงลำดับของ taxon แต่ไม่แสดงระยะเวลาที่เกิดวิวัฒนาการ

การสร้าง phylogenetic tree นั้น นอกจากจะใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแล้วยังมีประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น การศึกษาด้านระบาดวิทยา การควบคุมโรคติดเชื้อ การใช้เพื่อช่วยในการศึกษาคุณสมบัติของ species ที่ยังไม่มีการศึกษา เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อนำมาใช้เป็นยา และการศึกษาเพื่อนำไปสู่ความรู้ความหลากหลายของโครงสร้างเพื่อใช้เป็นแหล่งศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และการออกแบบยาหรือวัคซีนที่ใช้รักษาโรคต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study : retrospective) โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 188/57, COA No. 354/2014)

3.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย

3.2.1 การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) ทั้ง 4 ซีโรไทป์ เป็น Positive control คือ DEN-1 สายพันธุ์ Hawaii, DEN-2 สายพันธุ์ 16681, DEN-3 สายพันธุ์ H87 และ DEN-4 สายพันธุ์ 814609

3.2.2 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population)

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Plasma, PBMC, Serum Urine, Pellet of urine และ Saliva ซึ่งเป็นสิ่งส่งตรวจที่เหลือจากงานวิจัยเรื่อง “A feasibility study of using unconventional specimens in dengue diagnosis” ของรองศาสตราจารย์นายแพทย์วันลา กุลวิจิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการอนุมัติให้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย เมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน 2550

ปัจจุบันการศึกษานี้ได้ผ่านการขออนุมัติใช้สิ่งส่งตรวจที่เหลือเพื่อการวิจัยจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และสำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลือกใช้สิ่งส่งตรวจที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆ จากผู้ป่วยไม่จำกัดเพศ อายุไม่เกิน 18 ปี ที่มีไข้สูง และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบเฉียบพลัน และไม่ติดเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยเทคนิค RT-Nested PCR ที่ให้ผลบวก และการตรวจทางน้ำเหลือง (serology) ที่มีระดับเพิ่มขึ้นจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.2.3 ขนาดตัวอย่างของผู้ป่วย (Sample size) ที่ใช้ในการศึกษา ผู้วิจัยคำนวณจากสูตร
ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{สูตร} \quad N &= \frac{n+}{\text{Prevalence}} \\ \text{โดย} \quad n+ &= \frac{(Z_{\alpha/2})^2 PQ}{\Delta^2} \end{aligned}$$

$$\text{ที่ } \alpha = 0.05 ; Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$\Delta = \text{relative acceptable error} = 20\% \text{ ของ } P$$

$$P = \text{sensitivity ของ enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)}$$

$$Q = (1 - \text{sensitivity ของ ELISA})$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น} \quad n+ &= \frac{(1.96)^2 \times 0.95 \times 0.05}{(0.2 \times 0.95)^2} = \frac{3.8416 \times 0.95 \times 0.05}{(0.19)^2} = \frac{0.182476}{0.0361} = 5.0547 \\ N &= \frac{5.0547}{0.3571} = 14.1548 \end{aligned}$$

ดังนั้น จากการคำนวณทางสถิติ ใช้จำนวนผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจยืนยันด้วยวิธี ELISA test พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสแดงก็ 15 ราย เป็นกลุ่มศึกษา คือ ตัวอย่างส่งสิ่งตรวจ Plasma, PBMC, Serum Urine, Pellet of urine และ Saliva จากผู้ป่วยที่มีไข้สูงและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคติดเชื้อไวรัสแดงก็เฉียบพลัน โดยการตรวจน้ำเหลืองด้วยการวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) และ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ได้ผลบวก จำนวน 15 ราย

และใช้กลุ่มควบคุม เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง โดยใช้ตัวอย่าง Plasma, PBMC, Pellet, Serum และ Urine จากผู้ป่วยที่มีไข้สูงและได้รับการวินิจฉัยว่าไม่เป็นโรคติดเชื้อไวรัสแดงก็เฉียบพลัน โดยการตรวจน้ำเหลืองด้วยการวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) และ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) จำนวน 5 ราย

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 3.2.2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycle) (Eppendorf, Germany)
- 3.2.3 Roter Gene 6000 Real time PCR machine (Corbett Lofe Science, Qiagen, Germany)
- 3.2.4 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C (Sanyo, Japan)
- 3.2.5 ตู้เย็นอุณหภูมิ -30 °C (Sanyo, Japan)
- 3.2.6 ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C (Sanyo, Japan)
- 3.2.7 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker (Biotek, France)
- 3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ Refrigerated centrifuge (Eppendorf, Germany)
- 3.2.9 Micro centrifuge (Labtech, Korea)
- 3.2.10 Mini centrifuge (WiseSpin, Korea)
- 3.2.11 เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Thailand)
- 3.2.12 เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex Mix (WiseMix, Korea)
- 3.2.13 เครื่อง water bath Incubator (WiseBath, Korea)
- 3.2.14 เครื่อง Heat box (Biosan, Latvia)
- 3.2.15 เครื่องอบลมร้อน Incubator (Mettler, Germany)
- 3.2.16 เครื่อง Gel electrophoresis (Labtech, Korea)
- 3.2.17 เครื่องถ่ายภาพรูป Ultraviolet Transilluminator Gel DOC (Quantum ST4 100, France)
- 3.2.18 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Nano drop spectrophotometer (Thermo, USA)
- 3.2.19 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 และ 4 ตำแหน่ง (Ohaus, Switzerland)
- 3.2.20 ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ Autoclave (Hirayama, Japan)
- 3.2.21 ตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (Mettler, Germany)
- 3.2.22 ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR cabinet) (Augustin, Thailand)
- 3.2.23 ตู้ปลอดเชื้อ Biohazard Safety Cabinet class II (Esco, Singapore)

3.2.24 ไมโครปิเปตขนาด 0.1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1,000 μl (Eppendorf, Germany; Biohit, Finland)

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.2.25 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (Axygen, USA)
- 3.2.26 PCR tube ขนาด 0.2 ml (Axygen, USA)
- 3.2.27 Filter tips ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 μl (Axygen, USA)
- 3.2.28 Sterile tube ขนาด 15 และ 50 ml (Corning, USA)
- 3.2.29 ปากคีบ (forceps) (Hilbro, Pakistan)
- 3.2.30 ถุงมือยาง (ศรีตรังโกลฟส์, ประเทศไทย)
- 3.2.31 จานเพาะเชื้อ (Plastic petri dish sterile) (Sterilin, UK)
- 3.2.32 Loop เขี่ยเชื้อ และ spreader (Corning, USA)
- 3.2.33 ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100, 500, และ 1,000 ml (Schott, Germany)
- 3.2.34 ขวดกรองสาร (Bottle top filter ขนาด 500 ml) (Corning, USA)
- 3.2.35 PCR racks and 1.5 ml racks (Axygen, USA)
- 3.2.36 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.37 กล้องโพรบสำหรับใส่น้ำแข็ง
- 3.2.38 นาฬิกาจับเวลา
- 3.2.39 กระดาษทิชชูสำหรับทำความสะอาด
- 3.2.40 หยอดหยด (dropper)
- 3.2.41 พาราฟิล์ม (parafilm)
- 3.2.42 ไม้จิ้มฟัน

3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.2.43 QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany)
- 3.2.44 QIAGEN OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Germany)
- 3.2.45 SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit (Invotrogen, USA)
- 3.2.46 pCR 8/GW/TOPO TA Cloning kit (Invotrogen, USA)
- 3.2.47 Mach1-T1 Chemically Competent *E.coli* (Invotrogen, USA)
- 3.2.48 NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Germany)
- 3.2.49 QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Germany)
- 3.2.50 HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Germany)
- 3.2.51 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Research organic, USA)
- 3.2.52 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Bio Basic, Canada)
- 3.2.53 LB broth
- 3.2.54 SOC medium
- 3.2.55 Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 3.2.56 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Gibco, Invitrogen, USA)
- 3.2.57 Distilled water (DW) and Reverse osmosis (RO) water (ELGA, UK)
- 3.2.58 Ethidium bromide (Bio Basic, Canada)
- 3.2.59 RNase Inhibitor (TOYOBO, Japan)
- 3.2.60 Agarose (Bio Basic, Canada)
- 3.2.61 DNA marker 100 bp (Fermentas, EU)
- 3.2.62 6X loading buffer (Fermentas, EU)
- 3.2.63 Oligonucleotide primers (1st BASE, Malaysia)
- 3.2.64 Sequencing service (1st BASE, Malaysia)

หมายเหตุ: รายละเอียดและวิธีการเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก

3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี และมาเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้แก่ อายุ เพศ จำนวนวันที่มีไข้ เวลาในการเก็บตัวอย่างส่งตรวจ และรวบรวมผลทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยแต่ละราย จากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการของแต่ละตัวอย่าง โดยการจดบันทึก

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

การวิเคราะห์ผล จะทำการวิเคราะห์ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ แผนภูมิวิวัฒนาการ และปริมาณของไวรัสในแต่ละสิ่งส่งตรวจ และช่วงเวลาที่เกิดสิ่งส่งตรวจแตกต่างกัน

โดยในส่วนของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast (BLASTN) ซึ่งจะแสดงผลเป็นค่า Percentage Identities หลังจากนั้นทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำตัวอย่างมาเปรียบเทียบ (align) กัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแสดงค่าเป็น sequence identity matrix ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.2.5 จากนั้นใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA version 6.0) วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree, แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม) จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และในช่วงเวลาที่มีการเก็บสิ่งส่งตรวจแตกต่างกัน และทำการทดสอบทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ โดยใช้ Hep C - NS3 เป็น out group

การวิเคราะห์ผลการหาปริมาณไวรัส ทำโดยการสร้าง standard curve จาก stock virus DENV2 และหาปริมาณไวรัสของแต่ละตัวอย่าง ในช่วงเวลาที่เก็บแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับ standard curve ผลที่ได้ คือ ปริมาณไวรัส จะรายงานในหน่วย PFU/ml ซึ่งจะเปรียบเทียบกันในรูปแบบของตารางในแต่ละตัวอย่าง และช่วงเวลาที่เกิดขึ้น

3.8 วิธีดำเนินการวิจัย

3.8.1 สุ่มตัวอย่างผู้ป่วย

ทำการสุ่มสิ่งส่งตรวจเหลือใช้จากโครงการงานวิจัยเรื่อง “A feasibility study of using unconventional specimens in dengue diagnosis” ของรองศาสตราจารย์นายแพทย์วันลา กุลวิจิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาใช้ในการศึกษา ได้แก่ Plasma, PBMC, Serum Urine, Pellet of urine และ Saliva โดยเลือกใช้สิ่งส่งตรวจที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆ จากผู้ป่วยไม่จำกัดเพศ อายุไม่เกิน 18 ปี ที่มีไข้สูง และสงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี

3.8.2 การสกัด RNA จากตัวอย่างผู้ป่วย (RNA Extraction)

สกัดแยก RNA จากสิ่งส่งตรวจที่เก็บมาจากผู้ป่วย โดยใช้ชุดสกัด QIAamp viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) โดยการดูดสารละลาย Buffer AVL 560 μ l ที่เตรียมจากการผสม carrier RNA ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติมตัวอย่างที่เก็บมาจากผู้ป่วย 140 μ l ลงใน Microcentrifuge tube ทำการผสมให้เข้ากันโดยการ vortex 15 วินาที นำไป Incubate ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) 10 นาที จากนั้น เติม Absolute ethanol 560 μ l ลงใน tube แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex 15 วินาที ดูดส่วนผสม 630 μ l ใส่ QIAamp mini spin column นำไป centrifuge 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำจนส่วนผสมหมด) จากนั้นเติม 500 μ l Buffer AW1 แล้ว centrifuge 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 500 μ l Buffer AW2 นำไป centrifuge 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง Centrifuge อีก 1 นาที เปลี่ยนมาใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม Elution buffer (Buffer AVL) 40 μ l นำไป Incubate ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) 1 นาที แล้ว centrifuge 6000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แบ่ง viral RNA ที่สกัดได้ใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml จากนั้นจึงนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาอื่นต่อไป

3.8.3 ตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของ RNA (Quantitative analysis for RNA)

นำ viral RNA ที่ได้จากการสกัด ไปวัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA (Quantitative analysis for RNA) โดยการนำ viral RNA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Thermo, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย RNA จากสูตร

$$\text{RNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD260} \times \text{dilution factor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

ค่าความเข้มข้นของ RNA (A_{260}/A_{280} ratio) ที่ได้ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 หากวัดคุณภาพความเข้มข้นของ RNA ได้น้อยกว่า 1.8 แสดงว่าตัวอย่างสารละลาย RNA ที่สกัดได้มีการปนเปื้อนโปรตีน แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามีการปนเปื้อนเกลือของบัฟเฟอร์ [47]

3.8.4 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.8.4.1 One Step RT-PCR β 2- microglobulin เพื่อตรวจหา housekeeping gene [48]

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers β 2- microglobulin

Primers	Sequences (5' – 3')	Size (bp)
B2MRT	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC	158
B2M158	CTT GTC TTT CAG CAA GGA CTG G	

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้ One Step RT-PCR kit (Qiagen, Germany) เตรียมส่วนผสม (reaction mixture) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร โดยการนำ RNA ที่ได้มา 2 ไมโครลิตร เติม 5X reaction buffer 5 ไมโครลิตร 10mM dNTPs 1 ไมโครลิตร forward primer 0.5 ไมโครลิตร reverse primer 0.5 ไมโครลิตร RNase inhibitor 0.3 ไมโครลิตร enzyme mix 1 ไมโครลิตร และน้ำ 14.7 ไมโครลิตร นำไปบ่มโดยใช้เครื่อง Thermal cycle โดยขั้นตอน Reverse transcription บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Denaturation โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Annealing บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR (β 2- microglobulin)

Reagents	1X (μ l)
5X Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5
dNTPs Mix (10 mM of each dNTP)	1
10 μ M B2MRT (forward primer)	0.5
10 μ M B2M158 (reverse primer)	0.5
40 U/ μ l RNase inhibitor (TOYOBO, Japan)	0.3
DNase/RNase-Free Distilled Water	14.7
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	1
RNA template	2
Total	25 μl

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา
Reverse transcription	50	30 minutes
Initial activation step	95	15 minutes
Denature step	94	1 minutes
Annealing step	55	1 minutes
Extension step	72	1 minutes
Final extension step	72	7 minutes

} 40 cycles

3.8.4.2 Semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol) เพื่อตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี

ทำการตรวจจำแนกการติดเชื้อเดงกีไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ โดยใช้ Lanciotti protocol ซึ่งเป็น universal primers สำหรับการแยกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี [49] วิธีการตรวจแบบ Semi-nested RT-PCR ซึ่งจะใช้การทำ PCR 2 รอบ ในรอบแรกใช้ primers D1 (forward primers) และ primers D2 (reverse primers) ซึ่งสามารถตรวจหาไวรัสเดงกีได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 511 bp จากนั้นทำ PCR รอบที่ 2 เพื่อจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีโดยจะใช้ primers D1 (forward primers) และ เปลี่ยน reverse primers เป็น TS1, TS2, TS3 และ TS4 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol)

Primers	Sequences (5' – 3')	Size (bp)
D1	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G	511
D2	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC	511
TS1	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	482 (D1 and TS1)
TS2	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	119 (D1 and TS2)
TS3	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	290 (D1 and TS3)
TS4	CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A	392 (D1 and TS4)

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้ One Step RT-PCR kit (Qiagen, Germany) เตรียมส่วนผสม (reaction mixture) ดังตารางที่ 5 ให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร นำไปป้อนโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิ (Thermal cycles condition) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol)

Reagents	1X (μl)
5X Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	4
dNTPs Mix (10 mM of each dNTP)	0.8
10 μM D1 (forward primer)	1
10 μM D2 (reverse primer)	1
40 U/μl RNase inhibitor (TOYOBO, Japan)	0.2
DNase/RNase-Free Distilled Water	8.2
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	0.8
RNA template	4
Total	20 μl

ตารางที่ 6 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Reverse transcription	50	30 minutes
Initial activation step	95	15 minutes
Denature step	94	1 minutes
Annealing step	55	1 minutes
Extension step	72	1 minutes
Final extension step	72	10 minutes

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมรอบที่ 1 ด้วย primers D1-D2 ไปเพิ่มจำนวนอีกครั้งโดยใช้ forward primers คือ D1 และ reverse primers คือ TS1, TS2, TS3 และ TS4 โดยเตรียมส่วนผสม (reaction mixture) ดังตารางที่ 7 ให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร นำไปป้อนโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิ (Thermal cycles condition) ดังตารางที่ 8 จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา semi-nested RT-PCR (Lanciotti protocol)

Reagents	1X (µl)
10X PCR Buffer	2
25 mM MgCl ₂	0.8
dNTPs Mix (10 mM of each dNTP)	0.4
10 µM D1	0.5
10 µM TS1	0.5
10 µM TS2	0.5
10 µM TS3	0.5
10 µM TS4	0.5
DNase/RNase-Free Distilled Water	12.2
5U/µl HotStarTaq DNA Polymerase	0.1
First round of PCR product	2
Total	20 µl

ตารางที่ 8 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Initial activation step	95	15 minutes
Denature step	94	1 minutes
Annealing step	58	1 minutes
Extension step	72	2 minutes
Final extension step	72	10 minutes

3.8.4.3 One Step RT-PCR DENV2 - NS3 เพื่อตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 บริเวณ NS3 แต่เนื่องจากบริเวณดังกล่าวนี้ ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ผู้วิจัยจึงทำการออกแบบ primers เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณ NS3 ของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2

การออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 บริเวณ NS3

ในการศึกษานี้ต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 (DENV2) ที่บริเวณ NS3 ในประเทศไทย จึงทำการออกแบบ primers โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เลือกลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน DENV2 หลายๆ นิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ในประเทศไทยและประเทศที่อยู่ใกล้เคียง จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.8.1 ทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และเลือกศึกษาตำแหน่งของบริเวณ NS3 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละเส้น และออกแบบ primers โดยหาบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) หรือบริเวณที่มีความเหมือนมากที่สุดสร้างเป็น forward primers และ reverse primers มีความยาวเบสประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทป์ และควรมีปริมาณ GC (G+C content) อยู่ระหว่างร้อยละ 40-60 และไม่ควรมีเบสที่ซ้ำกันเรียงกันมากกว่า 3-4 เบส และไม่ควรมีเบสซ้ำกันเป็นคู่ (dinucleotide repeats) นอกจากนี้ต้องทำการคำนวณอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับของ primers อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิที่ต่ำพอที่จะทำให้เกิดการจับกันของ primers และดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ ต้นแบบเกิดขึ้น และเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการจับที่ผิดพลาด (mismatch) อุณหภูมินี้คาดคะเนได้โดยการหาอุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature; Tm) ของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอต้นแบบ ค่า Tm นี้สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Tm (^{\circ}C) = 2(A+T) + 4(G+C)$$

โดยค่า G+C เป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ G และ C ของไพรเมอร์ และค่า A+T เป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์ A และ T ของไพรเมอร์ โดยส่วนใหญ่ annealing temperature จะเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่า T_m อยู่ประมาณ $3-5^{\circ}\text{C}$ ค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้งสองควรมีค่าใกล้เคียงกัน และไม่ควรมีค่า T_m ที่แตกต่างกันมากกว่า 5°C จากนั้นใช้โปรแกรม Oligos เพื่อตรวจหา Self-Complementary Primer และการเกิด Hairpin แล้วทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ด้วยการนำไป blast โดยใช้โปรแกรม primer-blast เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นมีความจำเพาะต่อ DENV2 ที่บริเวณ NS3 หรือไม่ และมีขนาดของยีนเท่าไร เมื่อได้ลำดับเบสของไพรเมอร์แล้ว จึงทำการส่งลำดับเบสไปส่งเคราะห์ไพรเมอร์ที่บริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นตัวแทนในการติดต่อจัดส่งลำดับเบสไปทำการส่งเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในขั้นตอนการทำ PCR และศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสบริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ต่อไป

ตารางที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้

Primers	Sequences (5' – 3')	Size (bp)
DENV2-NS3F	ATG GAG GAG GCT GGA AGC TG	295
DENV2-NS3B	TCT GGG TTG TCT TCG ATG CT	

ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ DENV2-NS3 (Specificity)

ทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ DENV2-NS3 เพื่อดูว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 เท่านั้น ไม่สามารถจับกับไวรัสเดงกี ซีโรไทป์อื่น และไม่สามารถจะจับไวรัสสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม Flavivirus ได้ โดยวิธีการศึกษา คือ นำไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในตระกูล Flavivirus ได้แก่ Dengue virus (DENV) ทั้ง 4 ซีโรไทป์ คือ DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 และไวรัสสายพันธุ์อื่นที่นำมาศึกษา คือ Japanese encephalitis (JE) และ West-Nile virus มาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้ เตรียมส่วนผสม (reaction mixture) ดังตารางที่ 10 ให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อนโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิแบบ gradient (Gradient Thermal cycles condition) ดังตารางที่ 11 เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR (DENV2 - NS3)

Reagents	1X (μl)
5X Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	4
dNTPs Mix (10 mM of each dNTP)	0.8
10 μM DENV2-NS3F (forward primer)	1
10 μM DENV2-NS3B (reverse primer)	1
40 U/μl RNase inhibitor (TOYOBO, Japan)	0.2
DNase/RNase-Free Distilled Water	8.2
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	0.8
RNA template	4
Total	20 μl

ตารางที่ 11 แสดงขั้นตอน PCR (Gradient Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Reverse transcription	50	30 minutes
Initial activation step	95	15 minutes
Denature step	94	1 minutes
Annealing step	62, 63, 64, 65, 66	1 minutes
Extension step	72	1 minutes
Final extension step	72	7 minutes

} 40 cycles

ตรวจหาความไวต่ำสุดของไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่สามารถตรวจจับไวรัสเดงกี (Sensitivity)

ทำการตรวจหาความไวต่ำสุดของไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่สามารถตรวจหาไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ได้ โดยทำการศึกษาจากการนำไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่รู้ความเข้มข้นตั้งต้น คือ stock DENV2 ที่มีปริมาณไวรัสตั้งต้น 4.75×10^6 PFU/ml มาเจือจางแบบ 10-fold serial dilution แล้วทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้ โดยเตรียมส่วนผสม (reaction mixture) ดังตารางที่ 10 ให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิ (Thermal cycles condition) ดังตารางที่ 12 จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อดูความเข้มข้นต่ำสุดของไวรัสที่ไพรเมอร์สามารถตรวจจับได้

ทำการเพิ่มจำนวนไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยวิธี One Step RT-PCR DENV2 - NS3

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้ One Step RT-PCR kit (Qiagen) เตรียมส่วนผสม (reaction mixture) ให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 10 โดยการนำ viral RNA ที่สกัดได้มา 4 ไมโครลิตร เติม 5X reaction buffer 4 ไมโครลิตร 10mM dNTPs 0.8 ไมโครลิตร forward primer 1 ไมโครลิตร reverse primer 1 ไมโครลิตร (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers DENV2-NS3 แสดงดังตารางที่ 9) RNase inhibitor 0.2 ไมโครลิตร enzyme mix 0.8 ไมโครลิตร และน้ำ 8.2 ไมโครลิตร นำไปบ่มโดยใช้เครื่อง Thermal cycle โดยขั้นตอน Reverse transcription บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที, อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Denaturation โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Annealing บ่มที่อุณหภูมิ 66°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน Extension อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที ดังตารางที่ 12 จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผล โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 12 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Reverse transcription	50	30 minutes
Initial activation step	95	15 minutes
Denature step	94	1 minutes
Annealing step	66	1 minutes
Extension step	72	1 minutes
Final extension step	72	7 minutes

} 40 cycles

3.8.5 การตรวจวิเคราะห์ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

Gel electrophoresis เป็นการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยใช้ตัวกลางคือ agarose วิธีการคือ นำ agarose มาละลายด้วย 1X TBE buffer แล้วหลอมละลายด้วยความร้อนโดยนำไปอบในไมโครเวฟ และเทลงในถาดแม่แบบที่มีหัวซีสำหรับรันเจล ปล่อยให้เย็นลง agarose จะแข็งตัวทำให้เกิดรูพรุนที่ยอมให้ดีเอ็นเอผ่านเมื่อให้กระแสไฟฟ้าเข้าไป ขนาดของรูพรุนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ agarose ถ้าความเข้มข้นของ agarose มากจะมีขนาดรูพรุนเล็ก แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยจะมีรูพรุนขนาดใหญ่ ขนาดของรูพรุนจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดี

เอ็นเอ กล่าวคือ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าลงในเจลที่มีความเข้มข้นสูง ดังนั้นต้องเลือกความเข้มข้นของ agarose ให้เหมาะสมที่สามารถแยกดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ได้ ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้ agarose ที่มีความเข้มข้น 1.5% โดยในการรันเจลจะนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ไปผสมกับ loading dye (1:6) จากนั้นนำไป run ใน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 60 นาที หลังจากนั้นนำ agarose gel ที่ได้ไป ย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไป ส่องภายใต้แสง UV จากเครื่อง Ultraviolet Transilluminator (Gel DOC) เทียบขนาดของ DNA product ได้จากขนาดของ DNA ladder ซึ่งเป็น marker ที่มีขนาด 100 bp และเปรียบเทียบกับ positive control ซึ่งใช้ stock dengue virus ซีโรไทป์ 2 และเทียบกับ negative control เพื่อยืนยันว่าผลการทดลองไม่ได้เกิดการปนเปื้อน

3.8.6 การโคลนยีนบริเวณ DENV2-NS3 (Cloning DENV2-NS3 region)

ขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA ligation)

เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เราสนใจด้วยวิธี PCR แล้วจะนำยีนที่สนใจมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ชนิด plasmid เรียกว่าขั้นตอน DNA ligation โดยในที่นี้จะเป็นการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR โดยได้ทำการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอของยีน DENV2-NS3 โดยวิธี PCR Amplification และมีเบส A เพิ่มเข้ามาที่ปลาย 3' ของทั้งสองด้าน โดยเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับ TOPO TA Cloning Vector ที่ปลาย 3' ของทั้งสองด้านมีเบส T เพิ่มเข้ามา เรียกว่าดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) และ vector มีขนาด 2817 bp ด้วยเอนไซม์ Topoisomerase I



รูปที่ 9 พลาสมิด pCR 8/GW/TOPO TA Cloning สำหรับ clone ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR (ที่มา: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcr8gwtopo_man.pdf)

การทำ ligation ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป pCR 8/GW/TOPO TA Cloning kit (Invotrogen, USA) และใช้ Mach1-T1 Chemically Competent *E.coli* (Invotrogen, USA) เป็น Competent cell โดยมีขั้นตอนในการโคลน ดังนี้

1. เตรียมสิ่งต่างๆ ดังต่อไปนี้
 - ปรับอุณหภูมิ Incubator ที่ 37 °C
 - ละลาย Mach1-T1 Chemically Competent cell บนน้ำแข็ง
 - เตรียม LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ คือ Spectinomycin 100 µg/ml
2. ผสมส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา ดังตารางที่ 13 เพื่อเตรียม TOPO Cloning reaction โดยผสมให้เข้ากันเบาๆ และ บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง หรือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ

4 °C ประมาณ 12-16 ชั่วโมง ซึ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณของ transformed cell ให้มีจำนวนมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 13 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา DNA ligation (pCR[®] 8/GW/TOPO[®])

Reagents	1X (μl)
PCR product	3
Salt solution	1
DNase/RNase-Free Distilled Water	1
TOPO [®] Vector	1
Total	6 μl

3. แช่ว TOPO Cloning reaction ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อเข้าสู่ขั้นตอน transform ต่อไป

ขั้นตอน Transformation ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ Competent cell โดยวิธีกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

4. เติม TOPO Cloning reaction จากขั้นตอนที่ 3 จำนวน 4 μl ลงในหลอด Mach1-T1 Chemically Competent cell ที่ละลายในน้ำแข็งเรียบร้อยแล้ว และผสมให้เข้ากันเบาๆ (ห้าม mix แรง) เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเกาะที่ permeable site บริเวณผนังเซลล์ของ competent cell
5. จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลานาน 45 วินาที แล้วรีบนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที โดยทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที
6. เติมอาหารเหลว SOC medium ลงไปในหลอด transformant cell 200 μl จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง
7. จากนั้น spread transformant cell ที่ผสมกับ SOC medium ลงบน LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ คือ Spectinomycin 100 μg/ml (antibiotic selection)
8. นำ plate ไปบ่มในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง)

9. ดูลักษณะ colony สีขาว และคัดเลือก colony ไปตรวจสอบ positive clone โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณชิ้น DNA insert หรือ เรียกว่าวิธี Colony PCR ต่อไป

3.8.7 ตรวจสอบการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีนที่สนใจ โดยวิธี Colony PCR

ในการศึกษาการโคลนยีนนี้ ใช้การคัดเลือกโดยวิธี antibiotic selection กล่าวคือ พลาสมิดชนิด TOPO TA Cloning Vector มียีนที่มีลักษณะคือหรือต้านต่อยาปฏิชีวนะ คือ Spectinomycin 100 µg/ml ดังนั้นเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนี้จะสามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB agar ที่มียา Spectinomycin ได้ โคลนของแบคทีเรียที่ได้จะมีสีขาว ทำการสุ่มคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ในแต่ละตัวอย่างมาประมาณ 5-10 โคลน ต่อ 1 plate มาทำการตรวจสอบโคลนด้วยวิธี colony PCR ซึ่งเป็นกระบวนการตรวจสอบโคลนที่ถูกต้องและมียีนที่สนใจ โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจด้วยวิธี PCR ในโคลนที่ทำกรสุ่มคัดเลือก ทั้งนี้วิธีดังกล่าวนี้จะใช้ไพรเมอร์คู่เดิม (DENV2-NS3) ที่ใช้ในกระบวนการเตรียมยีนที่สนใจเพื่อความจำเพาะมากที่สุด โดยเตรียมส่วนประกอบในขั้นตอน PCR ดังตารางที่ 14 จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคโลนีเดี่ยวที่เลือกไว้ในหลอด PCR ที่มี master mix อยู่ ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ไม้จิ้มฟันอันเดิมขีดลงบน plate อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar (master plate) แล้วนำ PCR master mix ไปป่มโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิ (Thermal cycles condition) ดังตารางที่ 15 หลังจากทำ PCR เสร็จแล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อดูว่ามีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจอยู่หรือไม่ โดยดูจากขนาดของแถบดีเอ็นเอ ส่วน master plate หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มีโคโลนีนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อรอนำโคโลนีที่ให้ผลโคลนเป็นบวก (positive) จากการตรวจด้วยวิธี colony PCR แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB broth แบ่งใส่หลอดขนาด 15 ml ให้มีปริมาตรหลอดละ 5 ml และใส่ยา Spectinomycin 100 µg/ml ปริมาตร 5 ml แล้วนำไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อจาก master plate ที่มีชิ้นส่วนของยีนและให้ผลโคลนเป็นบวกใส่ลงในหลอด LB broth ที่เตรียมไว้ นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm นานประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

ตารางที่ 14 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Colony PCR

Reagents	1X (μ l)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	0.8
dNTPs Mix (10 mM of each dNTP)	0.5
10 μ M DENV2-NS3 F	0.25
10 μ M DENV2-NS3 B	0.25
DNase/RNase-Free Distilled Water	20.6
5U/ μ l HotStarTaq DNA Polymerase	0.1
colony	1 colony
Total	25 μl

ตารางที่ 15 แสดงขั้นตอน Colony PCR (Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา
Initial activation step	95	15 minutes
Denature step	94	1 minutes
Annealing step	66	1 minutes
Extension step	72	1 minutes
Final extension step	72	7 minutes

} 30 cycles

3.8.8 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Germany)

1. ก่อนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอให้นำเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่เราเลี้ยงไว้ในปิ่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เวลาประมาณ 3 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง (ปั่นตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 3 ครั้ง)
2. เมื่อได้ส่วนของตะกอนแล้วให้ใส่สาร Solution A ปริมาตร 250 μ l เขย่าโดยใช้ vortex เพื่อทำการละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ใส่สาร Solution B ปริมาตร 250 μ l ผสมขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง

4. ใส่สาร Solution C ปริมาตร 250 μl ผสมชั้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายส่วนใสใส่ลงในชุดตัวกรอง (Spin filter) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง
6. ทำการล้างตะกอนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้สารละลาย wash solution ปริมาตร 750 μl จากนั้นปั่นล้างตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง
7. ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเอา ethanol ที่ยังมีอยู่ออก
8. ย้ายชุดตัวกรองใสลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่สารละลาย elution solution หรืออาจใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลาปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

เมื่อได้พลาสมิดดีเอ็นเอแล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการวัดด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Thermo, USA) โดยมีขั้นตอนในการวัดเช่นเดียวกันกับขั้นตอนของตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของ RNA จากนั้นแบ่งสารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาตร 30 μl เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ต่อไป

3.8.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) บริเวณ DENV2-NS3 จากตัวอย่างผู้ป่วย

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ NS3 ของผู้ป่วยที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยใช้บริการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นตัวแทนในการติดต่อจัดส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตัวอย่างที่ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อย คือ 100-150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีปริมาตรอย่างน้อย 10 μl

3.8.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) บริเวณ DENV2-NS3 จากตัวอย่างผู้ป่วย

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 บริเวณ NS3 เพื่อหาลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย มาวิเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแสดงผลในรูปกราฟ chromatogram จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.2.5 จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนของยีนที่เราต้องการ คือ บริเวณ NS3 ออกจากพลาสมิดเวกเตอร์แล้วบันทึกผลในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม notepad จากนั้นทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม nucleotide blast (BLASTN; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อจำแนกซีโรไทป์และสายพันธุ์ของไวรัสแดงกี โดยโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ DENV2 ที่บริเวณ NS3 กับฐานข้อมูล NCBI (GenBank) แสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความคล้ายคลึง (Percentage identities) จากนั้นทำการ alignment โดยใช้โปรแกรม CLUSTALX เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไวรัสแดงกี ซีโรไทป์ 2 (DENV2) บริเวณ NS3 ซึ่งในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ DENV2 ที่บริเวณ NS3 ในสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน และในช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างแตกต่างกัน ดังนั้น จึงแบ่งการเปรียบเทียบข้อมูลออกเป็น 2 ประเภท คือ การเปรียบเทียบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV2 บริเวณ NS3 ในสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน และการเปรียบเทียบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV2 บริเวณ NS3 ในสิ่งส่งตรวจที่มีช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างแตกต่างกัน

จากนั้นใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA version 6.0) วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการหรือแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree) โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV2 บริเวณ NS3 ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และมีช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างแตกต่างกัน โดยใช้ Neighbor-joining method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-paramrter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ และใช้ Hep C - NS3 เป็น out group

3.8.11 การตรวจหาปริมาณไวรัสแดงกี โดยวิธี Real time RT-PCR

ทำการตรวจหาปริมาณของไวรัสแดงกีในแต่ละสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน และมีช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยวิธี Real time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 เป็นตัวตรวจวัดปริมาณของไวรัส ซึ่งจะเปรียบเทียบกับ standard curve จาก stock virus DENV2 ที่รู้ความเข้มข้นตั้งต้น คือ 4.75×10^6 PFU/ml นำมาเจือจางแบบต่อเนื่อง (serial dilution) ประมาณ 5 ความเข้มข้น โดยมีช่วงค่าความเข้มข้นต่างกันความเข้มข้นละสิบเท่า หรือ \log_{10} แล้วนำ stock virus DENV2 ดังกล่าวมาทำการเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง แยกต่างหาก

จากหลอดทดลองตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ โดยทำการทดลองในลักษณะสามซ้ำ (triplicate) ในแต่ละความเข้มข้น รวมถึงตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย เพื่อสร้างเส้นกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log_{10} ของความเข้มข้นกับค่า Ct ของตัว stock virus DENV2 แต่ละความเข้มข้น ซึ่งกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงแบบถดถอย (linear regression line) การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยสามารถทำได้โดยนำค่า Ct ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน (standard curve จาก stock virus DENV2) ที่สร้างขึ้น [47]

ในการทดลองนี้จะทำการเพิ่มจำนวนปริมาณ RNA ของ DENV2 โดยอาศัย RNA ที่ผ่านการสกัดแล้วเป็นแม่แบบตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) การทำ RT-PCR ในครั้งนี้จะใช้ชุดสำเร็จรูป SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen, USA) คือ ปฏิกิริยา RT และ PCR จะเกิดขึ้นภายในหลอดทดลองเดียวกัน โดยเตรียมส่วนผสมประกอบ Master mix ดังตารางที่ 16 แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นโดยใช้เครื่อง Roter Gene 6000 Real time PCR machine (Corbett Lofe Science, Qiagen, Germany) ปิดฝาแล้วตั้งค่าอุณหภูมิตามขั้นตอนต่างๆ ดังในตารางที่ 17

ตารางที่ 16 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Real time RT-PCR

Reagents	1X (μ l)
2X SYBR Green Reaction Mix	12.5
10 μ M DENV2-NS3 F	1
10 μ M DENV2-NS3 B	1
DNase/RNase-Free Distilled Water	9
SS III RT/Platinum Taq Mix	0.5
RNA template (Unknown extracted RNA/ Standard RNA)	1
Total	25 μl

ตารางที่ 17 แสดงขั้นตอน Real time RT-PCR (Thermal cycles condition)

ขั้นตอน PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
UDG incubation	55	15 minutes
Initial activation step	95	2 minutes
Denature step	94	30 seconds
Annealing step	55	30 seconds
Extension step	72	1 minutes
Final extension step	72	10 minutes

} 40 cycles

Melting Temperature 72-95 °C / 0.5 °C / 30 seconds

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยสามารถทำได้โดยนำค่า Ct ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน (standard curve จาก stock virus DENV2) ที่สร้างขึ้น ผลที่ได้ คือ ปริมาณไวรัส จะรายงานในหน่วย PFU/ml ซึ่งจะเปรียบเทียบกันในรูปแบบของตารางในแต่ละตัวอย่าง และช่วงเวลาที่เก็บ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

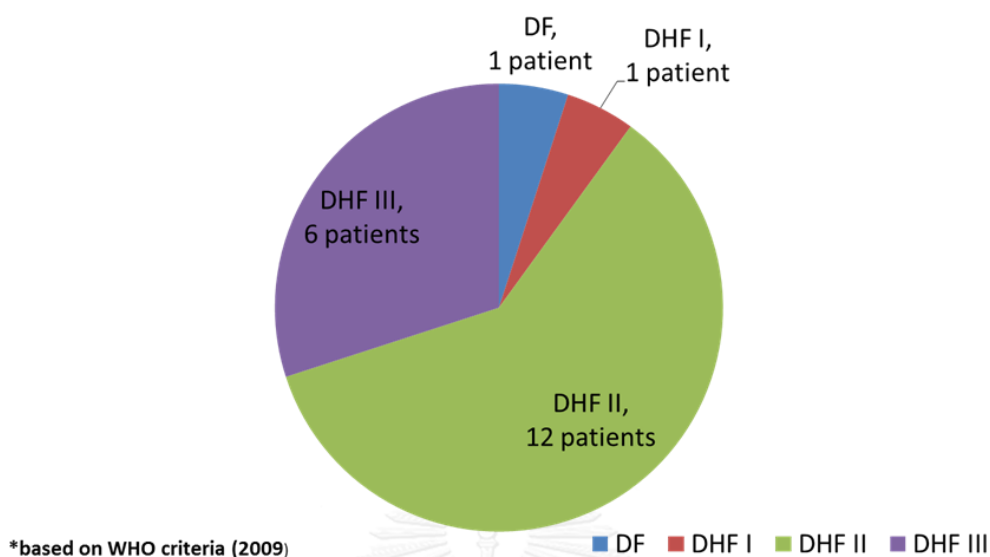
4.1 จำนวนตัวอย่างผู้ป่วย

ทำการสุ่มสิ่งส่งตรวจเหลือใช้จากโครงการงานวิจัยเรื่อง “A feasibility study of using unconventional specimens in dengue diagnosis” ของรองศาสตราจารย์นายแพทย์วันลำ กุลวิจิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาใช้ในการศึกษา ได้แก่ Plasma, PBMC, Serum, Urine, Pellet of urine และ Saliva โดยพิจารณาเลือกใช้สิ่งส่งตรวจที่เก็บใน ช่วงเวลาต่างๆ จากผู้ป่วยไม่จำกัดเพศ อายุไม่เกิน 18 ปี ที่มีไข้สูง และสงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี ผ่านการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี ELISA test และจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยแบ่งตามระดับความรุนแรงของการติดเชื้อตามกฎของ WHO 2009 [50] คือ 1.) กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เดงกี (DF) มีอาการแสดง คือ มีไข้เฉียบพลันร่วมกับอาการปวดศีรษะ มีผื่น ปวดกระบอกตา ปวดเมื่อยตามตัว ปวดข้อหรือปวดกระดูก เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า $WBC \leq 5,000 \text{ cell/mm}^3$, Platelet count $< 150,000 \text{ cell/mm}^3$ และ Hematocrit เพิ่มขึ้น 5-10% 2.) กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออก (DHF) แบ่งจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 เกรด คือ DHF เกรด I มีอาการไข้สูงระยะเวลา 2-7 วัน และให้ผลบวกเมื่อตรวจ tourniquet test และอาจมีภาวะการรั่วซึมของสารน้ำออกมานอกหลอดเลือด (plasma leakage) เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า Platelet count $< 100,000 \text{ cell/mm}^3$ และ Hematocrit เพิ่มขึ้น $\geq 20\%$ DHF เกรด II มีอาการแสดงเช่นเดียวกับ เกรด I ร่วมกับอาการ spontaneous bleeding เช่น มีจุดเลือดออก (petechiae) มีจ้ำเลือด (ecchymoses หรือ purpura) หรือมีเลือดออกจากเยื่อหูทางเดินอาหาร เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า Platelet count $< 100,000 \text{ cell/mm}^3$ และ Hematocrit เพิ่มขึ้น $\geq 20\%$ และ DHF เกรด III II มีอาการแสดงเช่นเดียวกับ เกรด I และ II ร่วมกับมีภาวะการขัดขวางหรือรบกวนการไหลเวียนของเลือด (circulatory failure) เนื่องจากเป็นอาการของภาวะเลือดไปเลี้ยงสมองลดลง pulse pressure $\leq 20 \text{ mmHg}$ เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า Platelet count $< 100,000 \text{ cell/mm}^3$ และ Hematocrit เพิ่มขึ้น $\geq 20\%$ 3.) กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออกแล้วมีภาวะช็อกร่วมด้วย (DSS) เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อแล้วมีอาการเหมือนกลุ่ม DHF แต่มีภาวะช็อกเกิดขึ้นด้วย ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะไม่สามารถวัดความดันโลหิตและชีพจรได้ เมื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่ามีอาการคล้ายกลุ่ม DHF คือ มี Platelet count $< 100,000 \text{ cell/mm}^3$ และ Hematocrit เพิ่มขึ้น $\geq 20\%$ [50]

ตารางที่ 18 ข้อมูลตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกีและตรวจวิเคราะห์โดยวิธี ELISA

No.	Code	Sex	Age (years old)	Clinical diagnosis	ELISA test (type of infection)
1	U7	Male	14	DHF II	Secondary infection
2	U8	Male	9	DHF III	Secondary infection
3	U13	Female	7	DF	Secondary infection
4	U20	Female	13	DHF III	Secondary infection
5	U22	Male	8	DHF III	Secondary infection
6	U23	Male	10	DHF II	Secondary infection
7	U32	Male	9	DHF III	Secondary infection
8	U36	Female	14	DHF II	Secondary infection
9	U59	Female	9	DHF II	Secondary infection
10	U60	Male	10	DHF II	Secondary infection
11	U78	Female	13	DHF II	Secondary infection
12	U96	Female	12	DHF II	Secondary infection
13	U101	Male	6	DHF II	Secondary infection
14	U102	Female	10	DHF II	Secondary infection
15	U107	Male	5	DHF II	Secondary infection
16	U115	Female	11	DHF III	Secondary infection
17	U119	Male	6	DHF III	Secondary infection
18	U120	Male	13	DHF II	Secondary infection
19	U121	Female	9	DHF I	Secondary infection
20	U122	Male	12	DHF II	Secondary infection
21	U15	Male	13	Non-DENV infected patients	ND
22	U18	Female	13		ND
23	U56	Female	18		ND
24	U268	Male	6		ND
25	U301	Female	12		ND

Clinical diagnosis



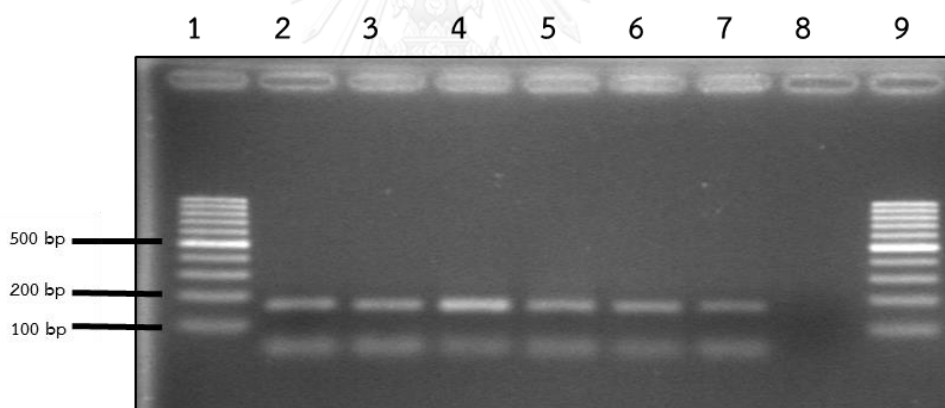
รูปที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อ DENV2 จำแนกตาม WHO criteria

ในการศึกษานี้ทำการสุ่มเลือกตัวอย่างผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA test แล้วให้ผลบวก (กลุ่มศึกษา) จำนวน 20 ตัวอย่าง และให้ผลลบ (กลุ่มควบคุม) จำนวน 5 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 18 แล้วนำตัวอย่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี มาจำแนกการติดเชื้อตามกฎขององค์การอนามัยโลก (WHO criteria 2009) พบว่าผู้ป่วยทั้ง 20 ราย มีการติดเชื้อแบบการติดเชื้อซ้ำครั้งที่สอง (secondary infection) และสามารถจำแนกกลุ่มการติดเชื้อตามอาการทางคลินิกของผู้ป่วยได้ดังนี้ คือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เดงกี (DF) จำนวน 1 ราย และ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออก (DHF) จำนวน 19 ราย โดยแบบกลุ่ม DHF แบ่งออกเป็น 3 class ตามความรุนแรงของอาการได้ คือ DHF I จำนวน 1 ราย DHF II จำนวน 12 ราย และ DHF III จำนวน 6 ราย ดังรูปที่ 10

4.2 ผลการตรวจสอบคุณภาพ RNA

เมื่อนำตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกีมาสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูปแล้ว ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นระหว่าง 100-300 ng/ μ l และมีค่าความเข้มข้นของ RNA (A_{260}/A_{280} ratio) อยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งมีความเข้มข้นเพียงพอที่จะสามารถนำไปเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการต่อไป

และเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้เป็นสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เหลือใช้จากโครงการอื่น ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างมาเป็นเวลานานหลายปี จึงทำการตรวจยืนยันว่าอาร์เอ็นเอของไวรัสไม่ได้ถูกทำลายไปจนหมดสิ้น โดยการตรวจหา housekeeping gene คือ gene β 2- microglobulin (B2M) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นแถบ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 158 bp โดยเปรียบเทียบขนาดของยีนกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp ดังรูปที่ 10



รูปที่ 11 ผลการตรวจสอบยีน β 2- microglobulin ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยมีขนาดประมาณ 158 bp, Lane 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, Lane 2 คือ Positive control (ใช้ตัวอย่างผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจสอบแล้วให้ผลบวก) Lane 3-7 คือ PCR product ที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี Lane 8 คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) (แสดงผลบางส่วน)

ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพปัสสาวะ β 2- microglobulin ในตัวอย่างผู้ป่วย

No.	Code	Plasma	PBMCs	Urine	Saliva
1	U7	+	+	+	+
	U7/2	+	+	+	+
	U7/3	+	+	+	+
2	U8	+	+	+	ND
	U8/2	+	+	+	
	U8/3	+	+	+	
3	U13	+	+	+	+
	U13/2	+	+	+	+
	U13/3	+	+	+	+
4	U20	+	+	+	+
	U20/2	+	+	+	+
	U20/3	+	+	+	+
5	U22	+	+	+	ND
	U22/2	+	+	+	
	U22/3	+	+	+	
6	U23	+	+	+	+
	U23/2	+	+	+	+
	U23/3	+	+	+	+
7	U32	+	+	+	ND
	U32/2	+	+	+	
	U32/3	+	+	+	
8	U36	+	+	+	ND
	U36/2	+	+	+	
	U36/3	+	+	+	
9	U59	+	+	+	ND
	U59/2	+	+	+	
	U59/3	+	+	+	
10	U60	+	+	+	ND

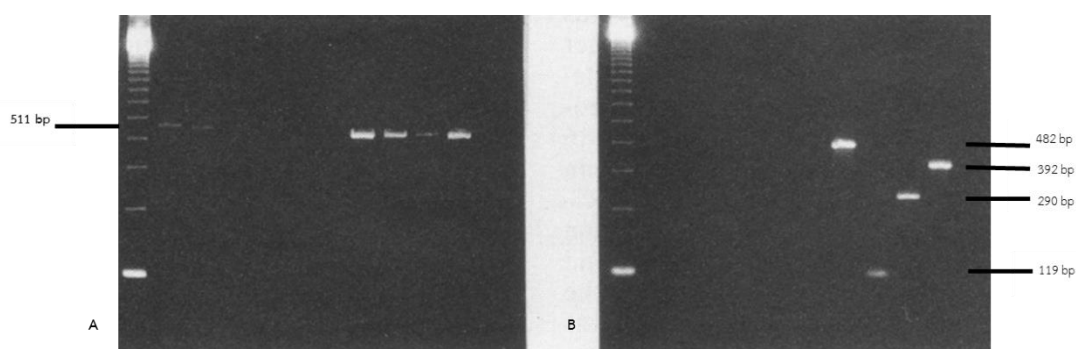
No.	Code	Plasma	PBMCs	Urine	Saliva
	U60/2	+	+	+	
	U60/3	+	+	+	
11	U78	+	+	+	+
	U78/2	+	+	+	+
	U78/3	+	+	+	+
12	U96	+	+	+	ND
	U96/2	+	+	+	
	U96/3	+	+	+	
13	U101	+	+	+	+
	U101/2	+	+	+	+
	U101/3	+	+	+	+
14	U102	+	+	+	ND
	U102/2	+	+	+	
	U102/3	+	+	+	
15	U107	+	+	+	ND
	U107/2	+	+	+	
	U107/3	+	+	+	
16	U115	+	+	+	+
	U115/2	+	+	+	+
	U115/3	+	+	+	+
17	U119	+	+	+	+
	U119/2	+	+	+	+
	U119/3	+	+	+	+
18	U120	+	+	+	+
	U120/2	+	+	+	+
	U120/3	+	+	+	+
19	U121	+	+	+	+
	U121/2	+	+	+	+
	U121/3	+	+	+	ND
20	U122	+	+	+	ND
	U122/2	+	+	+	
	U122/3	+	+	+	

No.	Code	Plasma	PBMCs	Urine	Saliva
21	U15	+	+	+	ND
22	U18	+	+	+	ND
23	U56	+	+	+	ND
24	U268	+	+	+	ND
25	U301	+	+	+	ND

+ = positive, - = negative and ND = not determined

4.3 ผลการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี

เมื่อนำตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกี และผ่านการตรวจยืนยันคุณภาพของอาร์เอ็นเอไวรัส มาทำการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ โดยใช้ Lanciotti protocol ซึ่งเป็น universal primers สำหรับการแยกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี พบว่า เมื่อทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Semi-nested RT-PCR ซึ่งจะใช้การทำ PCR 2 รอบ โดยในรอบแรก PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 511 bp จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จากรอบที่หนึ่ง มาทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมอีกรอบ โดยเปลี่ยน reverse primer ให้สามารถจับจำเพาะ เพื่อแยกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีโดยดูจากขนาดของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน คือ DENV1 มีขนาด 482 bp, DENV2 มีขนาด 119 bp, DENV3 มีขนาด 290 bp และ DENV4 มีขนาด 392 bp แสดงผลในตารางที่ 20 จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจด้วย Lanciotti primers แล้วให้ผลบวก คือ ติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 นำไปทำการศึกษาคความหลากหลายของลำดับเบสบริเวณ NS3 ต่อไป



รูปที่ 12 ผลการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีโดยใช้ Lanciotti primers ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis รูป A เป็นขนาดของ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR รอบแรก โดยมีขนาดประมาณ 511 bp เปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน และ Positive

control คือ DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4 และ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) (แสดงผลบางส่วน) รูป B เป็นขนาดของ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR รอบสอง (Semi-nested PCR) โดยสามารถจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสแดงก็ได้จากขนาด คือ DENV1 มีขนาดประมาณ 482 bp DENV2 มีขนาดประมาณ 119 bp DENV3 มีขนาดประมาณ 290 bp และ DENV4 มีขนาดประมาณ 392 bp เปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน และ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) (แสดงผลบางส่วน)

4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์บริเวณ NS3 ของไวรัสแดงกี ซีโรไทป์ 2

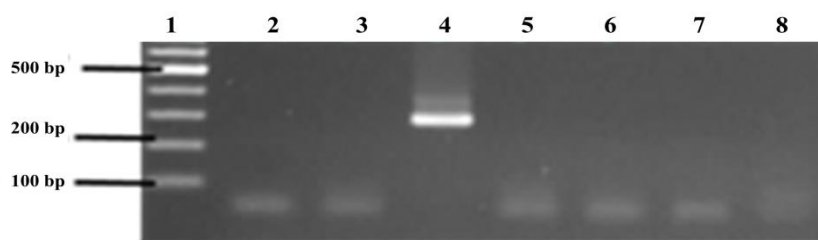
ในการศึกษานี้ต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสแดงกี ซีโรไทป์ 2 (DENV2) ที่บริเวณ NS3 จากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศไทย ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ผู้วิจัยจึงทำการออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อบริเวณ NS3 ของ DENV2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณดังกล่าว โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เลือกลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน DENV2 หลายๆ นิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ในประเทศไทยและประเทศที่อยู่ใกล้เคียง จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.8.1 ทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด แล้วเลือกศึกษาตำแหน่งของบริเวณ NS3 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละเส้น และออกแบบ primers โดยหาบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) หรือบริเวณที่มีความเหมือนมากที่สุดสร้างเป็น forward primers และ reverse primers โดยไพรเมอร์ที่ได้ คือ ATG GAG GAG GCT GGA AGC TG เป็นเส้น forward primers และ TCT GGG TTG TCT TCG ATG CT เป็นเส้น reverse primers และมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 295 bp นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Oligos เพื่อดูว่าไพรเมอร์ไม่ได้จับกันเอง และไม่มีไพรเมอร์ไดเมอร์ (primer dimer) เกิดขึ้น

จากนั้นทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ โดยการหาความจำเพาะ (specificity) และความไวต่ำสุด (sensitivity) ในการตรวจหาไวรัสของไพรเมอร์

4.4.1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะในการตรวจหาไวรัสของไพรเมอร์ DENV2-NS3 (specificity)

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาหาความจำเพาะในการตรวจจับไวรัสแดงกี โดยการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ต่อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ภายในตระกูล Flavivirus ได้แก่ DENV1, DENV2, DENV3, DENV4, JE และ WestNile virus ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้ แล้วนำไปต้มโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิแบบ

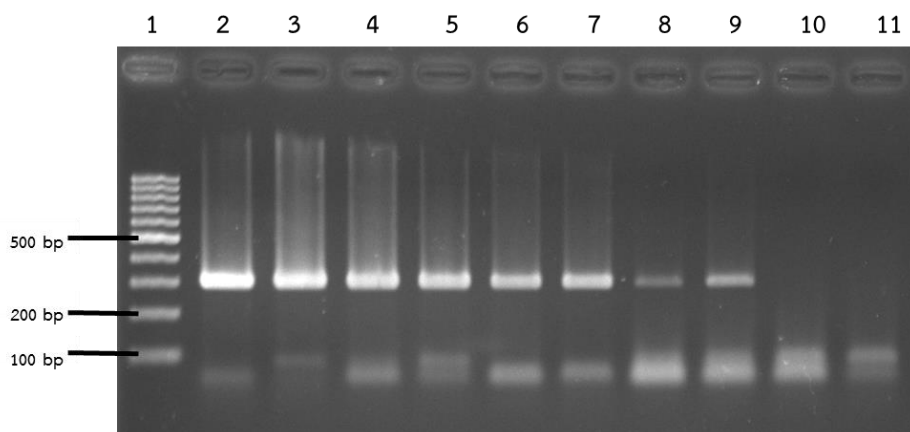
gradient (Gradient Thermal cycles condition) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับไพรเมอร์ จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้สามารถทำปฏิกิริยาภายในหลอดทดลองได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะกับ DENV2 เท่านั้น ไม่สามารถตรวจจับไวรัสสายพันธุ์อื่นในตระกูลเดียวกันได้ ดังรูปที่ 13 จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางลำดับเบสบริเวณ NS3 ของ DENV2 ได้



รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ (Specificity) ในการตรวจหาไวรัสในตระกูล Flaviviruses ของไพรเมอร์ DENV2-NS3 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis, ไพรเมอร์ DENV2-NS3 มีความจำเพาะต่อการตรวจหาไวรัส DENV2 เท่านั้น lane 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, lane 2 คือ negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) lane 3 คือ DENV1, lane 4 คือ DENV2, lane 5 คือ DENV3, lane 6 คือ DENV4, lane 7 คือ JE virus และ lane 8 คือ West Nile virus

4.4.2 ผลการตรวจสอบความไวต่ำสุดในการตรวจหาไวรัสของไพรเมอร์ DENV2-NS3 (sensitivity)

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ DENV2 แล้วจึงทำการตรวจหาประสิทธิภาพของการตรวจหาปริมาณไวรัสต่ำสุด เพื่อจะได้นำไปใช้ตรวจสอบในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีปริมาณไวรัสน้อยๆ ได้ โดยในการศึกษานี้เมื่อนำ stock ของไวรัสแดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่รู้ความเข้มข้นเริ่มต้น คือ 4.75×10^6 PFU/ml มาทำการเจือจางในรูปแบบ 10-fold serial dilution แล้วทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 ที่ออกแบบได้ นำไปป้อนโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ตั้งอุณหภูมิ (Thermal cycles condition) ดังตารางที่ 12 จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อดูความเข้มข้นต่ำสุดของไวรัสที่ไพรเมอร์สามารถตรวจจับได้ พบว่าไพรเมอร์ DENV2-NS3 มีความไวต่ำสุด (sensitivity) ที่สามารถตรวจหาปริมาณไวรัสได้ที่ 4.75×10^{-1} หรือ 0.475 PFU/ml ดังภาพที่ 14



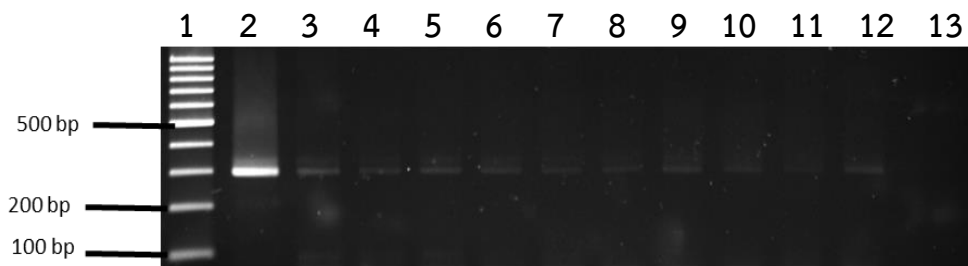
รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบความไวต่ำสุด (Sensitivity)

ในการตรวจหาไวรัสเดงกีของไพรเมอร์ DENV2-NS3 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเจือจาง stock virus DENV2 ในรูปแบบ 10-fold serial dilution พบว่าไพรเมอร์มีความไวต่ำสุดในการตรวจหาไวรัส DENV2-NS3 ที่ 4.75×10^{-1} PFU/ml, lane 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, lanes 2-10 คือ ไวรัส DENV2 ที่เจือจางในรูปแบบ 10-fold serial dilution (lane 2 = 4.75×10^6 PFU/ml, lane 3 = 4.75×10^5 PFU/ml, lane 4 = 4.75×10^4 PFU/ml, lane 5 = 4.75×10^3 PFU/ml, lane 6 = 4.75×10^2 PFU/ml, lane 7 = 4.75×10^1 PFU/ml, lane 8 = 4.75×10^0 PFU/ml, lane 9 = 4.75×10^{-1} PFU/ml, lane 10 = 4.75×10^{-2} PFU/ml), lane 11 คือ negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ)

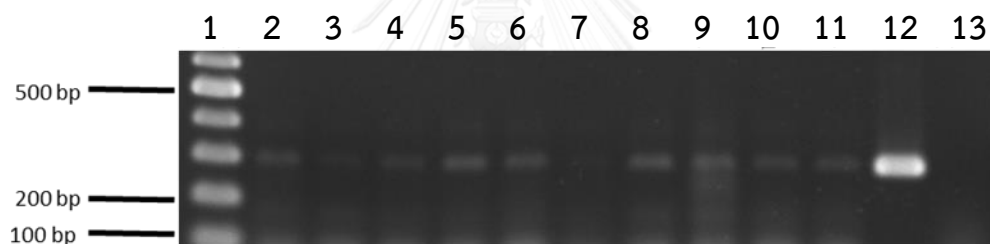
4.4.3 ผลการตรวจหาไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่บริเวณ NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วย

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ DENV2 ที่บริเวณ NS3 แล้วจึงนำไปใช้ตรวจหาไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วย เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสต่อไป

โดยในการศึกษานี้อาศัยการเพิ่มจำนวนไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 ภายใต้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีสภาวะเหมาะสม ซึ่งอธิบายไว้ในบทที่ 3 วิธีการทดลอง หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยจะมีขนาดของ PCR product ประมาณ 295 bp เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp ดังรูปที่ 15 และ 16 และสรุปผลการทดลองของตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบหาปริมาณไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่บริเวณ NS3 ด้วยไพรเมอร์ DENV2-NS3 ไว้ในตารางที่ 20



รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบไวรัสเดงกี DENV2-NS3 ในตัวอย่างเลือด (Plasma, PBMCs) ของผู้ป่วย ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis, lane 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, lane 2 คือ Positive control (ใช้ stock virus dengue ที่เจือจาง), lanes 3-12 คือ ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี, lane 13 คือ negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) (แสดงผลบางส่วน)



รูปที่ 16 ผลการตรวจสอบไวรัสเดงกี DENV2-NS3 ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis, lane 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, lanes 2-11 คือ ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี, lane 12 คือ Positive control (ใช้ stock virus dengue ที่เจือจาง), lane 13 คือ negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) (แสดงผลบางส่วน)

ตารางที่ 20 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยเทคนิค PCR

No.	Code	Plasma		PBMCs		Urine		Saliva	
		Lancioti	DENV2-NS3	Lancioti	DENV2-NS3	Lancioti	DENV2-NS3	Lancioti	DENV2-NS3
1	U7	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U7/2	+	+	+	+	+	+		
	U7/3	+	+	+	+	+	+		
2	U8	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U8/2	+	+	+	+	-	-		
	U8/3	+	+	+	+	-	-		
3	U13	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U13/2	+	+	+	+	+	+		
	U13/3	+	+	+	+	+	+		
4	U20	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U20/2	+	+	+	+	+	+		
	U20/3	+	+	+	+	-	-		
5	U22	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U22/2	+	+	+	+	+	+		
	U22/3	+	+	+	+	-	-		
6	U23	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U23/2	+	+	+	+	+	+		
	U23/3	+	+	+	+	+	+		
7	U32	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U32/2	+	+	+	+	+	+		
	U32/3	+	+	+	+	+	-		
8	U36	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U36/2	+	+	+	+	+	+		
	U36/3	+	+	+	+	-	-		
9	U59	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U59/2	+	+	+	+	+	+		

No.	Code	Plasma		PBMCs		Urine		Saliva	
		Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3
	U59/3	+	+	+	+	+	-		
10	U60	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U60/2	+	+	+	+	+	+		
	U60/3	+	+	+	+	-	-		
11	U78	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U78/2	+	+	+	+	+	-		
	U78/3	+	+	-	-	+	-		
12	U96	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U96/2	+	+	+	+	+	+		
	U96/3	+	+	+	+	+	+		
13	U101	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U101/2	+	+	+	+	+	+		
	U101/3	+	+	-	+	-	-		
14	U102	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U102/2	+	+	+	+	+	+		
	U102/3	+	+	+	+	-	-		
15	U107	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U107/2	+	+	+	+	+	+		
	U107/3	+	+	-	+	+	-		
16	U115	+	+	+	+	+	+	+	+
	U115/2	+	+	+	+	+	+	-	-
	U115/3	+	+	+	+	+	+	-	-
17	U119	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U119/2	+	+	+	+	+	+		
	U119/3	+	+	+	+	+	+		
18	U120	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U120/2	+	+	+	+	+	+		
	U120/3	+	+	-	-	-	-		

No.	Code	Plasma		PBMCs		Urine		Saliva	
		Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3
19	U121	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U121/2	+	+	+	+	+	+		
	U121/3	-	-	-	-	-	-		
20	U122	+	+	+	+	+	+	ND	ND
	U122/2	+	+	+	+	+	+		
	U122/3	+	+	+	-	-	-		
21	U15	-	-	-	-	-	-	ND	ND
22	U18	-	-	-	-	-	-	ND	ND
23	U56	-	-	-	-	-	-	ND	ND
24	U268	-	-	-	-	-	-	ND	ND
25	U301	-	-	-	-	-	-	ND	ND

+ = positive, - = negative and ND = not determined

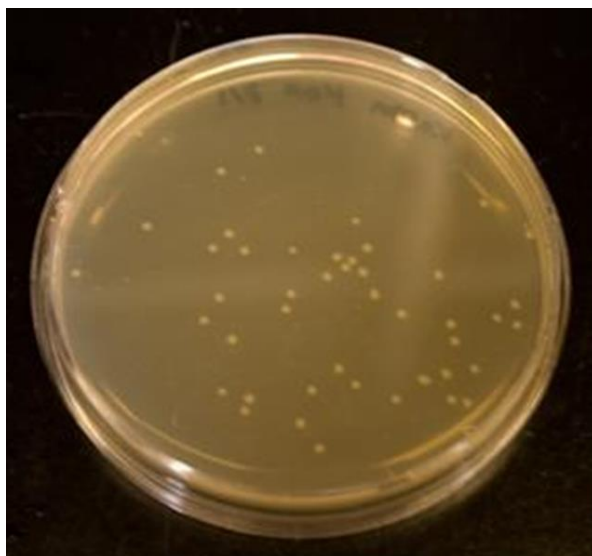
ตารางที่ 21 สรุปผลการตรวจหาไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วยด้วยเทคนิค PCR

Plasma		PBMCs		Urine		Saliva	
Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3	Lanciotti	DENV2-NS3
98.3% (59/60)	98.3% (59/60)	91.7% (55/60)	93.3% (56/60)	81.7% (49/60)	73.3% (44/60)	33.3% (1/3)	33.3% (1/3)

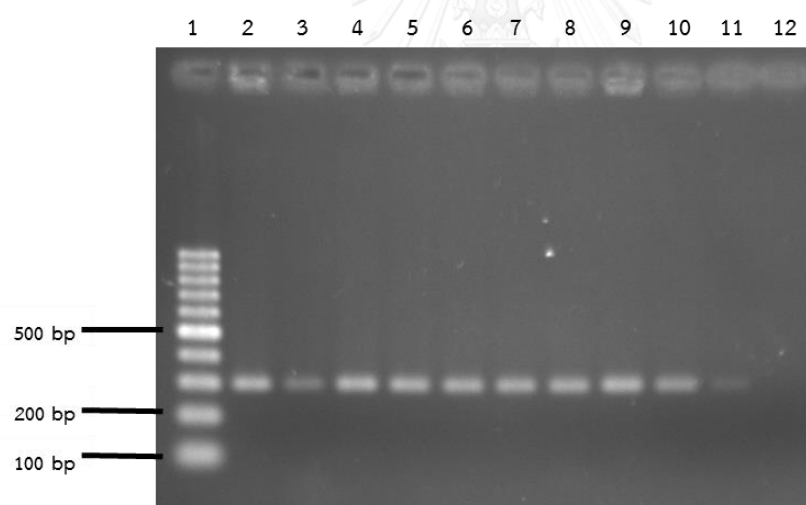
ทำการคัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อไพรเมอร์ Lanciotti และเมื่อจำแนกซีโรไทป์พบว่า เป็นไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 แล้วนำมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ NS3 คือ DENV2-NS3 คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรไวรัสต่อไป

4.5 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ DENV2-NS3 โดยเทคนิค Colony PCR

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนยีนของ DENV2 บริเวณ NS3 ด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ PCR product ของยีน DENV2 ที่บริเวณ NS3 ซึ่งมีขนาดประมาณ 295 bp และมีเบส A เพิ่มเข้ามาที่ปลาย 3' ของทั้งสองด้าน ทำการเชื่อมต่อยีนของ DENV2-NS3 เข้ากับ TOPO TA Cloning Vector ที่ปลาย 3' ของทั้งสองด้านมีเบส T เพิ่มเข้ามา เรียกว่าดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) และ vector มีขนาด 2817 bp ด้วยเอนไซม์ Topoisomerase I การทำ ligation ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป pCR 8/GW/TOPO TA Cloning kit (Invotrogen, USA) ขั้นตอนในการทดลองและสารเคมีที่ใช้อธิบายในบทที่ 3 วิธีการทดลอง จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cell โดยเลือกใช้ Mach1-T1 Chemically Competent *E.coli* (Invotrogen, USA) กระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) จากนั้นทำการตรวจสอบโคลนโดยการคัดเลือก colony ของแบคทีเรียที่มีสีขาว ซึ่งในการศึกษาการโคลนยีนนี้ ใช้การคัดเลือกโดยวิธี antibiotic selection กล่าวคือ พลาสมิดชนิด TOPO TA Cloning Vector จะมียีนที่มีลักษณะดื้อหรือต้านต่อยาปฏิชีวนะ คือ Spectinomycin ดังนั้นเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนี้จะสามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB agar ที่มียา Spectinomycin ได้ โคลนีของแบคทีเรียที่ได้จึงมีสีขาวซึ่งคาดว่าน่าจะมี insert gene (DENV2-NS3) (รูปที่ 17) ทำการสุ่มคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว มาตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค colony PCR ซึ่งเป็นกระบวนการตรวจสอบโคลนที่ถูกต้องและยืนยันว่ามียีนที่สนใจอยู่ โดยเตรียมสารในปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในบทที่ 3 วิธีการทดลอง นำไปป้อนโดยใช้เครื่อง Thermal cycle ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเหมือนการเพิ่มจำนวนยีน DENV2-NS3 ด้วยวิธี PCR เพียงแต่การทำ colony PCR จะใช้ colony ของแบคทีเรียแทนดีเอ็นเอต้นแบบ หลังจากทำ colony PCR เสร็จแล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็นโคลนที่มีขนาดประมาณ 295 bp โดยเปรียบเทียบขนาดของยีนกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (รูปที่ 18) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าโคลนที่ได้มีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจอยู่



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar

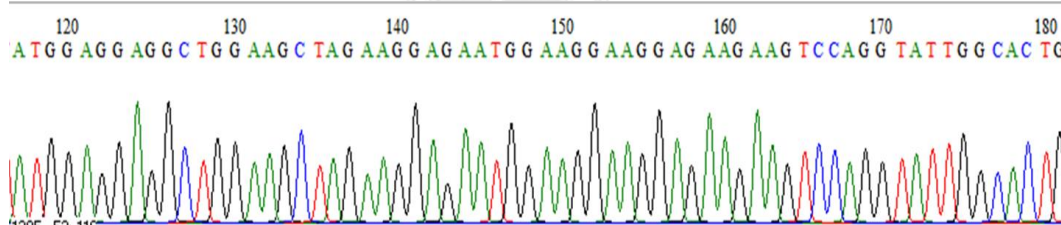


รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วน DENV2-NS3

ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis, lane 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, lanes 2-11 คือ ตัวอย่างโคลนพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ DENV2-NS3, lane 12 คือ negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) (แสดงผลบางส่วน)

4.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลจากการตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนของ DENV2-NS3 ของตัวอย่างผู้ป่วยด้วยเทคนิค colony PCR นำโคลนที่มีชิ้นส่วนของ DENV2-NS3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ แล้ววัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยตัวอย่างที่จะนำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100-150 µg/µl และมีปริมาตรอย่างน้อย 10 µl แล้วส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นตัวแทนในการติดต่อจัดส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ primer M13 (5'GTAAAACGACGGCCAG3') และส่งเพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างละ 5 โคลน เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ sequencing มาแล้วจะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram (รูปที่ 19) จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.2.5 แต่เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับเบสนั้นมีบางส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์อยู่บริเวณหัวและท้ายของเส้นนิวคลีโอไทด์จึงต้องตัดออก เก็บเฉพาะส่วนของยีนที่เราต้องการ คือ บริเวณ DENV2-NS3 แล้วบันทึกผลไว้ในโปรแกรม notepad



รูปที่ 19 แสดงผลจากการทำ DNA Sequencing ในรูปกราฟ chromatogram ของ DENV2-NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วย (แสดงผลบางส่วน)

เมื่อวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัดส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ออกแล้ว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV2-NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วยมีขนาด 295 bp นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการทำ multiple sequence alignment (รูปที่ 20) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 (DENV2) บริเวณ NS3 ในแต่ละตัวอย่างของผู้ป่วย โดยผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงไว้ในภาคผนวก

ตารางที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดความหลากหลายของลำดับเบสในตัวอย่างผู้ป่วย

	1 st collection	2 nd collection	3 rd collection
Plasma	10.53% (10/95)	20% (19/95)	15.79% (15/95)
PBMCs	2.10% (2/95)	5.26% (5/95)	7.37% (7/95)
Urine	5.26% (5/95)	18.18% (10/55)	15% (6/40)
Saliva	0% (0/5)	ND	ND

จากตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดความหลากหลายของลำดับเบสในตัวอย่างผู้ป่วย พบว่า plasma มีความหลากหลายของลำดับเบสมากที่สุด เมื่อเทียบกับสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น และช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จะเป็นเวลาที่เจอความหลากหลายของลำดับ หรือ nucleotide variation มากที่สุด

	210	220	230	240	250	260	270	280	290
U119Plasmaa	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasmab	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasmac	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasmad	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasmae	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/2a	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/2b	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/2c	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/2d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/2e	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/3a	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/3b	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/3c	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/3d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Plasma/3e	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMca	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMcb	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMcc	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMcd	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMce	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/2a	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/2b	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/2c	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/2d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/2e	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/3a	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/3b	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/3c	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/3d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119PBMc/3e	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urinea	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urineb	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urinec	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urinee	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/2a	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/2b	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/2c	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/2d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/2e	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/3a	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/3b	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/3c	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/3d	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119Urine/3e	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119salivaa	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119salivab	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119salivac	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119salivad	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
U119salivae	201	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	295						
Clustal Consensus	200	CTTGTGGGCTTTATGGTAAAGCTCTTGTACAGCACTGCAGCATAATCGGGTGCATAGGCCACACTC	294						

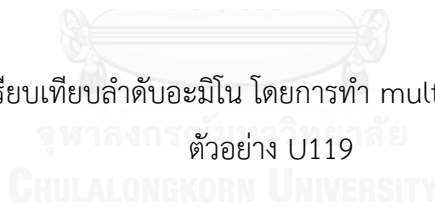
รูปที่ 20 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส โดยการทำให้ multiple sequence alignment ของ ตัวอย่าง U119

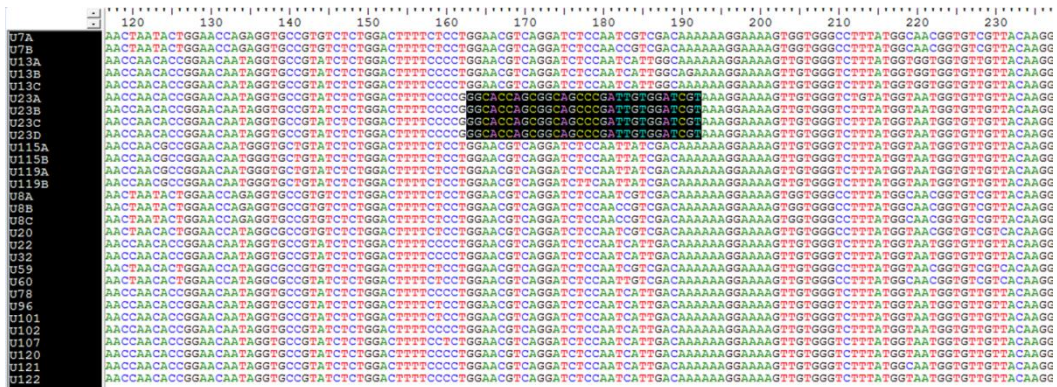


	10	20	30	40	50	60	70	80	90
U119Plaemaa	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasmab	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasmac	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasmad	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasmae	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/2a	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/2b	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/2c	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/2d	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/2e	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/3a	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/3b	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/3c	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/3d	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Plasma/3e	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMca	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMcb	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMcc	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMcd	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMce	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/2a	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/2b	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/2c	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/2d	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/2e	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/3a	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/3b	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/3c	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/3d	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119PBMc/3e	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urinea	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urineb	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urinec	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urinead	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urinee	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/2a	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/2b	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/2c	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/2d	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/2e	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/3a	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/3b	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/3c	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/3d	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119Urine/3e	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119salivaa	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119salivab	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119salivac	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119salivad	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
U119salivae	1	MEEAGCWKNGRKRKKSRYWNSLERICEPSKRNIVFSKPTPECVLYIWTFLERCDLQLSTKKRIWVAVVLLQCVVEWVWVWVPRKFASTTCX	99						
Clustal Consensus	1	XX	99						

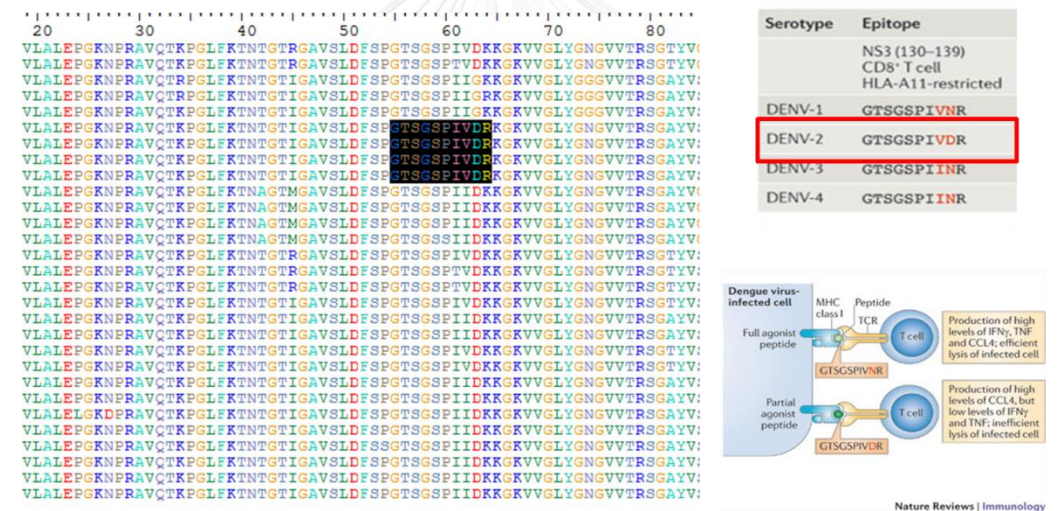
รูปที่ 21 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับอะมิโน โดยการทำให้ multiple sequence alignment ของ

ตัวอย่าง U119





รูปที่ 22 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของตัวอย่างผู้ป่วยกับข้อมูลอ้างอิง โดยทำการเลือกตัวแทนของลำดับเบสที่เหมือนกันมาจากตัวอย่างผู้ป่วยแต่ละราย นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิง



รูปที่ 23 แสดงลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างผู้ป่วย U23 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง

เมื่อศึกษาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีผู้ป่วย 1 ราย ที่มีลำดับกรดอะมิโน เหมือนกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Rothman A.L. [51] ซึ่งเคยรายงานว่าลำดับกรดอะมิโนของไวรัส เดงกีที่มีรูปแบบเป็น GTSGSPIVDR จะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ซึ่งจากการศึกษา ตัวอย่างผู้ป่วยรายที่พบว่าลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับรูปแบบอ้างอิงนั้น เมื่อดูข้อมูลอื่นๆ ทางคลินิก ของผู้ป่วยรายดังกล่าวร่วมด้วยควบคู่กันไปกับข้อมูลของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโน พบว่าผู้ป่วย รายดังกล่าวที่เราพบไม่ได้มีอาการแสดงออกทางคลินิกแตกต่างจากผู้ป่วยรายอื่น จึงยังสรุปไม่ได้ว่า

ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณดังกล่าวนี้ มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคหรือไม่? ซึ่งอาจจะต้องทำการศึกษาต่อไป

4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ DENV2-NS3 ในตัวอย่างผู้ป่วยกับฐานข้อมูล NCBI

เมื่อได้ลำดับเบส DENV2-NS3 ของตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้ทำการตัดแต่งเรียบร้อยแล้วจะนำมาทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV ที่มีการเก็บสะสมอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ nucleotide blast (BLASTN; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อจำแนกซีโรไทป์และสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี โดยโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV2 ที่บริเวณ NS3 กับฐานข้อมูล NCBI (GenBank) แสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความคล้ายคลึง (Percentage identities) แสดงผลดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างผู้ป่วย DENV2-NS3 กับฐานข้อมูล NCBI

Code	ขนาดยีน (bp)	% Identity	อ้างอิง	สายพันธุ์
U7A	295	98	KC762680.1	Dengue virus 2 isolate MKS-WS80, complete genome
U7B	295	98	KC762680.1	Dengue virus 2 isolate MKS-WS80, complete genome
U8A	295	98	EU081180.1	Dengue virus type 2 strain D2/SG/05K4155DK1/2005, complete genome
U8B	295	97	EU081180.1	Dengue virus type 2 strain D2/SG/05K4155DK1/2005, complete genome
U13A	295	98	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome
U13B	295	97	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome

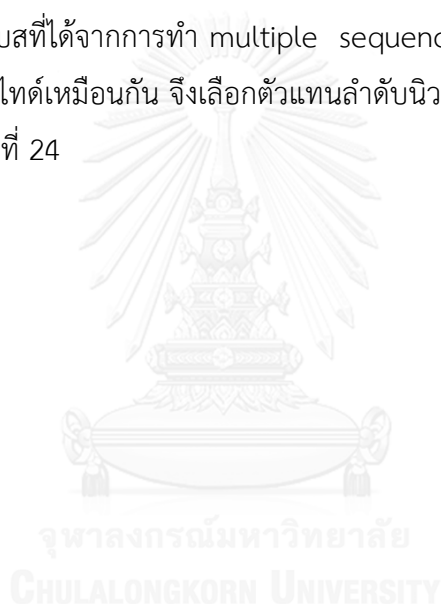
U13C	295	98	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome
U20	295	100	EU081180.1	Dengue virus type 2 strain D2/SG/05K4155DK1/2005, complete genome
U22	295	99	FJ744720.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/TH/BID-V2306/2001, complete genome
U23A	295	99	JN819418.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/VN/BID-V2947/1988, complete genome
U23B	295	99	JN819418.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/VN/BID-V2947/1988, complete genome
U23C	295	99	JN819418.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/VN/BID-V2947/1988, complete genome
U23D	295	99	JN819418.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/VN/BID-V2947/1988, complete genome
U32	295	99	EU687246.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/TH/BID-V1498/1994, complete genome
U59	295	100	EU081180.1	Dengue virus type 2 strain D2/SG/05K4155DK1/2005, complete genome
U60	295	100	AY858036.2	Dengue virus 2 strain TB16i, complete genome (Indonesia: Jakarta)
U78	295	100	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain

				ThD2_0026_88, complete genome
U96	295	99	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome
U101	295	99	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome
U102	295	99	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome
U107	295	99	DQ181802.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0026_88, complete genome
U115A	295	97	GQ868591.1	Dengue virus 2 isolate DENV- 2/TH/BID-V3357/1964, complete genome
U115B	295	97	GQ868591.1	Dengue virus 2 isolate DENV- 2/TH/BID-V3357/1964, complete genome
U119A	295	98	GQ868591.1	Dengue virus 2 isolate DENV- 2/TH/BID-V3357/1964, complete genome
U119B	295	98	GQ868591.1	Dengue virus 2 isolate DENV- 2/TH/BID-V3357/1964, complete genome
U120	295	99	DQ181798.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0055_99, complete genome
U121	295	99	DQ181800.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0263_95, complete genome
U122	295	99	DQ181798.1	Dengue virus type 2 strain ThD2_0055_99, complete genome

4.8 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

งานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA version 6.0) วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree, แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม) โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DENV2 บริเวณ NS3 ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจที่ต่างชนิดกัน และมีช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างแตกต่างกัน โดยใช้ Maximum likelihood method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ GTR+G+I model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ และใช้ Hep C - NS3 เป็น out group

เนื่องจากลำดับเบสที่ได้จากการทำ multiple sequence alignment จากตัวอย่างผู้ป่วยส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน จึงเลือกตัวแทนลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างมาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ดังรูปที่ 24



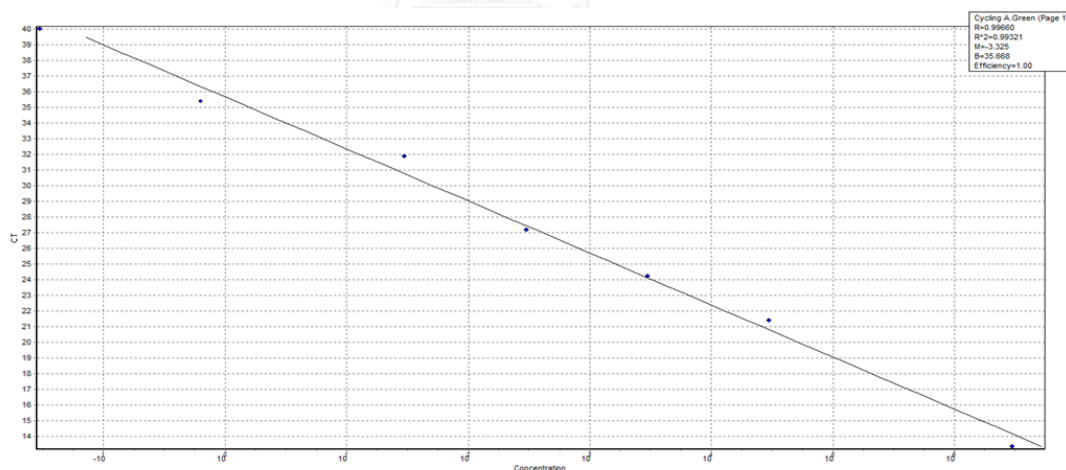
Sequence Identity Matrix
Input Alignment File: Unitted

Seq->	U7A	U7B	U13A	U13B	U13C	U23A	U23B	U23C	U23D	U115A	U115B	U115A	U119A	U119B	U8A	U8B	U8C	U20	U22	U32	U59	U60	U78	U96	U101	U102	U107	U120	U121	U122					
U7A	ID																																		
U7B		ID																																	
U13A			ID																																
U13B				ID																															
U13C					ID																														
U23A						ID																													
U23B							ID																												
U23C								ID																											
U115A									ID																										
U115B										ID																									
U119A											ID																								
U119B												ID																							
U8A													ID																						
U8B														ID																					
U8C															ID																				
U20																																			
U22																																			
U32																																			
U59																																			
U60																																			
U78																																			
U96																																			
U101																																			
U102																																			
U107																																			
U120																																			
U121																																			
U122																																			

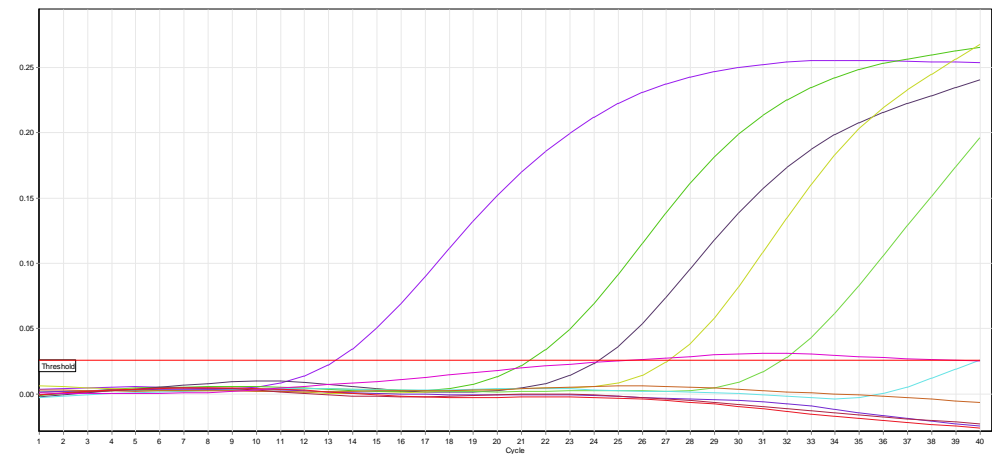
ตารางที่ 24 แสดงผล Identity matrix

4.9 ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกี โดยวิธี Real time RT-PCR

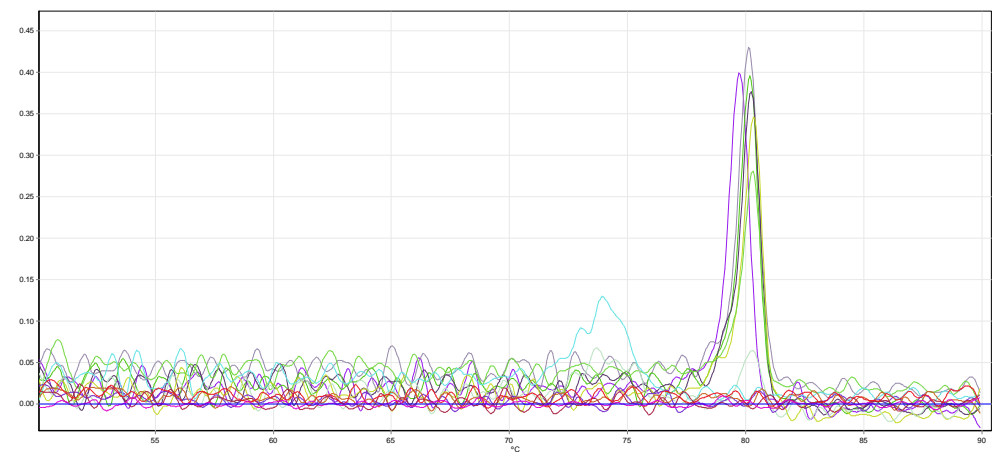
ผลการตรวจหาปริมาณของไวรัสเดงกีในแต่ละสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน และมีช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยวิธี Real time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และใช้ไพรเมอร์ DENV2-NS3 เป็นตัวตรวจวัดปริมาณของไวรัส ซึ่งจะเปรียบเทียบผลกับ standard curve จาก stock virus DENV2 ที่รู้ความเข้มข้นตั้งต้น คือ 4.75×10^6 PFU/ml นำมาเจือจางแบบต่อเนื่อง (serial dilution) โดยมีช่วงค่าความเข้มข้นต่างกันความเข้มข้นละสิบเท่า หรือ \log_{10} แล้วนำ stock virus DENV2 ดังกล่าวมาทำการเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง แยกต่างหากจากหลอดทดลองตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ โดยทำการทดลองในลักษณะสามซ้ำ (triplicate) ในแต่ละความเข้มข้น รวมถึงตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย เพื่อสร้างเส้นกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log_{10} ของความเข้มข้นกับค่า Ct ของตัว stock virus DENV2 แต่ละความเข้มข้น ซึ่งกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงแบบถดถอย (linear regression line) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.99321 (รูปที่ 24) การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยสามารถทำได้โดยนำค่า Ct ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน (standard curve จาก stock virus DENV2) ที่สร้างขึ้น แสดงผลปริมาณไวรัสเดงกีดังตารางที่ 25



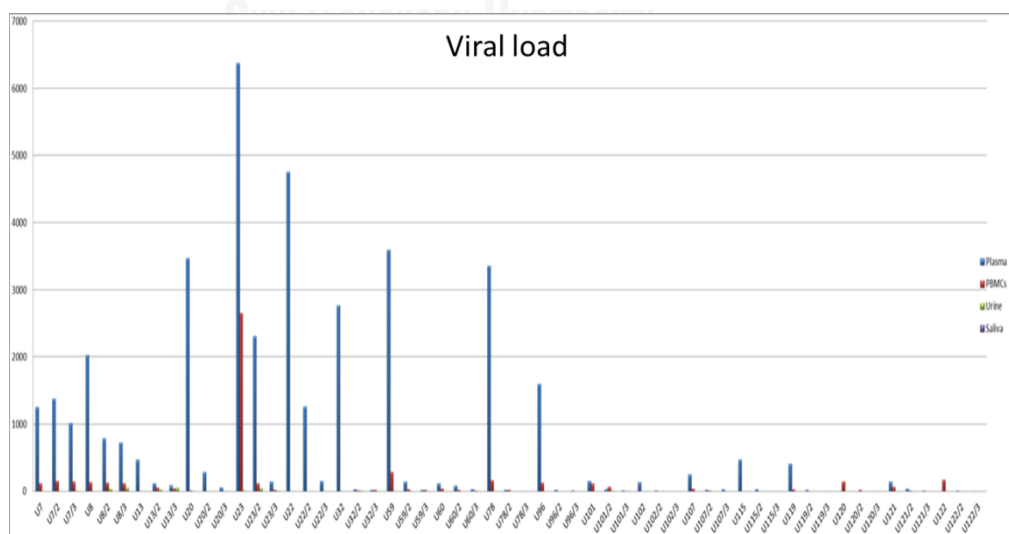
รูปที่ 25 เส้นกราฟมาตรฐานของไวรัสเดงกีที่สร้างขึ้น โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.99321



รูปที่ 26 แสดงกราฟ amplification plot

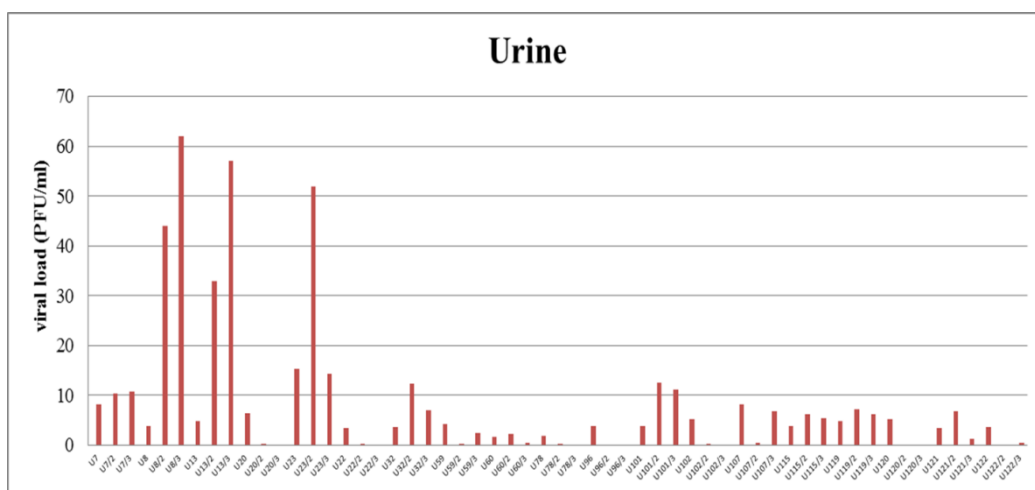


รูปที่ 27 แสดงกราฟ melting curve analysis



รูปที่ 28 แสดงผลการศึกษหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างผู้ป่วยโดยวิธี qRT-PCR

โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve; รูปที่ 24) ซึ่งใช้ stock virus ที่มีความเข้มข้นตั้งต้น 4.75×10^6 มาทำการเจือจางแบบ 10 fold serial dilution จากการศึกษาพบว่าปริมาณไวรัสในตัวอย่างเลือดจะมีค่าสูงในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่าง และจะค่อยๆ ลดลงในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 ทั้งนี้เนื่องถูกกำจัดด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่ในตัวอย่างปัสสาวะ ในช่วงแรกๆ จะเจอปริมาณไวรัสที่น้อย และมีแนวโน้มเพิ่มปริมาณสูงขึ้นในการเก็บตัวอย่างช่วงระยะหลัง โดยปริมาณไวรัสสูงที่สุดที่ตรวจพบจะเจอในตัวอย่าง plasma



U13	470	2.62	4.76	ND
U13/2	122	56	33	ND
U13/3	92	43	57	ND
U20	3470	15.5	6.44	ND
U20/2	292	3.41	0.248	ND
U20/3	61.4	4.91	-	ND
U23	6380	2660	15.32	ND
U23/2	2312	124.2	52	ND
U23/3	146	26.7	14.3	ND
U22	4760	5.76	3.5	ND
U22/2	1265	-	0.203	ND
U22/3	154	-	-	ND
U32	2770	1.06	3.57	ND
U32/2	31.30	18.18	12.34	ND
U32/3	21.44	21.17	6.98	ND
U59	3600	292	4.33	ND
U59/2	148	36.9	0.32	ND
U59/3	23.44	21.84	2.44	ND
U60	120	45	1.66	ND
U60/2	87	23.1	2.25	ND
U60/3	30.3	14.3	0.461	ND
U78	3360	161	1.84	ND
U78/2	21.4	23.34	0.34	ND
U78/3	3.64	2.13	-	ND
U96	1600	132	3.78	ND
U96/2	24.22	7.15	-	ND
U96/3	17.15	-	-	ND
U101	159	121	3.83	ND
U101/2	31.84	72.8	12.48	ND
U101/3	19.1	0.25	11.22	ND

U102	138	7.99	5.15	ND
U102/2	16.3	-	0.28	ND
U102/3	-	-	-	ND
U107	257	44	8.19	ND
U107/2	27.15	12.1	0.45	ND
U107/3	29.22	0.45	6.78	ND
U115	473	9.65	3.9	0.05
U115/2	31.84	-	6.2	-
U115/3	0.35	-	5.34	-
U119	414	32.3	4.76	ND
U119/2	21.5	0.45	7.2	ND
U119/3	-	-	6.31	ND
U120	8.49	145	5.32	ND
U120/2	-	21.40	-	ND
U120/3	1.43	-	-	ND
U121	145	69.7	3.5	ND
U121/2	40.00	12.27	6.90	ND
U121/3	13.34	-	1.2	ND
U122	5.95	176	3.71	ND
U122/2	14.92	3.39	-	ND
U122/3	0.85	1.65	0.55	ND

+ = positive, - = negative and ND = not determined

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไข้เลือดออกเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยมานานกว่า 50 ปี และปัจจุบันกำลังกลายเป็นปัญหาระดับโลก เนื่องจากไวรัสเดงกีได้แพร่ระบาดเข้าไปมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลก ส่งผลให้มีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นทุกปี แต่ยังไม่ปรากฏการรักษาที่จำเพาะและไม่มียาหรือวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรค จึงต้องรักษาไปตามอาการของผู้ป่วย ทั้งนี้เนื่องจากยังขาดสัตว์ทดลอง (animal models) ที่สามารถใช้แทนมนุษย์ได้และขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิสภาพในการก่อโรคหรือความรุนแรงของโรค การศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อใช้อธิบายให้เข้าใจถึงกลไกการก่อโรค การเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาความหลากหลายของลำดับเบส บริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออก ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเลือดและสารคัดหลั่งต่างๆ ในผู้ป่วยไทย โดยทำการสุ่มเลือกสิ่งส่งตรวจเหลือใช้จากโครงการวิจัยเรื่อง “A feasibility study of using unconventional specimens in dengue diagnosis” ของรองศาสตราจารย์นายแพทย์วันลา กุลวิจิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการศึกษา โดยเลือกศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่มีอายุไม่เกิน 18 ปี และมีการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 แบบเฉียบพลันเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานข้อมูลของกลุ่มระบาดวิทยาและข่าวกรอง สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค พบว่า การระบาดของไวรัสเดงกีในประเทศไทยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อซีโรไทป์ 2 และเมื่อจำแนกกลุ่มเสี่ยงที่มีการติดเชื้อมากที่สุด พบว่าอยู่ในช่วงอายุ 5-24 ปี โดยพบผู้ป่วยทั้งในกลุ่มอาการ DF, DHF และ DSS [6] ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวอย่างผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยว่ามีเชื้อไวรัสเดงกีด้วยเทคนิค ELISA test จำนวนทั้งหมด 25 ราย โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวน 20 ราย ซึ่งเป็นเพศหญิง 9 ราย เพศชาย 11 ราย และกลุ่มตัวอย่างควบคุม 5 ราย ซึ่งเป็นเพศหญิง 3 ราย และเพศชาย 2 ราย โดยตัวอย่างทั้งสองกลุ่มอยู่ในช่วงอายุ 5-18 ปี และจากการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค ELISA test ข้างต้นสามารถจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีตามกฎขององค์การอนามัยโลกได้เป็นกลุ่มตามความรุนแรง คือ กลุ่ม DF พบจำนวน 1 ราย และ กลุ่ม DHF พบจำนวน 19 ราย จำแนกเป็น Class ต่างๆ ได้ ดังนี้ Class I มี 1 ราย Class II มี 12 ราย และ Class III มี 6 ราย

จากนั้นนำตัวอย่างผู้ป่วยมาสกัดอาร์เอ็นเอแล้วตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้ พบว่ามีความเข้มข้นระหว่าง 100-300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และมีค่า A260/A280 ratio อยู่ในช่วง 1.8-2.0 จึงมีความ

เข้มข้นเพียงพอที่จะนำมาใช้ศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอของผู้ป่วยที่สกัดได้โดยการตรวจหา gene β 2-microglobulin (B2M) [48] ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) แล้วตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis นำไปส่องภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าตัวอย่างผู้ป่วย ทั้ง 25 ราย ให้ผลต่อบวกต่อยีน B2M โดยมีขนาดของ PCR product ประมาณ 158 bp นั้นแสดงว่า ตัวอย่างผู้ป่วยที่สกัดได้ยังสามารถนำมาใช้ศึกษาได้ สารพันธุกรรมไม่ได้ถูกทำลายไปจนหมด

จากนั้นเมื่อนำตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสเดงกีและผ่านการตรวจยืนยันคุณภาพของสารพันธุกรรมแล้ว มาตรวจจำแนกซีโรไทป์โดยเทคนิค Semi-nested RT-PCR โดยใช้ Lanciotti protocol [49] แล้วตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis นำไปส่องภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าในการทำ PCR รอบแรกนั้น PCR product ที่ได้มีขนาด ประมาณ 511 bp จากนั้นเมื่อทำ PCR รอบที่สอง สามารถจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้ โดย DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4 มีขนาดของ PCR product ประมาณ 482 bp, 119 bp, 290 bp, และ 392 bp ตามลำดับ ผลการศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยทั้งที่เป็นเลือดและไม่ใช่เลือด จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกต่อ DENV2 โดยสามารถคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ คือ ตัวอย่าง plasma 98.3% (59/60) ตัวอย่าง PBMC 91.7% (55/60) ตัวอย่างปัสสาวะ 81.7% (49/60) และตัวอย่างน้ำลาย 33.3% (1/3)

เมื่อได้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ DENV2 จึงนำมาศึกษาความหลากหลายของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่บริเวณ NS3 โดยนำมาเพิ่มจำนวนยีนของไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่บริเวณ NS3 เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับเบส บริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 โดยผู้วิจัยทำการออกแบบไพรเมอร์ (DENV2-NS3) เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสของ DENV2 ที่บริเวณ NS3 โดยมีขนาดของ product ประมาณ 295 bp แล้วนำมาตรวจหาความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity) โดยการนำไพรเมอร์ไปตรวจหาไวรัสใน family Flavivirus ซึ่งได้แก่ DENV1, DENV2, DENV3, DENV4, Japanese encephalitis (JE) และ West Nile virus พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะต่อการตรวจหาไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 เท่านั้น และเมื่อนำมาตรวจหาความไวต่ำสุดของไพรเมอร์ DENV2-NS3 ในการตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกี (Sensitivity) โดยการนำ stock virus DENV2 มาเจือจางในรูปแบบ 10-fold serial dilution แล้วทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ DENV2 พบว่าไพรเมอร์สามารถตรวจจับไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ได้ต่ำสุดที่ 0.475 PFU/ml หรือประมาณ 47.5 copy เมื่อได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและทราบความไวต่ำสุดในการตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 แล้ว จึงนำมาทำการศึกษาในตัวอย่างเลือดและไม่ใช่เลือดของผู้ป่วย พบว่าสามารถตรวจหาปริมาณไวรัสเดงกีในตัวอย่างผู้ป่วยแล้วให้ผลบวกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้

ดังนี้ คือ ตัวอย่าง plasma 98.3% (59/60) ตัวอย่าง PBMC 93.3% (56/60) ตัวอย่างปัสสาวะ 73.3% (44/60) และตัวอย่างน้ำลาย 33.3% (1/3)

จากนั้นเมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ DENV2-NS3 มาทำการศึกษาความหลากหลายของ ลำดับเบสบริเวณ NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดและไม่ใช่เลือดใน ผู้ป่วยไทย โดยวิธีการ cloning นำ PCR product ที่ได้มาเชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase เพื่อให้เกิดเป็นดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA) และทำการ transformation เข้าสู่ host cell ใช้การคัดเลือกด้วยวิธี Antibiotic selection นำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะเห็นโคโลนีสีขาว ทำการสุ่มเลือกโคโลนีไปตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR และนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนใน LB broth แล้วสกัดพลาสมิดและวัดความเข้มข้น แล้วส่งหาลำดับเบส เพื่อดูความหลากหลาย จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งส่งตรวจเลือด ได้แก่ พลาสมาและเม็ด เลือดขาว และสิ่งคัดหลั่งอื่นๆ ได้แก่ ปัสสาวะและน้ำลาย โดยทำการเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอของไวรัส ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และทำการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของบริเวณ DENV2-NS3 ซึ่งมีขนาด 295 bp กับฐานข้อมูลสากล NCBI พบว่าลำดับเบสส่วนใหญ่มีความเหมือนกับสายพันธุ์ที่พบใน ประเทศไทย และประเทศเพื่อนบ้าน คือ ประเทศเวียดนามและประเทศสิงคโปร์ โดยจากการศึกษา พบว่า ไวรัสที่พบในพลาสมา มีความหลากหลายของลำดับเบสที่บริเวณ NS3 มากกว่าไวรัสจากสิ่งส่ง ตรวจอื่น และเมื่อวิเคราะห์ตามช่วงเวลาที่เกิดขึ้น พบว่าตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในช่วง ระยะเวลาแรกของการมีไข้มีความหลากหลายของลำดับเบสมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยในช่วง ระยะเวลาหลัง คือ พบความหลากหลายของลำดับเบสในตัวอย่างพลาสมาตามการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1, 2 และ 3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 10.53%, 20% และ 15.79% ตามลำดับ ในตัวอย่างเม็ดเลือดขาวพบความ หลากหลายของลำดับเบสตามการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1, 2 และ 3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 2.10%, 5.26% และ 7.37% ตามลำดับ ในตัวอย่างปัสสาวะพบความหลากหลายของลำดับเบสตามการเก็บ ตัวอย่างครั้งที่ 1, 2 และ 3 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 5.26%, 18.18% และ 15% ตามลำดับ แต่ไม่พบ ความหลากหลายในตัวอย่างน้ำลาย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีตัวอย่างน้ำลายที่ใช้ในการศึกษาน้อย จาก ผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าพบความหลากหลายของลำดับเบสในตัวอย่างพลาสมามากที่สุด จะเห็นได้ว่า จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของลำดับเบส เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ตัวอย่างของผู้ป่วยแต่ละราย และมีการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกันนั้น ส่วนใหญ่พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทป์ที่ได้มี variation เกิดขึ้นน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณ NS3 เป็นบริเวณที่เกี่ยวกับการ replication ของไวรัส จึงต้องอนุรักษ์ (conserve) บริเวณตำแหน่งนี้ไว้ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาที่มี มาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของเมธี ศรีประพันธ์ ที่ศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสบริเวณ E gene ซึ่งพบว่ามีความหลากหลายของลำดับเบสเกิดขึ้นมาก [52]

นอกจากนี้ผู้วิจัยพบว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่บริเวณ NS3 ของ DENV2 นั้นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน กล่าวคือ แม้จะมีตำแหน่งของลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไป แต่ไม่ส่งผลให้ลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงตาม

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบความสัมพันธ์ในผู้ป่วยรายเดียวกันกับการรายงานการศึกษาของ Alan L. Rothman [51] ซึ่งรายงานไว้ว่า บริเวณ epitope 130-139 ของ DENV2-NS3 ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็นแบบ GTSGSPIVDR มักส่งผลให้เกิดอาการแสดงออกของโรคที่รุนแรงกว่าลำดับอะมิโนรูปแบบอื่น และเมื่อลองเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ epitope ดังกล่าวในตัวอย่างผู้ป่วยไทยพบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีลำดับอะมิโนที่แตกต่างจากอะมิโนอ้างอิง แต่มีผู้ป่วย 1 ราย คือ U23 มีลำดับอะมิโนบริเวณดังกล่าวเหมือนกับกรดอะมิโนอ้างอิง เมื่อดูข้อมูลอื่นๆ และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยรายดังกล่าวร่วมด้วยแล้ว พบว่าเป็นผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่ม DHF มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์จากเวียดนาม แต่ก็ไม่ได้มีอาการแสดงออกทางคลินิกที่รุนแรง หรือแตกต่างจากผู้ป่วยรายอื่น จึงยังสรุปไม่ได้ว่า ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคหรือไม่ ซึ่งอาจจะต้องทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทำแผนภูมิต้นไม้ วิวัฒนาการเปรียบเทียบกับ out group คือ Hep C, DENV1, DENV3 และ DENV4 แสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ (out group) โดยดูจาก clade ที่แยกออกจากกัน จึงสรุปได้ว่า ตัวอย่างผู้ป่วยที่ทำการศึกษาทั้งหมดมีวิวัฒนาการร่วมกันในกลุ่ม DENV2

และผลการศึกษาหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างผู้ป่วยโดยวิธี qRT-PCR โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ซึ่งใช้ stock virus ที่มีความเข้มข้นตั้งต้น 4.75×10^6 PFU/ml มาเจือจางแบบ 10-fold serial dilution จากการศึกษาพบว่าปริมาณไวรัสเดงกีในเลือดจะมีค่าสูงในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่าง และจะค่อยๆ ลดลงในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการกำจัดด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่ในปัสสาวะ ในช่วงแรกๆ จะเจอปริมาณไวรัสน้อย และมีแนวโน้มสูงขึ้นในการเก็บตัวอย่างช่วงหลัง คือระยะที่ 2 และ 3 ของการเก็บตัวอย่าง แต่มีผู้ป่วยบางรายที่ปริมาณไวรัสลดต่ำลงในช่วงท้ายเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากจากช่วงระยะเวลาในการเก็บที่แตกต่างกันไปด้วย ทั้งนี้ยังพบว่าจากการตรวจหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างผู้ป่วยไทยนั้น ปริมาณไวรัสสูงที่สุดที่ตรวจพบจะเจอในตัวอย่างพลาสมา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีก่อนหน้านี้ของ วรพรรณ ยิ่งศิระพัฒน์ [53]

จากผลจากการศึกษานี้เห็นได้ว่าบริเวณ NS3 ของไวรัสเดงกี เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส จึงมีความหลากหลายของลำดับเบสเกิดขึ้นน้อย ทั้งนี้เนื่องจากไวรัสต้องอนุรักษ์บริเวณดังกล่าวไว้ เพื่อการรักษาสายพันธุ์ในเพิ่มจำนวนรุ่นลูกหลานต่อไป แต่ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวนี้ก็มีประโยชน์ในทางด้านระบาดวิทยา เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่ระบาดของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยได้ และอาจนำความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้เพื่อเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับ

กลไกพยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี การหลบหลีกจากการถูกกำจัดจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการออกแบบเพื่อพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ใช้สิ่งส่งตรวจเหลือใช้ที่มีการเก็บตัวอย่างมาเป็นเวลานานหลายปี จึงทำให้อาร์เอ็นเอถูกทำลายไปบ้าง จึงควรศึกษาวิธีเก็บรักษาตัวอย่าง หรือทำการเก็บตัวอย่างใหม่ และควรศึกษาทั้งในช่วง acute phase และ convalescence phase เพื่อเปรียบเทียบดูว่าในระยะท้ายหรือหลังจากการมีไข้ไปแล้วนั้นมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่บริเวณ NS3 หรือไม่ และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับโครงสร้างบริเวณอื่นๆ ของไวรัสเดงกีด้วย



รายการอ้างอิง

1. Guzman M. G, et al., *Dengue: a continuing global threat*. Nat Rev Microbiol, 2010. 8(12 Suppl): p. S7-16.
2. Anantapreecha, S., et al., *Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002*. Epidemiol Infect, 2005. 133(3): p. 503-7.
3. Shu P. Y and Huang J. H, *Current advances in dengue diagnosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. 11(4): p. 642-50.
4. Gibbons R. V and Vaughn D. W, *Dengue: an escalating problem*. BMJ, 2002. 324(7353): p. 1563-6.
5. Pancharoen C, et al., *Dengue virus infection: Recent knowledge and a trend of change*. Chula Med J, 2004. 48: p. 253 - 67.
6. กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข, *สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค*. 2520-2541, กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก.
7. อุษา ทิสยากร, *ไวรัสเดงกี*. แรงจูงใจในการวิจัย. 1994, กรุงเทพฯ: บริษัทโฮลิติก พับลิชชิง จำกัด.
8. Nisalak A, et al., *Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999*. Am J Trop Med Hyg, 2003. 68(2): p. 191-202.
9. Pancharoen C, Thisyakorn U, and T. C., *Dengue Infection*. J Infect Dis Antimicrob Agents, 2001. 18(3): p. 115 - 21.
10. Pancharoen C, Mekmullica J, and T. U., *Primary dengue infection: what are the clinical distinctions from secondary infection?* Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2001. 32(3): p. 476 - 80.
11. Pancharoen C, Uruongpisarn S, and T. U., *Clinical and laboratory differences between primary and secondary dengue infection*. Chula Med J, 2002. 46(6): p. 471 - 7.
12. Halstead S. B, *Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion*. Yale J Biol Med, 1970. 42(5): p. 350-62.

13. ประเสริฐ เอื้อวรากุล, อรุณี ทรัพย์เจริญ, and สุธี ยกसान, วัคซีนเด็งกี, ไข้เลือดออกเด็งกี 2006, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน;
14. Kao C. L, et al., *Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health*. J Microbiol Immunol Infect, 2005. 38(1): p. 5-16.
15. Teichmann D, et al., *Virus isolation for diagnosing dengue virus infections in returning travelers*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003. 22(11): p. 697-700.
16. Twiddy S. S, Holmes E. C, and Rambaut A, *Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution*. Mol Biol Evol, 2003. 20(1): p. 122-9.
17. Holmes E. C and Moya A, *Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses?* J Virol, 2002. 76(1): p. 460-5.
18. Craig S, et al., *Diverse dengue type 2 virus populations contain recombinant and both parental viruses in a single mosquito host*. J Virol, 2003. 77(7): p. 4463-7.
19. Murphit FA, et al., *Virus taxonomy, Classification and nomenclature of viruses*. Arch Virol, 1995. Suppl 10.
20. Kuhn RJ, et al., *Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion*. Cell, 2002. 108: p. 717-725.
21. Mukhopadhyay S, Kuhn R. J, and Rossmann M. G, *A structural perspective of the flavivirus life cycle*. Nat Rev Microbiol, 2005. 3(1): p. 13-22.
22. 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.
23. N., L., *Overview of Dengue Viruses and Their Relations*. J Trop Med Parasitol., December 2008. 31: p. 95-107.
24. Clyde K, Kyle J. L, and Harris E, *Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis*. J Virol, 2006. 80(23): p. 11418-31.
25. Wang H. L, et al., *Efficient diagnosis of dengue infections using patients' peripheral blood leukocytes and serum/plasma*. Intervirology, 2000. 43(2): p. 107-11.

26. Yenchitsomanus P. T, et al., *Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR)*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1996. 27(2): p. 228-36.
27. 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.
28. Kulwichit W, et al., *Diagnosis of dengue infection by reverse transcription-nested polymerase chain reaction in urine specimens*. The 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases, Pattaya, Thailand, 2002. November 10-13, 2002: 151.
29. Kulwichit W, et al., *Highly-sensitive virologic diagnosis of dengue infection by a newly-developed protocol of reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) of serum/plasma, peripheral blood leukocyte (PBL), and urine specimens*. The 41st Annual Meeting of IDSA. San Diego, CA, USA, 2003. October 9-12, 2003: 93.
30. Tonry J. H, et al., *Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters*. Am J Trop Med Hyg, 2005. 72(3): p. 320-4.
31. Tonry J. H, et al., *West Nile virus detection in urine*. Emerg Infect Dis, 2005. 11(8): p. 1294-6.
32. Yingsiwaphat V, et al., *Survival of dengue virus in the urine of acutely-infected patients - implication for pathogenesis and for a possible unrecognized mode of transmission for an arthropod-borne virus*. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, 2007. 31 Mae-04 Apr 2007.
33. Chen W. J, Wu H. R, and Chiou S. S, *E/NS1 modifications of dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells*. Intervirology, 2003. 46(5): p. 289-95.
34. Ding X, et al., *Nucleotide and amino acid changes in West Nile virus strains exhibiting renal tropism in hamsters*. Am J Trop Med Hyg, 2005. 73(4): p. 803-7.

35. Westaway E. G, et al., *Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures.* J Virol, 1997. 71(9): p. 6650-61.
36. Li H, et al., *The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids.* J Virol, 1999. 73(4): p. 3108-16.
37. Yon C, et al., *Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase.* J Biol Chem, 2005. 280(29): p. 27412-9.
38. นพพร สิริสมบัติ and พูนสุข กีฬาแปง, ไวรัสวิทยา, ed. ไข้อยู่ดอกออกเด็งก็. 2006, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน.
39. Chiou C. T, et al., *Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein.* J Gen Virol, 2003. 84(Pt 10): p. 2795-805.
40. Rothman A. L, et al., *Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes.* J Virol, 1993. 67(2): p. 801-6.
41. Shafee N and AbuBakar S, *Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis.* J Gen Virol, 2003. 84(Pt 8): p. 2191-5.
42. Duangchinda T, et al., *Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(39): p. 16922-7.
43. Malavige G. N, et al., *Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection.* PLoS One, 2012. 7(11): p. e50387.
44. วีระพงศ์ ลุติตานนท์ การหาปริมาณโดยเรียลไทม์พีซีอาร์, ed. I.R.-t. PCR. 2014, กรุงเทพฯ
45. วีระพงศ์ ลุติตานนท์, หลักการเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) และเรียลไทม์รีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse transcription) พีซีอาร์, ed. I.R.-t. PCR. 2014, กรุงเทพฯ.
46. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ชีวสารสนเทศศาสตร์เบื้องต้น, ed. พันธุ์วิศวกรรมและชีวสารสนเทศศาสตร์เบื้องต้น. 2008, กรุงเทพฯ.
47. หนูเดือน เมืองแสน, ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ, ed. คู่มือการทำวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. 2009, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

48. Krafft A. E, et al., *Optimization of the Isolation and Amplification of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue: The Armed Forces Institute of Pathology Experience and Literature Review*. Mol Diagn, 1997. 2(3): p. 217-230.
49. 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.
50. WHO, *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. 2009, Geneva: World Health Organization Press.
51. Rothman A. L, *Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(8): p. 532-43.
52. Methee Sriprapun, *MONITORING AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DENGUE VIRUS IN BLOOD AND NON-BLOOD SPECIMENS IN ADULTS WITH ACUTE INFECTION*, 2012. Graduate School; Chulalongkorn University.
53. Vorraphun Yingsiwaphat, *GENOME VARIATIONS OF DENGUE VIRUS IN PLASMA, PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS, URINE, AND SALIVA OF ACUTELY-INFECTED INDIVIDUAL PATIENTS*, 2013. Graduate School; Chulalongkorn University.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB Agar) ปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	10.0	g
Yeast extracts	5.0	g
1M NaCl	10.0	g
Agar	10.0	g

ซึ่งสารทั้งหมดในขวดขนาด 1 L จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุ่น จากนั้นใส่ยา spectinomycin ความเข้มข้น 100 mg/μl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ วางทิ้งไว้จนแข็งตัว นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

** สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB Broth) เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกัน แต่ไม่ต้องใส่ Agar และ ยา spectinomycin ลงไป (ค่อยเติมยา spectinomycin ตอนจะใช้งาน) นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เช่นเดียวกัน

2. การเตรียมยา spectinomycin 100 mg/μl

ซึ่งยา spectinomycin 1 g เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml ละลายให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22 μm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

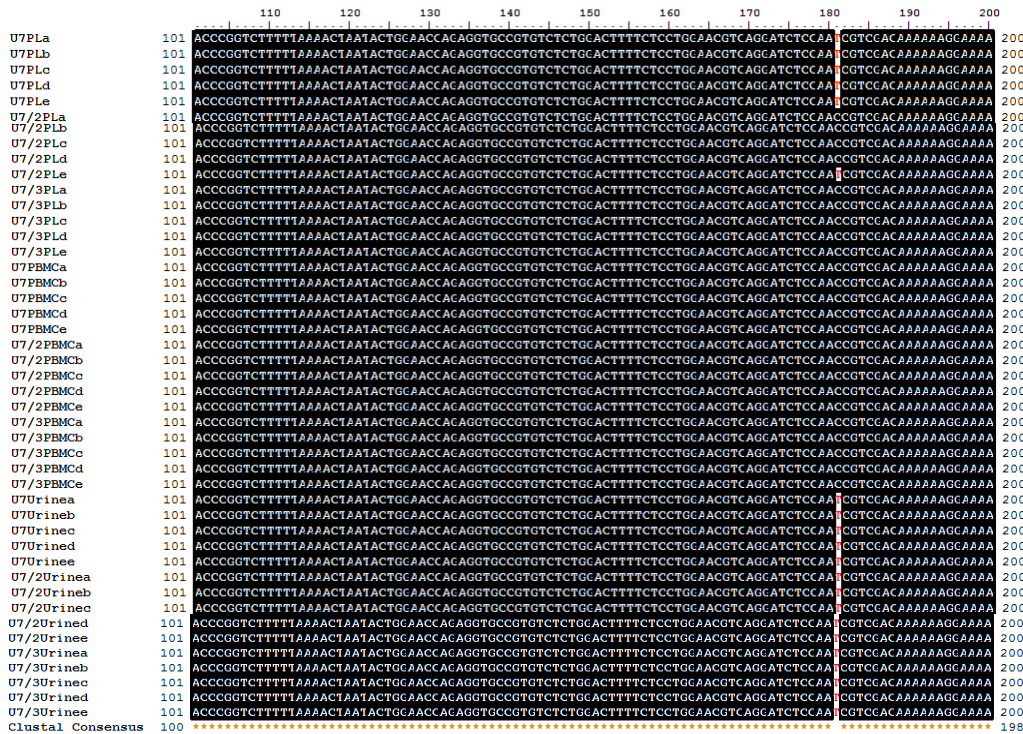
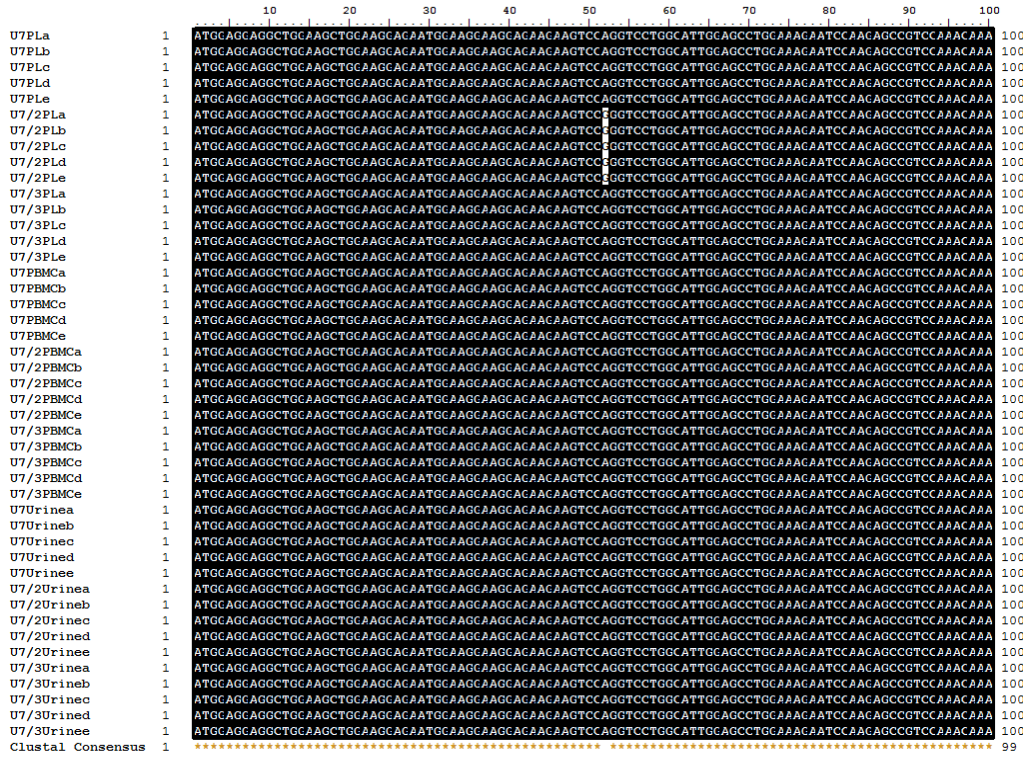
3. การเตรียมสารละลาย 5X TBE buffer ปริมาตร 1 L

Tris base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	ml

ซึ่งสารทั้งหมดในขวดขนาด 1 L จากนั้นละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 L กรองด้วย filter แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อจะใช้งานให้นำ 5X TBE buffer มาเจือจางความเข้มข้น โดยนำ 5X TBE buffer ปริมาตร 200 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml จะได้ 1X TBE buffer เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

ภาคผนวก ข

ผลการทำ multiple sequence alignment บริเวณ DENV2-NS2 ในตัวอย่างผู้ป่วย



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรรณภา กะหวัง เกิดวันที่ 2 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2531 ที่โรงพยาบาลสตูล จังหวัดสตูล ที่อยู่ปัจจุบัน 71 ศรีชัยแมนชั่น ถนนรองเมือง ซอย 1 แขวงรองเมือง เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ในปีการศึกษา 2554 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) จากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ปัจจุบันกำลังศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการแพทย์) แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปีการศึกษา 2556 และ 2557 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับอาจารย์/นักวิจัย ในปีการศึกษา 2557

ผลงานทางวิชาการ

1. Boonyodying, K., Watcharasupat, T., Yotpanya, W., Kitti, T., Kawang, W., Kunthalert, D. and Sitthisak, S. Factors Affecting the Binding of a Recombinant Heavy Metal-Binding Domain (CXXC motif) Protein to Heavy Metals. *EnvironmentAsia*, 2012; 5(2): 70-75.
2. Kawang W, Kitt T, Kunthalert D and Sitthisak S. Characterization of ØNU038 Bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Medical Science Academic Annual Meeting 2012*, 5-6 March 2012, Faculty of Medical Science, Naresuan U., Phitsanulok, Thailand.
3. Kitt T, Kawang W, Klaharn I, Kunthalert D, Ritvirool P and Sitthisak S. Isolation and characterization of lytic bacteriophage ØNU001 infecting *Acinetobacter baumannii* A1589 isolated from Wastewater treatment plant. *The 4th Science Research Conference*, 12-13 March 2012, Faculty of Science, Naresuan U., Phitsanulok, Thailand.
4. Kawang W, Arunyingmongkol K, Mekmullica J, Tawinprai K and Kulwichit W. RT-PCR Using NS3 Primers for the Detection of Dengue Viruses in Blood and Secretions of Thai Patients. *2nd International Conference on Advances in Science and Technology (ICAST)*, 28-29 March 2015, Pattaya, Chonburi, Thailand. (The Best Poster session)