การตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีแมลงเป็นพาหะในประชากรกลุ่มเสี่ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี
Arboviruses Detection in The Population in Surat Thani Province

อานนท์ แซ่อึ่ง[1]
anon.sae@student.mahidol.ac.th,
พรสวรรค์ เหลืองวุฒิวงษ์[2]
pornsawan.lea@mahidol.ac.th,
หวัง หงุ่ยตระกูล[3]
wang.ngu@mahidol.edu,
ณฐมน โกศลธนาภิวัฒน์[2]
nathamon.kos@mahidol.ac.th,
พัชรา ศรีวิชัย[4]
patchara.sri@mahidol.ac.th,
พัณณมาศ มณีกาญจน์[5]
pannamas.man@mahidol.ac.th,
อกนิษฐ์ จิตต์มิตรภาพ[2]
akanitt.jit@mahidol.ac.th,
นรินทร์ ทิพย์พรชัย[2]
narin.thp@mahidol.ac.th,
ศิริพร เจตนาดี[2]
siriporn.che@mahidol.ac.th
[1]นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
[3]ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
[4]ภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
[5]ภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

อาร์โบไวรัส (Arbovirus) เป็นกลุ่มของเชื้อไวรัสที่มีแมลงหรือยุงเป็นพาหะ ไวรัสส่วนใหญ่ที่พบคือ ไวรัสเดงกี (dengue virus) ไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus) และไวรัสซิกา (Zika virus) ในทุกๆ ปีจะมี

ผู้ป่วยติดเชื้อมากกว่า 1 ล้านคนทั่วโลก และพบการแพร่กระจายมากกว่า 120 ประเทศ อาการทั่วไปทางคลินิกของโรคติดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้มีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน เช่น ไข้ ผื่น และปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ สถานการณ์การแพร่ระบาดในประเทศไทยพบว่า มีอัตราความชุกของโรคค่อนข้างสูงในทุกๆ ปี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล และศึกษาอัตราความชุกของการติดเชื้อแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการระหว่างการติดเชื้อภายในบ้าน และภายนอกบ้าน ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ด้วยวิธีการรวมตัวอย่างทดสอบ (Pool serum) โดยนำตัวอย่างซีรั่มปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมรวมกันจำนวน 7 ตัวอย่างใน 1 หลอด จากนั้นนำมาสกัดสารพันธุกรรมด้วยวิธี magnetic bead จากนั้นนำมาตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี Multiplex Real-time RT-PCR ผลการทดลองพบว่าจำนวนตัวอย่างที่ถูกผสมทั้งหมด ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเกิดการเสื่อมสภาพเนื่องจากไม่ได้ใช้ตัวอย่างที่เก็บใหม่ รวมถึงความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเจือจางไป ส่งผลให้ไม่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยชุดตรวจ อย่างไรก็ตามอาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่น ปริมาณของเชื้อไวรัสเริ่มต้นในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย หรือโอกาสในการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ที่ขึ้นอยู่กับระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection) ของชุดทดสอบด้วย

คำสำคัญ: ไวรัสเดงกี / ไวรัสชิคุนกุนยา / ไวรัสซิกา

Abstract

dengue, Zika and chikungunya and viruses are transmitted to humans through the bites of mosquitoes. Annually, people have been infected by these viruses for more than 1 million worldwide. The clinical manifestation is related to fever, rash, and muscle pain. Thailand always has high number of infectious cases every year. Therefore, this study aimed to determine the prevalence of arboviral infection by molecular techniques in Surat Thani province. Thirty microliters of 7 individual samples were pooled. Then RNA was extracted and detected using Multiplex Real-time RT-PCR method. The result showed that all of the pooled samples were negative which might occur from viral RNA degradation. Moreover, the volume of the samples might be too low which impacted viral detection by using the Multiplex PCR kit. However, other factors might also be affected such as the amounts of viruses in the sample or the limit of detection of the test kit.

Keywords: dengue virus / Zika virus / chikungunya virus

บทนำ

อาร์โบไวรัส (Arbovirus) เป็นกลุ่มของเชื้อไวรัสที่สามารถติดต่อมาสู่คนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ โดยมีสัตว์ขาปล้องเป็นพาหะ เช่น ยุง เห็บ ริ้นฝอยทราย เป็นต้น ซึ่งอาร์โบไวรัสนี้สามารถแบ่งตามลักษณะอนุกรมวิธานออกเป็นตระกูลที่แตกต่างกันคือ *Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Flaviviridae, Togaviridae* และ *Asfaviridae* โดยเชื้อไวรัสที่มีความสำคัญในคนส่วนใหญ่จะอยู่ในตระกูลของ *Flaviviridae* เช่น เชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) และเชื้อไวรัสซิกา (Zika virus) และตระกูลของ *Togaviridae* เช่น เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus) เชื้อไวรัส เดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเป็นเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในหลายประเทศทั่วโลกมากกว่า 120 ประเทศ มีอัตราความชุกของโรคและอัตราการเสียชีวิตที่สูง โดยเชื้อไวรัสสามารถติดต่อได้จากสัตว์สู่คน หรือ คนสู่คน โดยมียุงเป็นพาหะ อาการทางคลินิก ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิดนี้ มีลักษณะอาการโดยทั่วไปไม่แตกต่างกัน เช่น มีไข้ ผื่น และปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อย่างไรก็ตามอาการและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิด สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส สามารถตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงและมีความจำเพาะเจาะจงเป็นอย่างมาก

พื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยนั้น เป็นหนึ่งในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคค่อนข้างสูง และมีอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นทุกๆ ปี เนื่องจากพื้นที่ส่วนใหญ่ยังปกคลุมไปด้วยป่าทึบ จากข้อมูลงานวิจัยต่างๆ พบว่าจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นหนึ่งในจังหวัดของภาคใต้ ที่มีอัตราการติดเชื้อและอัตราการเสียชีวิตจากเชื้อไวรัสดังกล่าวค่อนข้างสูง จึงนำมาสู่จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ ในการศึกษาอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสกลุ่มอาร์โบไวรัส ได้แก่ เชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ในกลุ่มประชากรที่มีอายุมากกว่า 6 ปี ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ อำเภอพนม อำเภอคีรีรัฐนิคม และอำเภอวิภาวดี ด้วยวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสดังกล่าวด้วยวิธี Multiplex Real-time RT-PCR

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอัตราความชุกของโรคติดเชื้อในกลุ่มอาร์โบไวรัส ได้แก่ เชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา โดยวิธีการรวมตัวอย่างทดสอบ (Pool serum) ด้วยวิธี Multiplex Real-time RT-PCR
2. เพื่อศึกษาอัตราความชุกในการติดเชื้อแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคในกลุ่ม arbovirus ของสมาชิกภายในบ้านและภายนอกบ้าน
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ Cross-sectional study) โดยใช้ตัวอย่างที่ถูกเก็บในปี พ.ศ. 2562 งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาอัตราความชุกของโรคไข้เลือดออก โรคไข้ซิกา และโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ตามลำดับ ในกลุ่มประชากรที่มีอายุมากกว่า 6 ปี และอาศัยอยู่ในพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ อำเภอพนม อำเภอคีรีรัฐนิคม และอำเภอวิภาวดี ในปี พ.ศ. 2562 อีกทั้งมีการเก็บรวบรวมข้อมูลบ้านเลขที่ บันทึกอุณหภูมิของกลุ่มประชากรก่อนเก็บตัวอย่างเลือด 2 วัน และในวันที่เก็บตัวอย่างเลือด งานวิจัยนี้จะใช้วิธีการรวมตัวอย่างทดสอบ (Pool serum) และตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี Multiplex Real-time RT-PCR

การทบทวนวรรณกรรม

Arboviruses (อาร์โบไวรัส) คือไวรัสที่พบในแมลง เช่น ยุง ซึ่งไวรัสส่วนใหญ่จะก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมถึงมนุษย์ ไวรัสที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ ไวรัสเดงกี (dengue virus) ไวรัสซิกา (Zika virus), ไวรัสชิคุนกุนยา (chikungunya virus) และ ไวรัสไข้เหลือง (yellow fever virus) แบ่งออกเป็น 7 families ได้แก่ *Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Flaviviridae, Togaviridae* และ *Asfaviridae* ในงานวิจัยนี้จะศึกษาไวรัสใน families *Flaviviridae* ซึ่งมีไวรัสเดงกี และ ไวรัสซิกา เป็นสมาชิกในกลุ่ม และ *Togaviridae* ซึ่งมี ไวรัสชิคุนกุนยา เป็นสมาชิกในกลุ่ม

Flaviviridae ลักษณะทางพันธุกรรมประกอบไปด้วย ss-RNA virus (positive sense) โครงสร้างของไวรัสจะประกอบไปด้วยเปลือกหุ้ม (envelop) แคปสิด (Capsid) และหนามแหลม (spike) บนเปลือกหุ้ม โดยไวรัสเดงกีก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออก และไวรัสซิกาก่อให้เกิดโรคไข้ซิกา ส่วน *Togaviridae* ลักษณะทางพันธุกรรมประกอบไปด้วย ss-RNA (positive sense) ลักษณะโครงสร้างมีรูปร่างเป็นสามเหลี่ยม 20 หน้า 12 มุม (Icosahedral symmetry) ประกอบไปด้วยเปลือกหุ้ม (envelop) แคปสิด (Capsid) และหนามแหลม (spike) บนเปลือกหุ้ม โดยไวรัสชิคุนกุนยาก่อให้เกิดโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ซึ่งอาการทางคลินิก (Clinical manifestation) โดยทั่วไปจะมีลักษณะที่คล้ายกัน ได้แก่ ไข้ ปวดหัว ปวดตา ปวดกล้ามเนื้อ ผื่นแดง ไวรัสเดงกี ไวรัสซิกา และไวรัสชิคุนกุนยา จะมีลักษณะอาการพิเศษที่แตกต่างกัน เช่น อาการเลือดออกในช่องท้องและไข้สูงที่พบในโรคไข้เลือดออก อาการปวดข้อรุนแรงที่พบในโรคไข้ปวดข้อยุงลาย และภาวะศีรษะเล็กที่พบในเด็กในโรคไข้ซิกา

ความชุกของการติดเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ในประเทศไทย รายงานจากกองโรคติดต่อนำโดยแมลงในประเทศไทยในปี 2562 ได้บันทึกจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี มากถึง 126,708 ราย ในขณะที่การติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยามากถึง 9,100 ราย ส่วนการติดเชื้อไวรัสซิกามีรายงานผู้ป่วยจำนวน 40 ราย และในปี 2563 ข้อมูลจากระบบเฝ้าระวังโรค กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคในปี 2563 มีรายงาน

ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี 68,033 ราย โดยภาคใต้มีอัตราป่วยตายสูงที่สุด พบการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา 10,509 ราย และ พบผู้ติดเชื้อไวรัส ซิกาทั้งหมด 142 ราย โดยจากรายงานพบว่าผู้ป่วนส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีและไวรัสซิกาอาศัยอยู่ในภาคใต้ และพบว่าจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นจังหวัดหนึ่งของภาคใต้ ที่มีอัตราการติดเชื้อและอัตราการเสียชีวิตจากเชื้อไวรัสดังกล่าวค่อนข้างสูง

สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลากหลายวิธี เช่นการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา (serological technique) ที่เป็นการตรวจการติดเชื้อในช่วงระยะพักฟื้น ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาจจะทำให้การแปลผลค่อนข้างสับสนเนื่องจากเทคนิคนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) ได้ จากคนไข้ที่เคยติดเชื้อไวรัสกลุ่มอาร์โบไวรัสหรือการได้รับวัคซีนมาก่อน หรือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular technique) เป็นการตรวจการติดเชื้อในช่วงระยะเฉียบพลัน ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงและมีความจำเพาะเจาะจงเป็นอย่างมาก สามารถตรวจได้ทั้งการหาสารพันธุกรรมแบบครั้งละ 1 เชื้อ (Single PCR) และ การตรวจหาสารพันธุกรรมแบบตรวจพร้อมกันครั้งละหลายเชื้อ (Multiplex PCR) เนื่องจากการศึกษานี้ต้องการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา พร้อมๆ กัน ดังนั้นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คือวิธี Multiplex Real-time RT-PCR จึงเป็นวิธีที่ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจลง ซึ่งสามารถช่วยในเรื่องของการเฝ้าระวังการระบาดของโรคและการดูแลรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที

โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการศึกษาอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสกลุ่มอาร์โบไวรัส ได้แก่ เชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ อำเภอพนม อำเภอคีรีรัฐนิคม และอำเภอวิภาวดี ด้วยวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสดังกล่าวด้วยวิธี Multiplex Real-time RT-PCR

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ Cross-sectional study โดยใช้ตัวอย่างซีรั่มที่ถูกเก็บในปี พ.ศ. 2562 จำนวนทั้งหมด 6,775 ตัวอย่าง จากประชากรที่อาศัยในพื้นที่ 3 อำเภอ ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ อำเภอพนม อำเภอวิภาวดี และอำเภอคีรีรัฐนิคม ซึ่งตัวอย่างซีรั่มเหล่านี้ได้มาจากประชากรที่มีอาการและไม่มีอาการคล้ายโรคติดเชื้อในกลุ่มอาร์โบไวรัส ทั้งสองกลุ่มให้ผลเป็นลบจากการตรวจหาโรคติดเชื้อมาลาเรียมาก่อนแล้ว ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ Multiplex Real-time RT-PCR จะใช้ตัวอย่างเชื้อแต่ละชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

นำตัวอย่างซีรั่มจำนวนทั้งหมด 6,775 ตัวอย่าง มาทำการรวมตัวอย่างทดสอบ (pool serum) โดยใน 1 หลอดจะมีตัวอย่างซีรั่มจำนวน 7 ตัวอย่างรวมกัน โดยดูดตัวอย่างซีรั่มปริมาตร 30 ไมโครลิตร จำนวน 7 ตัวอย่างลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งภายหลังจากที่ทำการรวมตัวอย่างแล้วจะได้ตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 968 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสต่อไป สำหรับการเตรียมการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจจะแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 เริ่มต้นโดยการนำเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาเจือจางความเข้มข้นเป็น 1:10 ด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง (10 fold dilution จาก 10^{-1}-10^{-4}) และชุดการทดลองที่ 2 นำเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:7 ด้วย normal human serum (30 ไมโครลิตรของเชื้อไวรัส และ 180 ไมโครลิตร ของ normal human serum) จำนวน 4 ครั้ง (10 fold dilution จาก 10^{-1}-10^{-4}) จากนั้นตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพจากทั้งสองชุดการทดลอง จะถูกนำไปสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส

2.2 การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Viral nucleic acid extraction)

นำตัวอย่างซีรั่มที่ได้จากการรวมตัวอย่างทดสอบเรียบร้อยแล้วจำนวนทั้งหมด 968 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากชุดการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ มาทำการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี magnetic bead โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleic Acid Extraction Kit, Zybio โดยเริ่มจากการเติม proteinase K ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และตัวอย่างซีรั่มปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีสารละลาย lysis buffer จากนั้นนำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Nucleic Acid Isolation System EXM3000 โดยจะใช้เวลาในการสกัดประมาณ 9 นาที จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสต่อไป

2.3 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Viral detection)

งานวิจัยนี้ใช้การตรวจหาสารพันธุกรรมของด้วยเทคนิค Multiplex Real-time RT-PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป ZDC VIASURE kit ที่มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา พร้อมกันในขั้นตอนเดียว เริ่มจากขั้นตอนการเติม buffer ปริมาตร 15 ไมโครลิตรลงใน lyophilized tube หลังจากนั้นทำการเติมสารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad การตรวจหาเชื้อไวรัสในรอบแรกเป็นการใช้ตัวอย่างที่ถูกรวมตัวอย่างทดสอบ (pool serum) และถ้าพบเชื้อไวรัส (Positive result) จะทำการทดสอบซ้ำในแต่ละตัวอย่างซีรั่มที่ถูกผสมรวมตัวอย่างทดสอบ โดยนำมาสกัดหาเชื้อพันธุกรรมของไวรัส และตรวจหาชนิดเชื้อไวรัสที่ตรวจพบอีกครั้ง

3. การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistical analysis)

อัตราความชุกของโรค (Prevalence rate) ถูกคำนวณจากจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อทั้งหมด ต่อจำนวนผู้ป่วยที่ใช้ในการทดสอบ อีกทั้งการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อที่เกิดจากแพร่กระจายแบบมีนัยสำคัญที่เกิดจากภายในบ้าน และการแพร่กระจายของเชื้อที่ไม่มีนัยสำคัญ และการเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยติดเชื้อที่แสดงอาการ และไม่แสดงอาการ ซึ่งทั้งหมดจะถูกคำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 20 software

ผลการวิจัย

ตัวอย่างซีรั่มจำนวนทั้งหมด 6,775 ตัวอย่าง จากประชากรที่มีอาการและไม่มีอาการไข้ ในพื้นที่ 3 อำเภอ ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี จากการรวมตัวอย่างทดสอบจำนวนทั้งหมด 968 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ พบว่าชุดทดลองที่ 1 ให้ผลค่า Ct เริ่มต้นของเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา และเชื้อไวรัสซิกา เท่ากับ 24.13 28.14 และ26.34 ตามลำดับ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของแต่ละเชื้อไวรัสที่สามารถทดสอบได้คือ 10^{-3} มีค่า Ct เท่ากับ 34.04 38.08 และ 38.24 ตามลำดับ ผลการทดลองชุดที่ 2 พบว่า เมื่อทำการผสมเชื้อไวรัสกับ normal human serum ในอัตราส่วน 1:7 จะทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสลดลง โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีคือ 10^{-3} มีค่า Ct เท่ากับ 33.43 เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา และเชื้อไวรัสซิกา คือ 10^{0} มีค่า Ct เท่ากับ 35.60 และ 35.18 ตามลำดับ ผลการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ ชุดที่ 1 และ 2 ให้ผลที่แตกต่างกัน และสามารถสรุปได้ว่าประสิทธิภาพในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสลดลงเมื่อทำการเจือจางความเข้มข้นของเชื้อไวรัสลง

สรุป และอภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบในตัวอย่างซีรั่มทั้งหมดจำนวน 6,775 ตัวอย่าง ที่ได้จากรวมตัวอย่างทดสอบ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากปริมาตรแต่ละตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบมีปริมาตรแต่ละตัวอย่างน้อยเกินไปสำหรับการทดสอบ ซึ่งแต่ละตัวอย่างถูกใช้เพียง 30 ไมโครลิตร ทำให้โอกาสในการตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสลดลง อีกทั้งตัวอย่างที่ใช้ทดสอบไม่ใช่ตัวอย่างที่เก็บใหม่ในแต่เป็นตัวอย่างที่มีอยู่เดิมในห้องปฏิบัติการซึ่งเก็บไว้ตั้งแต่ปี 2562 อาจส่งผลให้สารพันธุกรรมของไวรัสเกิดการเสื่อมสภาพจนไม่สามารถตรวจเจอได้ นอกจากนี้การเลือกใช้ชุดทดสอบ Real-time RT-PCR ที่เป็น Multiplex test kit ทำให้โอกาสในการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี เชื้อไวรัสซิกา และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ลดลงเนื่องจากจะทำให้ชุดตรวจมีค่า limit of detection ที่เพิ่มมากขึ้น หลังจากการทดสอบ

ประสิทธิภาพของชุดตรวจ พบว่า สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อที่ความเข้มข้นสูง ๆ เท่านั้น โดยมีค่า Ct ในแต่ละเชื้อไวรัสเท่ากับ 25.38 35.18 และ 35.60 ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่า ชุดทดสอบ VIASURE kit อาจมีค่า limit of detection ที่ค่อนข้างสูง และส่งผลให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสลดลง

ข้อเสนอแนะ

1. หากประสงค์จะทำการรวมตัวอย่างทดสอบหลาย ๆ ตัวอย่างเข้าด้วยกัน (Pool sample) ใน 1 ปฏิกิริยา ดังเช่นในการศึกษานี้ ควรใช้ปริมาณตัวอย่างตั้งต้นในแต่ละตัวอย่างผู้ป่วยไม่น้อยจนเกินไป ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้ปริมาณตัวอย่างตั้งต้นเพียง 30 ไมโครลิตร จึงอาจต้องมีการปรับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ให้มากกว่านี้
2. ในการศึกษานี้ผู้วิจัยใช้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่างต่อหนึ่งการทดสอบ (Pool sample) ซึ่งอาจจะเป็นจำนวนที่มากเกินไป ส่งผลให้ความเข้มข้นของเชื้อในตัวอย่างลดลง จนไม่สามารถตรวจพบได้
3. ถ้าในกรณีงานวิจัยอื่นๆ มีความจำเป็นต้องตรวจแบบรวมตัวอย่างทดสอบเช่นในการศึกษานี้ ก็ควรปรับวิธีการตรวจให้เหมาะสม คือ ใช้ชุดตรวจแบบตรวจหาเชื้อไวรัสครั้งละ 1 ชนิด (Singleplex) ไม่ใช้วิธีการตรวจแบบ Multiplex PCR ที่ตรวจหา 3 เชื้อพร้อมกัน ซึ่งอาจจะเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อไวรัสได้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. กลุ่มระบาดวิทยาและตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค. (2564). สถานการณ์โรคติดต่อนำโดยยุงลายและการประเมินความเสี่ยงต่อการระบาดในปี 2564. สืบค้นเมื่อ กรกฎาคม 14, 2565, จาก https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1212820211229113331.pdf
2. Miller BR. Arboviruses. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. (2008). Encyclopedia of Virology. Oxford: Academic Press. 1(3), 170-176.
3. Go YY, Balasuriya UB, Lee CK. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. Clin Exp Vaccine Res. 3(1), 58-77.
4. Carvalho VL, Long MT. (2021). Insect-Specific Viruses: An overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. Virology. 557, 34-43.
5. Artsob H, Lindsay R, Drebot M. Arboviruses. (2017). International Encyclopedia of Public Health. 2(2), 233-256.

6. Costa J, Ferreira EC, Santos C. COVID-19, Chikungunya. (2021). Dengue and Zika Diseases: An Analytical Platform Based on MALDI-TOF MS, IR Spectroscopy and RT-qPCR for Accurate Diagnosis and Accelerate Epidemics Control. Microorganisms. 9(4), 708-723.
7. Back AT, Lundkvist A. (2013). Dengue viruses - an overview. Infect Ecol Epidemiol.; 3(1), 1-21.
8. Galán-Huerta KA, Rivas-Estilla AM, Fernández-Salas I, Farfan-Ale JA, Ramos-Jiménez J. (2015). Chikungunya virus: A general overview. Medicina Universitaria. 17(68), 175-183.
9. Suwanmanee S, Surasombatpattana P, Soonthornworasiri N, Hamel R, Maneekan P, Misse D, et al. (2018). Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. Acta Trop. 188(1), 244-250.
10. กลุ่มระบาดวิทยาและตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค. (2565). รายงานสถานภาพโรคไข้เลือดออก. สืบค้นเมื่อ มิถุนายน 20, 2565, จาก https://datastudio.google.com/u/0/reproting/84a91f26-9f99-4d85-aa9c-9f2f42205a77/page/cFWgC
11. กลุ่มระบาดวิทยาและตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค. (2565). รายงานสถานภาพโรคติดเชื้อไวรัสซิกา. สืบค้นเมื่อ มิถุนายน 21, 2565, จาก https://datastudio.google.com/u/0/reporting/454fcf5a-c7e3-46fb-b393-e2f587f0a13e/page/p_8gcv0gpurc
12. กลุ่มระบาดวิทยาและตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค. (2565). รายงานสถานภาพโรคติดเชื้อไว. สืบค้นเมื่อ มิถุนายน 21, 2565, จาก https://datastudio.google.com/u/0/reporting/d65ea341-d007-4929-bbc1-6e797050b5cc/page/GKWfC
13. S.Q. Liu, X. Li, C.L. Deng, Z.M. Yuan, B. Zhang. (2018). Development and evaluation of one-step multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Zika virus and Chikungunya virus. J. Med. Virol., 90(1), 389-396.
14. Mansuy, J.-M., Lhomme, S., Cazabat, M., Pasquier, C., Martin-Blondel, G., & Izopet, J. (2018). Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 92(4), 284-287.