วิธีการตรวจสายพันธุ์ไวรัสเดงกี ด้วยวิธีดีเอ็นเอแบบแถบ
Dengue Virus Serotype – Specific DNA Sensor Strip Test

ไพศาล ขาวสัก[1*] สุรางค์รัตน์ ศรีสุรภานนท์[1] และโกสุม จันทร์ศิริ[1]
Paisarn Khawsak[1*], Surangrat Srisurapanon[1] and Kosum Chansiri[1]

บทคัดย่อ

ไข้เลือดออกเป็นโรคที่สำคัญมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ในการศึกษานี้ ได้พัฒนาชุดตรวจสายพันธุ์ไวรัสเดงกี ด้วยวิธีดีเอ็นเอแบบแถบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ความถูกต้อง และความแม่นยำ ในการตรวจหาปริมาณ ความไว และแยกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ได้พร้อมกัน จากการทดสอบตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยเมื่อใช้ชุดทดสอบหาแอนติเจน จำนวน 37 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบเป็นบวก 100% (37/37) เมื่อใช้ชุดตรวจสอบโดย multiplex semi nested PCR ผลการตรวจสอบเป็นบวก 91.89% (34/37) และตรวจสอบด้วย DNA sensor strip test ผลการตรวจสอบเป็นบวก 91.89% (34/37) สายพันธุ์ที่ตรวจพบ คือ Den2 คิดเป็น 64.86% (24/37) Den3 คิดเป็น 18.92% (7/37) และ Den4 คิดเป็น 8.10% (3/37) และให้ผลเป็นลบคิดเป็น 8.10% (3/37) สายพันธุ์ที่พบมากคือ Den2 คิดเป็น 64.86% ของสายพันธุ์ทั้งหมดที่ตรวจพบ ยังใช้ทดสอบความจำเพาะ (specificity) วิธี DNA sensor strip test ไม่พบการเกิด cross hybridization เมื่อนำไปทดสอบกับ cDNA ของเชื้อไวรัส HBV และ DNA ของคนปกติ และเมื่อนำไปทดสอบความไว (sensitivity) สามารถแสดงผลได้ในปริมาณ cDNA น้อยที่สุดที่ 4 พิโคกรัม/ไมโครลิตร ชุดตรวจ DNA sensor strip test มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อไวรัสเดงกีได้ภายในเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จึงทำให้มั่นใจว่าชุดตรวจสอบนี้มีความไว และความจำเพาะสูง และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อที่มีปริมาณน้อยได้ เพื่อติดตามการรักษา การเฝ้าระวังการระบาดของโรค จึงเหมาะสำหรับในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อได้

คำสำคัญ: ไวรัสเดงกี พีซีอาร์ โรคไข้เลือดออก ดีเอ็นเอ เซ็นเซอร์

Abstract

Dengue is one of the essential infection diseases caused by the dengue virus. In this study, we developed a dengue virus test kit using a dengue serotype-specific sensor strip to determine the efficacy, accuracy, and precision of detecting, quantifying, sensitivity, and distinguishing between four dengue virus strains simultaneously. The 37 positive dengue samples from the antigen test kit were used in this study. Our results found that 34 out of 37 samples showed a positive result in semi-nested PCR and DNA sensor strip tests (91.89%). The strains detected were Den2 64.86% (24/37), Den3 18.92% (7/37), and Den4 8.10% (3/37), and the negative results were 8.10% (3/37). Our result shows that the dominant strain is Den2 which was most found in the Dengue serotype-specific sensor strip test (64.86%). Moreover, we looked over the cross-hybridization both HBV virus cDNA and human DNA. The sensitivity of the detection was as low as 4 picograms/microliter. Thus, this method is suitable for the specificity test of the dengue virus. Moreover, DNA sensor strip test can detect the dengue virus within approximately 3 hours. It can ensure that this method is sensitive, high of specificity and can detect small-scale infections to follow up on treatment surveillance of disease outbreaks. It is, therefore, suitable for the diagnosis of dengue virus infection in the early stages of infection.

Keywords: Dengue virus, PCR, Dengue fever, DNA sensor

[1] คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[1] Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110
*Corresponding author: e-mail: pkhla@hotmail.com
Received: *March 31, 2022*, Accepted: *June 2, 2022*, Published: *January 15, 2023*

บทนำ

โรคไข้เลือดออก หรือ โรคเดงกี เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) ที่มีสารพันธุกรรมเป็น single - strand RNA จัดอยู่ใน genus *Flavivirus* และ family *Flaviviridae* มี 4 สายพันธุ์ คือ Den1, Den2, Den3 และ Den4 ทั้ง 4 สายพันธุ์จะมี antigen ร่วมบางชนิด จึงทำให้มี cross reaction และ cross protection ได้ในระยะเวลาสั้น ๆ เมื่อคนมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิดที่หนึ่งก็จะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีชนิดนั้นตลอดไป และจะมีภูมิคุ้มกัน cross protection ต่อสายพันธุ์อื่น ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 6-12 เดือน ดังนั้น ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีไวรัสเดงกีชุกชุมอาจมีการติดเชื้อ 3 หรือ 4 ครั้งได้ ซึ่งในแต่ละปีพบว่ามีการกระจายของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์หมุนเวียนกัน และมีเชื้อที่เด่นแตกต่างกันไปในแต่ละปี ทำให้มีการระบาดของโรคมาโดยตลอด เนื่องจากประชาชนไม่มีภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์นั้น ผู้ป่วยโรคเดงกีที่เคยได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใด จะมีภูมิคุ้มกันเฉพาะสายพันธุ์นั้น หากได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่ต่างออกไปจากครั้งแรกก็สามารถเป็นไข้เดงกีได้อีก โดยทั่วไปอาการของโรคครั้งที่สองมักรุนแรงกว่าครั้งแรก (Wang *et al*., 1995)

จากผลจากการศึกษาหาสายพันธุ์ (serotype) ของเชื้อไวรัสเดงกี ในแถบแคริบเบียนและอเมริกา (Gubler and Trent, 1993) สรุปได้ว่า ในระยะก่อนปี พ.ศ. 2503 เชื้อที่แพร่ระบาดคือ Den2 ในระหว่างปี 2503-2513 พบเป็น Den3 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2511 พบทั้งเชื้อ Den2 และ Den3 ในระหว่างปี พ.ศ. 2510-2520 พบเป็น Den1 Den2 และ Den3 และปี พ.ศ. 2524 เป็นต้นมา เชื้อที่พบส่วนใหญ่เป็น Den1 Den2 และ Den4 และเชื้อ Den3 พบได้จากคนที่เดินทางมาจากเอเชีย ผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อเดงกีที่มีอาการรุนแรงในหลายประเทศในทวีปเอมริกา มีอาการเลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever; *DHF*) และอาการช็อค (Dengue Shock Syndrome; DSS) เช่นเดียวกันกับที่พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เข้าใจว่าเป็นเชื้อเดงกีจากเอเชียเข้าสู่อเมริกา และพบการติดเชื้อเดงกีไวรัสหลายสายพันธุ์ในเวลาเดียวกัน (Kouri *et al*., 1987) เชื้อไวรัสเดงกีที่แยกได้ คือสายพันธุ์ Den1, Den2 และ Den4 ในรายที่มีอาการรุนแรงเสียชีวิตมักแยกเชื้อได้ Den2 และเมื่อศึกษาลึกลงในระดับโมเลกุล พบว่าเป็น Den2 genotype Asia (Uzcategui *et al*., 2001) ในร่างกายผู้ป่วยพบว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อเดงกีสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง จะทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติเจนของไวรัสเดงกีสายพันธุ์อื่น ในระดับที่สูง ก่อให้เกิดอาการรุนแรงถึงขั้นเลือดออกและช็อคได้ (Wang *et al*., 1995; Calisher *et al*., 1989)

จากจำนวนผู้ป่วยไข้เดงกีเพิ่มขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมาในหลายพื้นที่เขตร้อนของโลก (Dash *et al*., 2006) ทำให้เชื้อไวรัสเดงกีที่ระบาดในประเทศไทย มีหลายสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีอุบัติการณ์ของภาวะเลือดออกและช็อค ทวีความรุนแรงและเสียชีวิตเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคเดงกี ซึ่งจำเป็นอย่างมากที่ต้องมีการตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีอย่างเร่งด่วน (Gore, 2005) จากการติดเชื้อซ้ำ เพราะการติดเชื้อในต่างสายพันธุ์ มักจะนำไปสู่โรคเดงกีที่ร้ายแรงได้ (Halstead, 1998)

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี มักเป็นการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติบอดี การเพาะแยกเชื้อไวรัส (Gubler *et al*., 1984) ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือ rapid test ซึ่ง commercial diagnostic test อาศัยหลักการ immunochromatography เพื่อการตรวจหา NS1 แอนติเจน ซึ่งเป็น protein ที่สำคัญใน replication cycle ของไวรัส ที่พบใน acute phase นอกจากนี้ ปริมาณ NS1 ยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ viremia และอาการของโรค ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะปรากฏขึ้น 7-8 วันหลังจากเริ่มมีอาการ (Parida *et al*., 2001) อย่างไรก็ตาม หลายประเทศได้มีการประเมินการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกีซึ่งเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคโมเลกุล (Shope, 1990) ในตัวอย่างเลือดที่เป็นซีรัม โดยเฉพาะ rapid commercial test พบว่า มีความไวของการติดเชื้อไวรัสเดงกีระดับปานกลางคือ (median 64%, range 34-76%) และมีความจำเพาะ 100% จากการศึกษาส่วนใหญ่รายงานว่าสายพันธุ์ไม่มีผลต่อความไวในการตรวจ อาการ ปัจจัยที่มีผลต่อความไวในการตรวจ ได้แก่ ระยะของการติดเชื้อ ในวันแรก ๆ ของการติดเชื้อจำนวนเชื้อไวรัสน้อย อาจส่งให้ผลตรวจเป็นผลลบปลอม (false negative) และความรุนแรงของการติดเชื้อความแตกต่างของภูมิภาค ทำให้ความน่าเชื่อถือน้อย ในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีนี้ จึงมีบทบาทน้อย ไม่สามารถหาสาเหตุของการติดเชื้อ หรือควบคุมการติดเชื้อได้ (Parida *et al*., 2001)

ตั้งแต่ปี 1999 เป็นต้นมา ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้มีการพัฒนาเป็นอย่างมากโดยเฉพาะ molecular technique เป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีแบบ single RT-PCR amplification (Khawsak *et al*., 2003) มีความไว มีความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบแถบ ให้มีความสะดวก ราคาถูก และไม่ต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจ โดยอาศัยเทคนิคของ biosensor มาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธี PCR เป็น DNA sensor strip test ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะ และมีความไวสูง ก่อให้เกิดประโยชน์ทางด้านการตรวจวินิจฉัยที่ง่ายและฉับไว ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาจากแพทย์ได้อย่างทันท่วงที ดังนั้น DNA sensor strip test จึงนับว่าเป็นวิธีการหนึ่งที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจวินิจฉัย การติดเชื้อไวรัสเดงกี ในผู้ป่วยระยะแรกของการติดเชื้อได้ รวมทั้งสามารถนำแนวคิดในการพัฒนา ขั้นตอน วิธีการ จากงานวิจัยนี้ ไปประยุกต์ใช้กับการเรียนการสอนในด้านปฏิบัติการทางชีวเคมีการวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจสายพันธุ์ไวรัสเดงกี ด้วยวิธีดีเอ็นเอแบบแถบ (dengue virus serotype specific DNA sensor strip test) ให้มีประสิทธิภาพ เปรียบเทียบกับ เทคนิคมาตรฐาน (gold standard) และสร้างองค์ความรู้ใหม่ในการเรียนการสอนปฏิบัติการทางด้านชีวเคมี

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อและสิ่งส่งตรวจ

เชื้อไวรัสของโรคเดงกี จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ Den1, Den2, Den3 และ Den4 ใช้เป็น positive control ได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพฯ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดนครนายก และ ได้เก็บตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายติดเชื้อเดงกี ทำการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ ที่โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพฯ เพื่อทดสอบหาแอนติเจน โดยใช้ commercial test kit ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวก ได้เก็บรวบรวมและได้คัดเลือกไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 – 2556 เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 37 ตัวอย่าง

2. การเตรียมตัวอย่าง

จากเชื้อไวรัสเดงกี ที่ทราบสายพันธุ์ ได้ถูกนำมาใช้เป็น positive control และตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวก จำนวน 37 ตัวอย่าง ในการตรวจการติดเชื้อเดงกี โดยวิธี Non Structural-1 แอนติเจน ซึ่งเป็นวิธี rapid test ใช้หลักการ Immunochromatography นำตัวอย่างซีรัมที่เก็บและคัดเลือกไว้และเชื้อไวรัสเดงกีที่เป็น positive control นำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด GF-1 Total RNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) RNA ที่สกัดได้เปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ 2-step RT-PCR kit (Vivantis, Malaysia) โดยนำ RNA จำนวน 2 ไมโครลิตร ที่สกัดได้มาผสมกับ ไพรเมอร์ R2 0.8 ไมโครโมล นำไปบ่มที่ 65°C เป็นเวลา 2 นาทีแล้ว จึงเติมเอนไซม์ reverse transcriptase 0.5 ยูนิต ลงไป บ่มที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง PCR: T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) นำ cDNA ของตัวอย่างที่ได้ไปหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) ปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น template ในการทำ PCR ขั้นตอนต่อไป ใช้ cDNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) และ DNA ของคนมาเป็น negative control

3. การออกแบบไพรเมอร์ (primer) และ DNA probe

การออกแบบไพรเมอร์ และ DNA probe จะเลือกใช้ตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ RNA ของไวรัสเดงกี บริเวณที่เป็นยีน Evenlop ซึ่งได้ข้อมูลจาก Genbank : database แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการใช้โปรแกรมออกแบบโดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer version 4 (http://primerexplorer.jp/elamp 4.0.0/index.html) เมื่อได้ตรวจสอบคุณสมบัติ primer แล้วจึงสังเคราะห์ไพรเมอร์ และ DNA probe (Bio Basic inc., Canada) ประกอบด้วย ไพรเมอร์ 7 เส้น และ DNA probe 4 เส้น สำหรับวิธี multiplex semi nested PCR ดังแสดงไว้ ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับวิธี multiplex semi nested PCR และ DNA probe สำหรับวิธี DNA sensor trip test

ลำดับ	วิธี multiplex semi nested PCR	ขนาดของ PCR product	วิธี DNA sensor trip test
1	ไพรเมอร์ F1	F1 กับ R2 ขนาด 331 bp	bF1
2.	ไพรเมอร์ R2	-	-
3.	ไพรเมอร์ F4: Den3	F4 กับ R2 ขนาด 256 bp	Probe-PT1_Den3
4.	ไพรเมอร์ F5: Den2	F5 กับ R2 ขนาด 250 bp	Probe-PT2_Den2
5.	ไพรเมอร์ F6: Den1	F6 กับ R2 ขนาด 246 bp	Probe-PT3_Den1
6.	ไพรเมอร์ F7: Den4	F7 กับ R2 ขนาด 251 bp	Probe-PT4_Den4

ส่วนวิธี DNA sensor strip test คือไพรเมอร์ bF1, F1, F4, F5, F6, F7, R2 และ DNA probe จำนวน 4 เส้น คือ Prob-PT1_den3, Prob-PT2_den2, Prob-PT3_den1, และ Prob-PT4_den4, ซึ่งไพรเมอร์ bF1 จะติดฉลากด้วย biotin ที่ปลาย 5’ และ DNA probe ทั้ง 4 เส้น ที่ปลาย 5’ จะติดฉลากด้วย FITC (Fluorescein isothiocyanate) โดยที่ชุดไพรเมอร์และตัวตรวจจับ (DNA probe) สำหรับตรวจเชื้อไวรัสเดงกีด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ผนวกกับแผ่นตรวจวัดแถบสี (dipstick) ได้รับการจดอนุสิทธิบัตรให้กับมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒเมื่อ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561

4. การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction; PCR

การใช้เทคนิค PCR (Adkins *et al*., 2002; Haris *et al*., 1998) เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม cDNA สายสั้น ของเชื้อไวรัสเดงกี ในหลอดทดลอง โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกสายพันธุ์ ในหลอดทดลองปริมาตร 25 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย 1x reaction mix (Vivantis Technology, Malaysia) 0.2 มิลลิโมล ของ dNTPs, 2.0 มิลลิโมล ของ $MgCl_2$, 0.8 ไมโครโมล ของไพรเมอร์ Forward; F1 และไพรเมอร์ Reverse; R2, *Taq* DNA polymerase 0.25 ยูนิต และ 1 ไมโครลิตร ของ cDNA ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR: T100^{TM} Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) โดยให้เครื่อง PCR ทำการปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2 PCR amplification 30 รอบ ประกอบด้วย อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 49°C นาน 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72°C นาน 45 วินาที และขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นก็นำ PCR product ไปทำ gel electrophoresis โดยใช้ เจลอะกาโรส มีความเข้มข้น 2% โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ นาน 20 นาที และนำไปส่องดูแถบแบนของ PCR product บนแผ่นเจลอะกาโรสด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์เจล: Uvitec (Nexbio, Thailand)

การทำ multiplex semi nested PCR เป็นขั้นตอนการตรวจสอบสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีเป็นการทำแบบ multiplex PCR เริ่มจากการนำ PCR product ที่ได้จากขั้นตอนแรก มาใช้เป็น template ในปฏิกิริยาในหลอดทดลองปริมาตร 25 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ templete จำนวน 1 ไมโครลิตร, ความเข้มข้นของไพรเมอร์ forward (F4, F5, F6 และ F7) และ reverse (R2) ที่ 800 นาโนโมล, ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ 200 ไมโครโมล, ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 2 มิลลิโมล, ความเข้มข้น ของ *Taq* DNA polymerase ที่ 0.25 ยูนิต (Vivantis Technology, Malaysia) ปรับปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR: T100^{TM} Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) โดยให้เครื่อง PCR ทำการปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2 PCR amplification 20 รอบ ประกอบด้วย อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 55°C นาน 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72°C นาน 45 วินาที และขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นก็นำ PCR product ไปทำ gel electrophoresis โดยใช้ เจลอะกาโรส มีความเข้มข้น 2% โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ นาน 20 นาที การทดสอบความจำเพาะ และ ทดสอบความไว จากแถบความเข้มของ PCR product บนแผ่นเจลอะกาโรสด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์เจล: Uvitec (Nexbio, Thailand)

5. การตรวจสอบ ด้วย DNA sensor strip test

เริ่มต้นจากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม cDNA สายสั้น ของเชื้อไวรัสเดงกี ในหลอดทดลองปริมาตร 25 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย 1x reaction mix (Vivantis Technology, Malaysia) 0.2 มิลลิโมล ของ dNTPs, 2.0 มิลลิโมล ของ $MgCl_2$, 0.8 ไมโครโมล ของไพรเมอร์ Forward; bF1 และไพรเมอร์ Reverse; R2, *Taq* DNA polymerase 0.25 ยูนิต และ 1 ไมโครลิตร ของ cDNA ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR: T100^{TM} Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) โดยให้เครื่อง PCR ทำการปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2 PCR amplification 30 รอบ ประกอบด้วย อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 49°C นาน 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72°C นาน 45 วินาที และขั้นที่ 3 final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที หลังจากนั้นก็นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร ไป denature โดยใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที จากนั้นนำไป hybridization กับ DNA-probe 10 ไมโครโมล จำนวน 10 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 55°C นาน 10 นาที แล้วนำแผ่น dipstick (Milenia Biotec, Germany) จุ่มลงในสารละลายที่ทำปฏิกิริยา hybridization ไว้แล้ว ถ้าเกิดแถบสีดำขึ้นทั้ง 2 แถบ คือที่แถบ control line (C) และ test line (T) แสดงว่าตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีได้ แต่ถ้าไม่ตรวจเจอเชื้อไวรัสเดงกีจะเกิดแถบสีดำขึ้นเฉพาะ control line (C) เท่านั้น

6. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และ DNA probe (Specificity)

โดยการทำ multiplex semi nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัสเดงกี เทียบกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมถึงการทดสอบกับ DNA ของคน เพื่อเป็นการยืนยันผลที่แน่นอนว่าไพรเมอร์และ DNA probe ไม่เกิด cross hybridization ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี ที่สามารถพบในตัวอย่างเลือด และ DNA ของคนได้

7. การทดสอบความไวของไพรเมอร์และ DNA probe (Sensitivity)

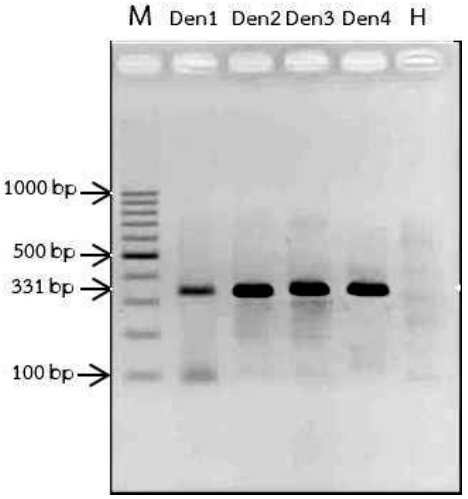
โดยทำการเจือจางสารละลาย cDNA ของเชื้อไวรัสเดงกีที่เป็น positive control ในสัดส่วน 1:10 serial dilution จากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 40 นาโนกรัม (10^{-9}) จนถึงระดับ อัตโตกรัม (10^{-18}) ก่อนการนำไปเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ตรวจสอบความไวของไพรเมอร์และ DNA probe ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และใช้แผ่น dipstick ด้วยวิธี DNA sensor strip test

ผลการวิจัย

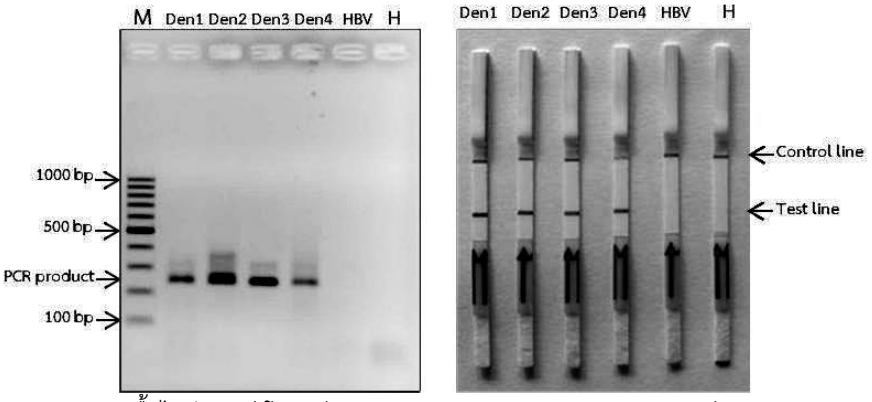
การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction; PCR

ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เก็บไว้ ผ่านการทดสอบหาแอนติเจนที่ยืนยันผลเป็นบวก จำนวน 37 ตัวอย่าง และ positive control นำมาสกัด RNA และเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA นำไปหาความเข้มข้นเพื่อใช้เป็น template ในการเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีที่เป็นตัวอย่างซีรัม และ positive control โดยใช้ ดีเอ็นเอของคนปกติ (H) และเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็น negative control โดยที่อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์คู่นี้ คือ F1 กับ R2 ที่ 49°C PCR product จะที่มีขนาด 331 bp (ภาพที่ 1) เมื่อได้ condition ที่เหมาะสมต่อไพรเมอร์ชุดนี้ จึงนำไปใช้กับการตรวจสอบเชื้อไวรัสเดงกีจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยต่อไป

การทำ multiplex semi nested PCR ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกี คู่แรกโดยใช้ primer F1 กับ R2 PCR product (331 bp) ที่ได้จะนำมาใช้เป็น template ในปฏิกิริยา multiplex semi nested PCR เพื่อทำการตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้ คู่ primer F4 กับ R2 ใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ Den3 คู่ primer F5 กับ R2 ใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ Den2 คู่ primer F6 กับ R2 ใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ Den1 และ คู่ primer F7 กับ R2 ใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ Den4 นำ PCR product มาแยกแถบ DNA ด้วยกระบวนการ gel electrophoresis ได้ผลการทดสอบดังภาพที่ 2 จากนั้นทำการตรวจสอบหาสายพันธุ์ไวรัสเดงกีจากตัวอย่างซีรัมทั้งหมด จำนวน 37 ตัวอย่าง ได้ผลการตรวจสอบ ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 6



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยการใช้ไพรเมอร์ F1 และ R2 กับ template ที่เป็น cDNA ของ positive control (Den1, Den2, Den3 และ Den4) โดย PCR product ที่ได้มีขนาด 331 bp



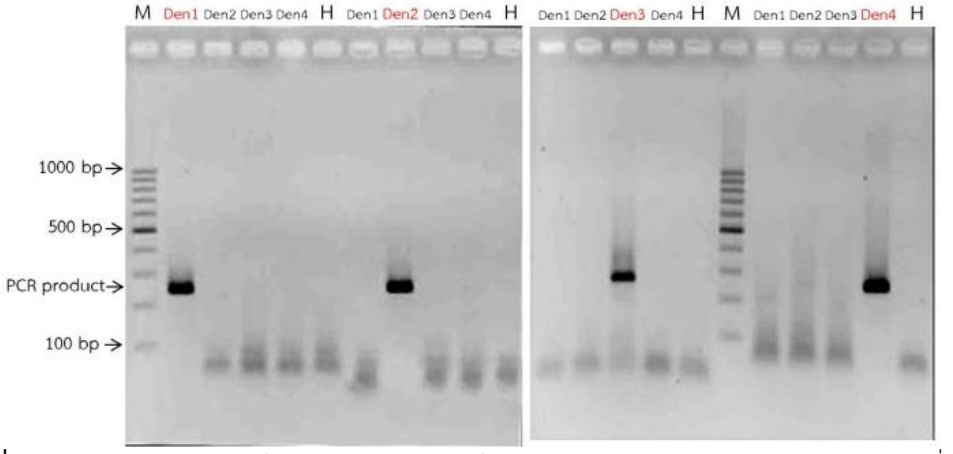
ภาพที่ 2 การตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี โดยวิธี multiplex semi nested PCR และวิธี DNA sensor strip test โดยใช้ไพรเมอร์ (รูปด้านซ้าย) และ DNA probe (รูปด้านขวา) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละสายพันธุ์ ได้ PCR product ที่มีขนาดของ Den1=246 bp, Den2 =250 bp, Den3=256 bp และ Den4=251 bp ตามลำดับ และใช้ HBV และ DNA ของมนุษย์เป็น negative control

การทดสอบ PCR product เพื่อตรวจหาสายพันธุ์เชื้อไวรัสเดงกี โดยวิธี DNA sensor strip test

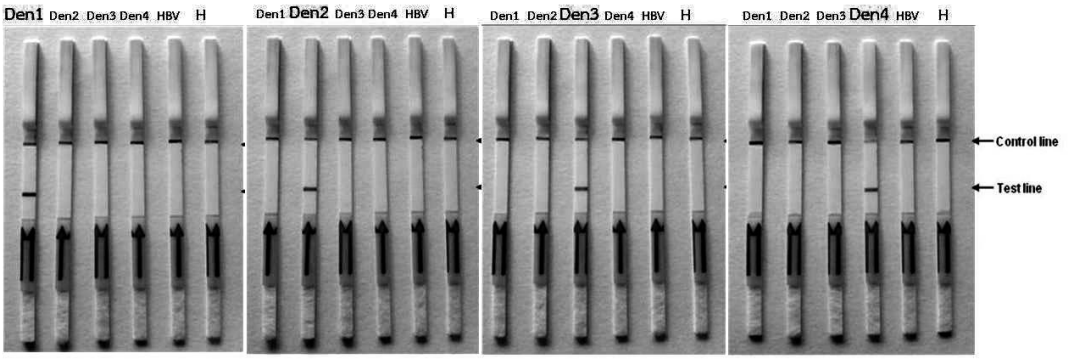
เมื่อได้ condition ที่เหมาะสมต่อไพรเมอร์และ DNA probe จึงนำไปใช้กับการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสเดงกีจาก positive control และตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยจำนวน 37 ตัวอย่าง นำ PCR product มาตรวจสอบหาสายพันธุ์โดยการใช้ DNA sensor strip test โดยใช้ Probe-PT6_Den1, Probe-PT5_Den2, Probe-PT4_Den1 และ Probe-PT4_Den4 (ตารางที่ 3 ภาพที่ 4)

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ และ DNA probe

การทำ multiplex semi nested PCR เป็นการเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัสเดงกี โดยการใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบดังภาพที่ 3 และ DNA probe ในการตรวจสอบดังภาพที่ 4 ที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี ดังนี้ การตรวจสอบ Den1 จะใช้ไพรเมอร์ F6 กับ R2 (246 bp) และ Prob-PT3, การตรวจสอบ Den2 จะใช้ไพรเมอร์ F5 กับ R2 (250 bp) และ Prob-PT2, การตรวจสอบ Den3 จะใช้ไพรเมอร์ F4 กับ R2 (256 bp) และ Prob-PT1 และการตรวจสอบ Den4 จะใช้ไพรเมอร์ F7 กับ R2 (251 bp) และ Prob-PT4 ผลการทดสอบยืนยันว่าไม่เกิดการ cross hybridization ของไพรเมอร์และ DNA probe ต่อในแต่ละสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี และ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมถึง DNA ของคนปกติ



ภาพที่ 3 แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์ ต่อสายพันธุ์ไวรัสเดงกี โดยวิธี gel electrophoresis โดยที่ M = Marker 100 bp ladder PCR product ที่มีขนาด 246 bp=Den1, 250 bp=Den2, 256 bp=Den3 และ 251 bp=Den4 และใช้ Negative control เป็น DNA ของคนปกติ

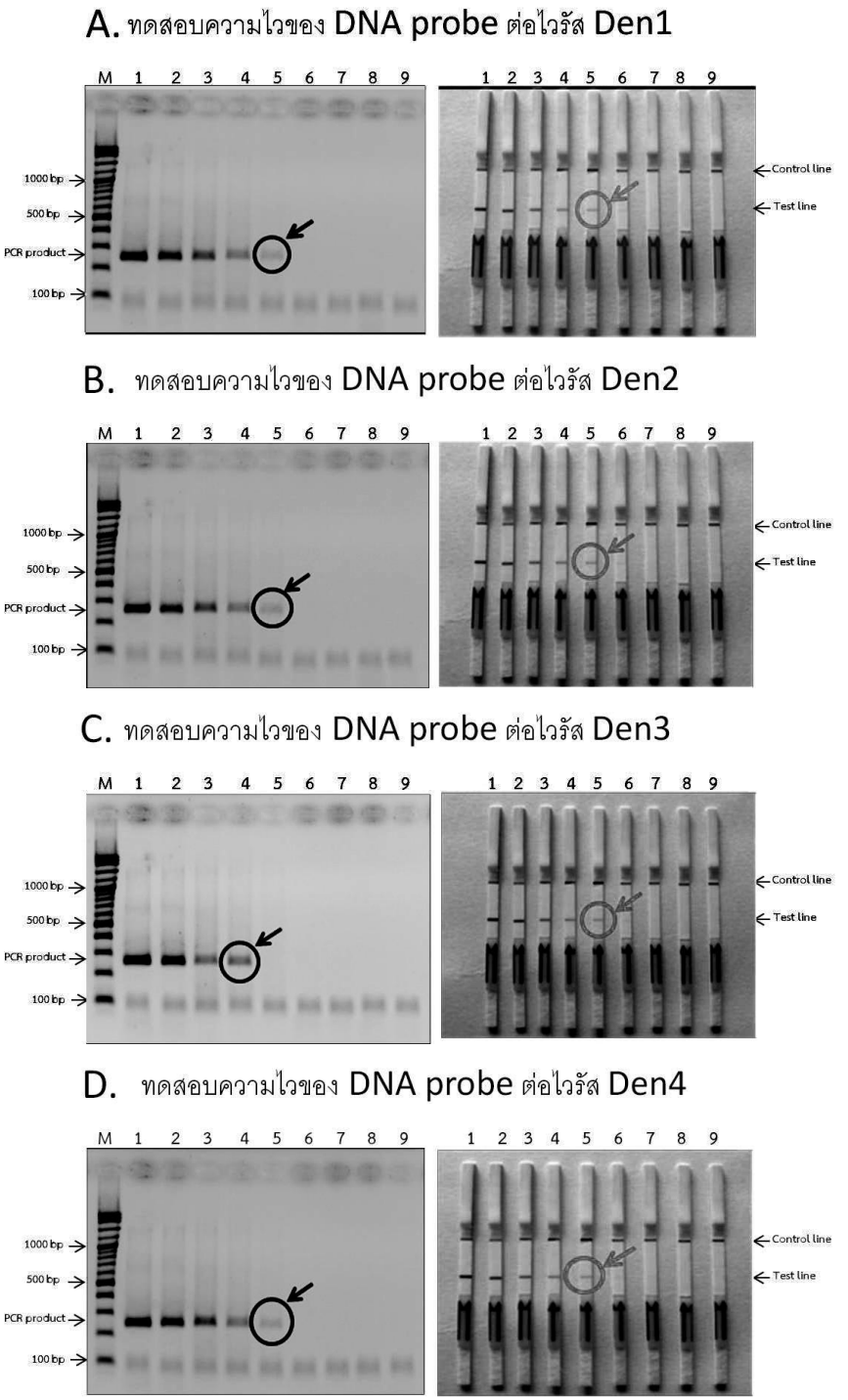


ภาพที่ 4 แสดงความจำเพาะของ DNA probe ต่อสายพันธุ์ไวรัสเดงกี โดยวิธี DNA sensor strip test โดยที่ Den1, Den2, Den3 และ Den4 เป็น Positive control ของไวรัสเดงกี ใช้ Negative control เป็น DNA ของคนปกติ และ ไวรัส HBV

การทดสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์และ DNA probe

โดยทำการเจือจางสารละลาย cDNA ของ positive control (Den1, Den2, Den3 และ Den4) ในสัดส่วน 1:10 serial dilution จากความเข้มข้นแรกที่ 40 นาโนกรัม (10^{-9}) จนถึงระดับ อัตโตกรัม (10^{-18}) เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจสอบความไวของ PCR product ด้วยวิธีมาตรฐาน คือ gel electrophoresis และ วิธี DNA sensor strip test ได้ผลสรุปดังตารางที่ 2 และภาพที่ 5 สามารถหาปริมาณ molecular copies ในหน่วย โมเลกุล/ไมโครลิตร ของไวรัสเดงกีที่ตรวจสอบได้ในปริมาณที่น้อยที่สุดของแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้สูตรคำนวณ (Krieg, 1990; Saxena *et al*., 2008) ดังนี้

$$Y \text{ (molecules/}\mu\text{l)} = [X \text{ (g/}\mu\text{l)/transcript length (nucleotides)} \times 340] \times 6.023 \times 10^{23}$$



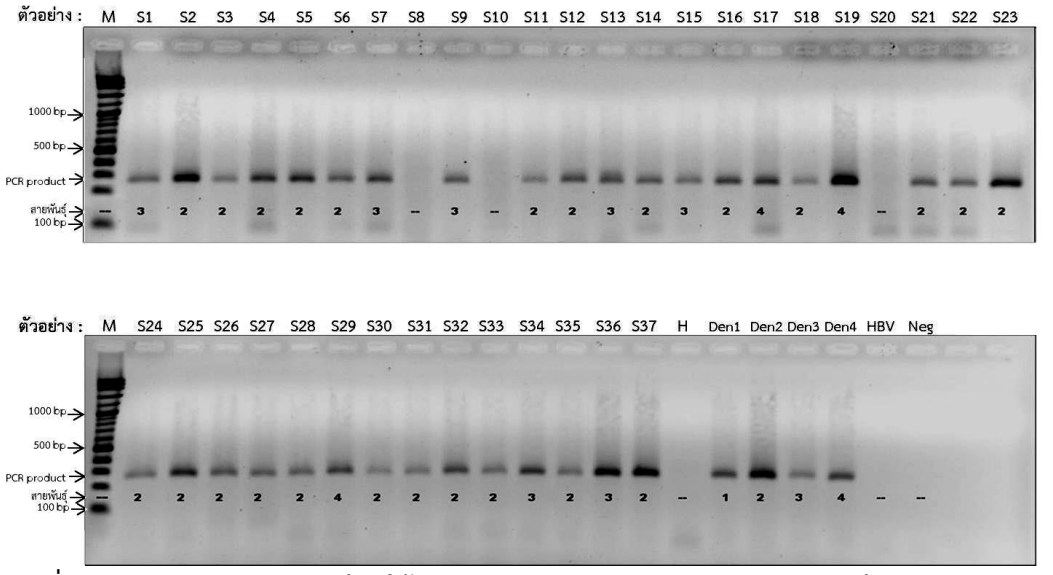
ภาพที่ 5 แสดงผลการทดสอบความไวของรัสเดงกี A.= Den1, B.= Den2, C.= Den3 และ D.= Den4 โดยวิธี PCR DNA sensor strip test เทียบกับวิธีมาตรฐาน multiplex semi nested PCR โดยวิธี 2% agarose gel electrophoresis โดยที่ เลนที่ 1 = 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 2 = 4 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 3 = 400 พิโคกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 4 = 40 พิโคกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 5= 4 พิโคกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 6= 400 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 7= 40 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 8= 4 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร, เลนที่ 9=400 อัตโตกรัม/ไมโครลิตร และเครื่องหมายวงกลมหมายถึงเลนหรือแถบที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด ที่สามารถตรวจสอบได้

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบวิธีความไว (sensitivity) จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อเดงกีด้วยวิธี multiplex semi nested PCR และวิธี DNA sensor strip test

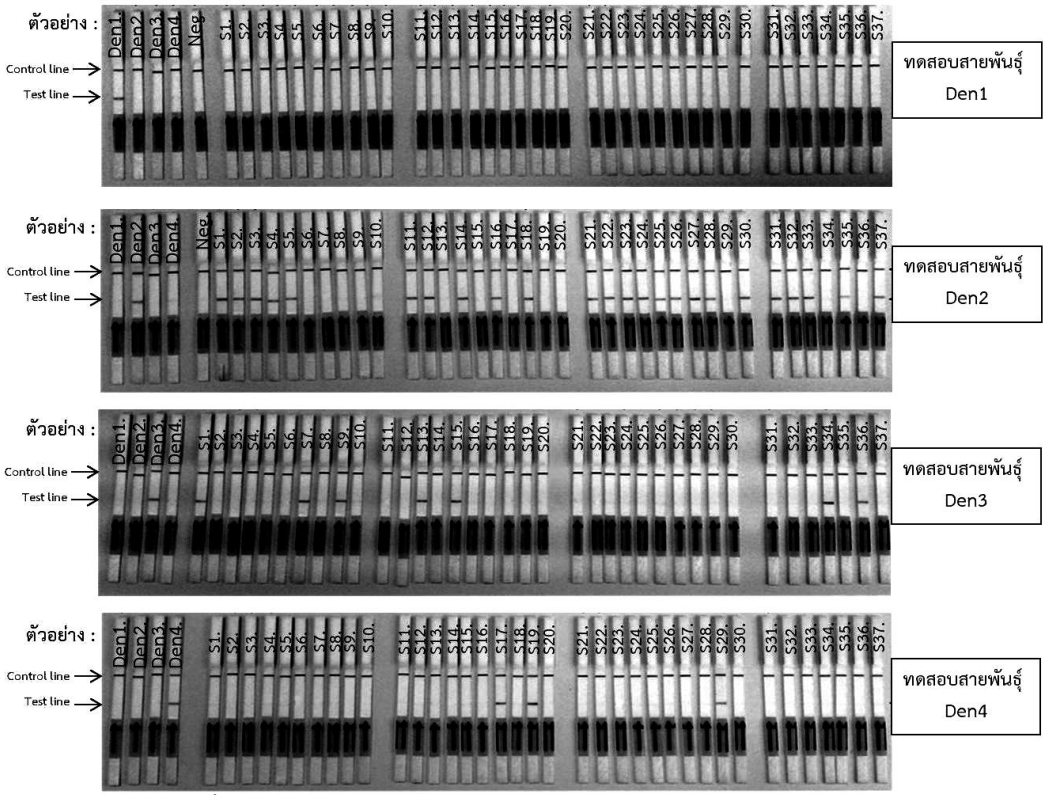
ลำดับเลน/แถบ	Serial dilution ของ cDNA (ความเข้มข้น)	วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสเดงกี							
		Multiplex semi nested PCR				DNA sensor strip test			
		Den1	Den2	Den3	Den4	Den1	Den2	Den3	Den4
1.	40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ($40x10^{-9}$)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2.	4 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ($4x10^{-9}$)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3.	400 พิโคกรัม/ไมโครลิตร ($400x10^{-12}$)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4.	40 พิโคกรัม/ไมโครลิตร ($40x10^{-12}$)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5.	4 พิโคกรัม/ไมโครลิตร ($4x10^{-12}$)	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
6.	400 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร ($400x10^{-15}$)	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	40 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร ($40x10^{-15}$)	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	4 เฟมโตกรัม/ไมโครลิตร ($4x10^{-15}$)	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	400 อัตโตกรัม/ไมโครลิตร ($400x10^{-18}$)	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อเดงกี จากตัวอย่างเลือด จำนวน 37 ตัวอย่างจากโรงพยาบาล

จำนวนตัวอย่าง	**วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสเดงกี จากตัวอย่างเลือด**											
	ทดสอบหาแอนติเจน		Multiplex semi nested PCR					DNA sensor strip test				
	Pos.	**Neg.**	**Den1**	**Den2**	**Den3**	**Den4**	**Neg.**	**Den1**	**Den2**	**Den3**	**Den4**	**Neg.**
37	37	0	0	24	7	3	3	0	24	7	3	3



ภาพที่ 6 การตรวจสอบ product โดยใช้วิธีมาตรฐาน multiplex semi nested PCR โดยการแยก แถบ DNA ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ของตัวอย่างที่ S1-S37 เมื่อเทียบกับ HBV, H และ reagent blank ใช้เป็น negative control



ภาพที่ 7 การตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี โดยใช้วิธี DNA sensor strip test ของจากตัวอย่างเลือด จำนวน 37 ตัวอย่าง โดยที่ S1-S37 คือ ลำดับของตัวอย่าง เทียบกับ negative control ทีเป็น DNA ของคนปกติ

สรุปผลการวิจัย

การตรวจวินิจฉัยหาสายพันธุ์เชื้อไวรัสเดงกี จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างซีรัม

ผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายติดเชื้อไวรัสเดงกี ได้มาเจาะเลือดที่โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพฯ ตัวอย่างเลือดที่เก็บเป็นซีรัมได้ผ่านการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโดยทำการทดสอบหาแอนติเจน ชนิด NS1 ซึ่งเป็น commercial test kit ให้ผลตรวจยืนยันพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นบวก และได้เก็บรวบรวมย้อนหลังระหว่างปี พ.ศ. 2553-2556 เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 37 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์และ DNA probe ต่อสายพันธุ์เชื้อไวรัสเดงกี

ผลการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และ DNA probe ทั้ง 2 วิธี คือ multiplex semi nested PCR และวิธี DNA sensor strip test ใช้เชื้อไวรัสเดงกีที่เป็น positive control จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ Den1, Den2, Den3 และ Den4 ใช้ตัวอย่างของเชื้อไวรัส Hepatitis B และ DNA ของคนปกติเป็น negative control ผลจากการทดสอบทั้ง 2 วิธี พบว่า ปรากฏแถบแบนของ positive control ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีการ cross reaction ระหว่างสายพันธุ์และไม่ปรากฏแถบแบนของ negative control บนเจล และบนแผ่น DNA sensor strip test เป็นการยืนยันถึงการไม่เกิด cross hybridization หรือไม่พบทั้ง false positive และ false negative เมื่อนำชุดตรวจสอบ ทั้ง 2 วิธี มาใช้กับ ตัวอย่างซีรัม จำนวน 37 ตัวอย่างได้ผลการตรวจสอบเป็นบวก 91.89% (34/37) และตรวจสอบด้วย DNA sensor strip test ผลการตรวจสอบเป็นบวก 91.89% (34/37) สายพันธุ์ที่ตรวจพบ คือ Den2 คิดเป็น 64.86% (24/37) Den3 คิดเป็น 18.92% (7/37) และ Den4 คิดเป็น 8.10% (3/37) และให้ผลเป็นลบคิดเป็น 8.10% (3/37) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์และ DNA probe ต่อสายพันธุ์เชื้อไวรัสเดงกี

ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์และ DNA probe ปรากฏว่าวิธี DNA sensor strip test มีความไวของ DNA probe ในการตรวจวินิจฉัยได้พอ ๆ กับวิธี multiplex semi nested PCR ซึ่งเป็นวิธี

มาตรฐานที่ใช้กันแพร่หลายในการวินิจฉัยโรคเดงกีในปัจจุบัน เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความไว ด้วยวิธี DNA sensor strip test สามารถตรวจสอบ cDNA ของเชื้อเดงกี ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดได้ถึง 4 พิโคกรัม/ไมโครลิตร คิดเป็น molecular copies เท่ากับ 2.14 x 10^7 molecules/ไมโครลิตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 5

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบหาสายพันธุ์ไวรัสเดงกีจากตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย จำนวน 37 ตัวอย่าง พบว่า เจอ Den2 จำนวน 24 ตัวอย่าง Den3 จำนวน 7 ตัวอย่าง Den4 จำนวน 3 ตัวอย่าง และ Den1 จำนวน 0 ตัวอย่าง และไม่สามารถจำแนกตัวอย่างของซีรัมของผู้ป่วยได้ จำนวน 3 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 37 ตัวอย่าง ปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความไวในการตรวจสอบ คือ ไพรเมอร์ และ DNA probe ซึ่งออกแบบในบริเวณเดียวกัน และเป็น constant region มี sequence homology ทำให้สามารถตรวจสอบได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ครบทั้งหมด 34 ตัวอย่าง เมื่อนำผลการตรวจไปเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน PCR เป็นการทดสอบแบบ multiplex semi nested PCR และวิเคราะห์ผลจาก gel electrophoresis ซึ่งได้ผลเป็นบวกเหมือนกันทั้ง 34 ตัวอย่าง แสดงว่าประสิทธิภาพของการตรวจ โดยวิธี DNA sensor strip test จึงมีความเชื่อถือเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วย gel electrophoresis ขณะที่ความไวของการตรวจด้วยวิธีของ DNA sensor strip test มีความไวเทียบเท่ากับวิธี gel electrophoresis ด้วยวิธีนี้ สารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดสามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ที่ 4 picrogram (10^{-12}g) เมื่อเทียบกับ gel electrophoresis ก็สามารถตรวจพบได้แค่ 4 picrogram (10^{-12}g) คิดเป็น molecular copies เท่ากับ 2.14 x 10^7 molecules/ไมโครลิตร ยกเว้น Den3 ของวิธี gel electrophoresis นั้นมีความไวของการตรวจพบเชื้อได้ ที่ 40 picrogram (10^{-12}g) คิดเป็น molecular copies เท่ากับ 2.14 x 10^8 molecules/ไมโครลิตร และเป็นการป้องกันผลการตรวจที่เป็น false negative จึงควรเพิ่มไพรเมอร์ และ DNA probe ในบริเวณ (region) อื่นๆ เช่นเดียวกันกับการป้องกันการเกิด false positive ที่มักจะเกิดจากตัวอย่างที่ส่งตรวจ หรือน้ำยาที่มีการปนเปื้อนในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

จากที่กล่าวมา ทำให้ทราบว่า DNA sensor strip test เป็นอุปกรณ์ที่วิเคราะห์สารได้หลายชนิด สามารถวัดผลการทดลองได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมืออื่นช่วย จากการวัดด้วยสีที่เปลี่ยนแปลงไป กำจัดขั้นตอนในการล้างและ incubate สาร ให้น้อยลงเมื่อเทียบกับวิธีการ gel electrophoresis ไม่ต้องใช้ความชำนาญของผู้ทำการทดลองมากนัก และเมื่อ DNA probe เมื่อนำมาร่วมกับ biosensor เป็น DNA sensor strip test จะทำให้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว มีความจำเพาะ มีความไวสูง ราคาไม่แพง เนื่องจากสามารถใช้ DNA ของเชื้อมาตรวจวิเคราะห์ได้เลย โดยไม่ต้อง ใช้ antibody ของเชื้อที่ต้องใช้วิธีการยุ่งยากในการตรวจหา นอกจากนี้การประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวผนวกกับเทคนิค PCR หรือ single RT-PCR amplification (Khawsak *et al*, 2003) ช่วยเพิ่มความไว และ ความจำเพาะ ของเครื่องมือจะเป็นประโยชน์ทางด้านการตรวจวัดที่ทำให้สามารถรู้ปัญหาทางสุขภาพได้ง่ายและฉับไวนำไปสู่การบำบัดรักษาจากแพทย์ได้อย่างทันท่วงทีและช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการมีโรคระบาดหนักในสังคมได้ ดังนั้น DNA sensor strip test จึงนับว่าเป็นวิธีการหนึ่งที่เหมาะสมและสามารถพัฒนานำมาใช้ในการตรวจหาสายพันธุ์เชื้อไวรัสเดงกีได้

ข้อเสนอแนะของผู้วิจัยนั้นเล็งเห็นว่า จากการศึกษาประสิทธิภาพการวินิจฉัยการติดเชื้อเดงกี ทางห้องปฏิบัติการได้พัฒนาอย่างมาก เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคโมเลกุล ด้วยวิธีดีเอ็นเอแบบแถบ (dengue serotype specific sensor strip test) สามารถใช้เป็นทางเลือกที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลสามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาและการตรวจหาไวรัสเดงกีในผู้ป่วยระยะแรกของการติดเชื้อได้ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพ ความถูกต้อง และความแม่นยำ ในการตรวจหา ปริมาณ ความไว และแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ได้พร้อมกัน ที่ได้ผลรวดเร็วและมีประสิทธิภาพต่อการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง นอกจากนี้ งานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้สำหรับการเรียนการสอนทางด้านปฏิบัติการ ในกลุ่มวิชาพื้นฐานทางด้านชีวเคมีของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ที่ผู้วิจัยยังสามารถให้คำแนะนำแก่ นิสิต/นักศึกษา ในด้านเทคนิคและวิธีการใช้งานเครื่องมือที่เกี่ยวข้องได้อย่างชำนาญมากขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพใน การจัดการเรียนการสอนด้านปฏิบัติการให้เกิดประโยชน์สูงสุดแก่นิสิตที่เรียนในรายวิชาของชีวเคมี นอกจากการวิจัยนี้ยังเป็นต้นแบบหรือแนวทางให้บุคคลอื่นได้นำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยด้านอื่นได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมีและห้องเครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์) จังหวัดนครนายก จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึง ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

Adkins, K.K., Strom, D.A., Jacobson, T.E., Seemann, C.R., O'Brien, D.P. and E.M. Heath. 2002. Utilizing genomic DNA purified from clotted blood samples for single nucleotide polymorphism genotyping. Arch Pathol Lab Med. 126(3): 266-270.

Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G. and W.E. Brandt. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol. 70(1): 37-43.

Dash, P.K., Parida, M.M., Saxena, P., Abhyankar, A., Singh, C.P., Tewari, K.N. and P.V.Rao. 2006. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. Virol J. 3: 55.

Dash, P.K., Parida, M.M., Saxena, P., Kumar, M., Rai, A., Pasha, S.T. and A.M.Jana. 2004. Emergence and continued circulation of dengue-2 (genotype IV) virus strains in northern India. J Med Virol. 74(2): 314-322.

Gore, M.M. 2005. Need for constant monitoring of dengue infections. Indian J Med Res. 121(1): 9-12.

Gubler, D.J. and D.W.Trent. 1993. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. Infect Agents Dis. 2(6): 383-393.

Gubler, D.J., Kuno, G., Sather, G.E., Velez, M. and A. Oliver. 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg. 33(1): 158-165.

Halstead, S.B. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science. 239(4839): 476-481.

Harris, E., Roberts, T.G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L.D., Valle, S. and A. Balmaseda. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol. 36(9): 2634-2639.

Khawsak, P., Phantana, S. and K. Chansiri. 2003. Determination of dengue virus serotypes in Thailand using PCR based method. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 34(4): 781-785.

Kouri, G.P., Guzman, M.G. and J.R. Bravo. 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 81(5): 821-823.

Krieg, P.A. 1990. Improved synthesis of full-length RNA probe at reduced incubation temperatures. Nucleic Acids Res. 18(21): 6463.

Parida, M.M., Upadhyay, C., Saxena, P., Dash, P.K., Jana, A.M. and P. Seth. 2001. Evaluation of a dipstick ELISA and a rapid immunochromatographic test for diagnosis of Dengue virus infection. Acta Virol. 45(5-6): 299-304.

Saxena, P., Dash, P.K., Santhosh, S.R., Shrivastava, A., Parida, M. and P.L. Rao. 2008. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. Virol J. 5: 20.

Shope, R.E. 1990. Antigen and antibody detection and update on the diagnosis of dengue. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 21(4): 642-645.

Uzcategui, N.Y., Camacho, D., Comach, G., Cuello de Uzcategui, R., Holmes, E.C. and E.A. Gould. 2001. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. J Gen Virol. 82(12): 2945-2953.

Wang, S., He, R., Patarapotikul, J., Innis, B.L. and R. Anderson. 1995. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. Virology. 213(1): 254-257.