บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม, เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้พื้นฐานและระบาดวิทยาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสเดงกี

เชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus) เป็นหนึ่งใน single-stranded RNA virus ที่อยู่ใน family Flavivirida มีทั้งหมด 4 ซีโรไทป์ (DEN-1, DEN-2, DEN-3 และDEN-4) พบการระบาดครั้งแรก ในประเทศฟิลิปปินส์ในปี พ.ศ. 2497 หลังจากนั้นพบว่ามีการระบาดในประเทศต่าง ๆ ทุกทวีป โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน (รูปภาพที่ 2.1) ในประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2501 [1] โดยมีแนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มมากขึ้นทุกๆปี ตั้งแต่ที่มีการ ระบาดในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ยกเว้นในปี พ.ศ.2542-2543 ซึ่งมีจำนวนผู้ป่วยลดลง อย่างมากเนื่องจากมีโครงการรณรงค์อย่างจริงจัง [2] (รูปภาพที่ 2.2 ตารางที่ 2.1) โดยซีโรไทป์ที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ DEN-1, DEN-2 และ DEN-3

Biology of dengue virus

Dengue virus เป็น RNA ไวรัส การเกิดโรคจากไวรัสในกลุ่ม flavivivirus ส่วนใหญ่การติดเชื้อเกิดผ่านจากแมลงมายังมนุษย์ ไวรัสที่อยู่ในกลุ่มนี้ที่เป็นที่รู้จักดีได้แก่ yellow fever, Japanese encephalitis, St Louis encephalitis, tick-borne encephalitis viruses

ดังที่กล่าวมาแล้วว่า dengue virus สามารถแบ่งกลุ่มทาง serology ได้เป็น 4 serotype คือ DEN-1, DEN-2,DEN-3 และ DEN-4 โดยที่ไวรัสทั้ง 4 ชนิดจะมีความแตกต่างกันทาง serology เนื่องจากมีความแตกต่างของ envelope protein และพบว่า ไวรัส DEN-1 และ DEN-3 มีความใกล้เคียงกันมากกว่า serotype อื่น

Immune response ในโรคติดเชื้อ dengue

Dengue virus ประกอบด้วย viral protein 10 ชนิด ได้แก่ membrane pretein (M), envelope glycoprotein(E), core , และ non-structural(NS) protein อีก 7 ชนิด

มีการศึกษา antibody ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี พบว่า anti E- antibody ตรงส่วน envelope protein domain III (E-D3) ที่เป็น conserve region ของ flavivivirus เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อ infectivity ของ dengue virus ทุก serotype โดยที่ antibody ต่อส่วนนี้จะมีผลทำ

ให้ป้องกัน การติดเชื้อเดงกีได้ โดยยับยั้ง binding ของไวรัสกับเซลล์ และ neutral viral infectivity นอกจากนี้ยังมี cross-reactivity ระหว่าง serotype ต่างๆ ที่จะป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในหนู

NS1 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์มีการติดเชื้อให้เข้าไปอยู่ในกระแสเลือด antibody ต่อ NS เป็นตัวที่สำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ complement-mediated lysis of DV-infected cell ใน vivo ในขณะเดียวกัน antibody นี้เองก็มีผลทำให้เกิด endothelial injury NS3 เป็น antigen ที่สำคัญที่เป็นตัวกระตุ้น กลไกการอักเสบโดยผ่าน antigen presenting cell แล้วมีการกระตุ้น dengue-specific CD4 และ CD8 T cell เป็นผลทำให้ มีการหลั่ง interferon gamma, beta และ alpha ทั้งหมดนี้จะทำให้เกิดการ lysis ของ dengue-infected cell ในที่สุด โดยสรุปพบสว่ามีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเดงกี โดยผ่ายหลายกลไก ในช่วงแรกการมีกระตุ้น B cell, NK cell และ IgM ส่วนช่วงหลังมีการกระตุ้น interferon gamma และ IgG จะมีผลในช่วงหลัง ส่วนในระยะยาวยังไม่มีข้อมูลที่มากเพียงพอ

การติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์หนึ่ง ๆ จะทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์นั้น ๆ อย่างถาวรไปตลอดชีวิต (homotypic immunity) แต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่น (heterotypic immunity) และป้องกันการติดเชื้อข้ามไปยังเชื้อซีโรไทป์อื่นได้ชั่วคราวในช่วงระยะเวลาประมาณ 3-12 เดือน

Target cells ของ dengue infection

โดยทั่วไปหลังจากที่ได้รับเชื้อจากการที่ถูกยุงกัด จะมีการแบ่งตัวที่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง จากนั้นเชื้อก็จะเข้าไปที่ต่อมน้ำเหลืองและมีการแบ่งตัวกระจายไปตามเลือด (dissemination) จากนั้นเชื้อจะเข้าไปอยู่ตามอวัยวะต่างๆ [3] ในช่วงนี้จะเป็นช่วงที่เริ่มมีไข้เชื้อที่เข้าไปอยู่ใน กระแสเลือดสามารถเข้าไปอยู่ในเซลล์ต่างๆ [4] ได้แก่ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดย dengue สามารถที่จะอยู่ได้ทั้งใน monocyte และ B lymphocyte นอกจากนี้จะสามารถตรวจพบ dengue virus ในอวัยวะต่างๆที่มี cell ดังกล่าว จากการตรวจศพผู้ป่วยที่เสียชีวิต จากโรคไข้เลือดออก จะพบไวรัสที่เนื้อเยื่อต่างๆได้แก่ spleen, thymus, Kupffer cells, monophagocyte cells ของผิวหนัง, circulating monocytes, บางส่วนของ B-cells และบนผิวของเกร็ดเลือด การตรวจพบดังกล่าวเป็นการตรวจด้วยวิธี viral isolation หรือ antigen detection ดังตาราง 2.2 [5]

Location of viral genome in tissues or cells

มีการตรวจพบ virus ใน plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) โดยตรวจพบทั้ง infectious virus และ viral antigen เชื่อว่า cell ส่วนใหญ่ที่มีส่วนในการแบ่งตัวของไวรัสได้แก่ monocyte ส่วนใน B-lymphocyte พบได้บ้าง

มีการศึกษาในห้องทดลองที่พบว่า dengue virus สามารถที่จะ ติดเชื้อใน human cell line ได้ 23 cell line ในจำนวนนี้ประกอบด้วยทั้ง B cell line และ T cell line

ส่วนในไขกระดูก มีการตรวจพบว่า stromal cells ในไขกระดูกมี dengue antigen และเชื่อว่าอาจจะเป็นส่วนที่ ทำให้มี viral replication และ bone marrow suppression ในช่วง acute dengue infection [6,7]

Immunopathogenesis of dengue infection

เชื่อว่าการเกิดโรคและพยาธิสภาพใน dengue infection ส่วนหนึ่งเป็นจาก การที่ระบบภูมิคุ้ม กันของร่างกายตอบสนองต่อ virus ที่เป็น antigen

หน้าที่หลักของ antibody response ใน dengue infection ได้แก่

Neutralization
Complement-mediated cytolysis
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

Antibodies ต่อ dengue virus รวมกับ antigen เป็น antigen-antibody complex หลังจากนั้นมีการกระตุ้น CD4+ T cell แล้วมีการสร้าง IL-2, TNF gamma, จะกระตุ้นให้มีการสร้าง Fc gamma receptor ซึ่งจะช่วยเกิด antibody-dependent enhancement of infection หลังจากที่มีการเพิ่มจำนวน monocyte ที่มีการติดเชื้อ dengue ก็มีการกระตุ้นและสร้าง dengue virus-specific T cell การที่มีการเพิ่มและกระตุ้น T cell ก็จะทำให้มีระดับของ lymphokines สูงขึ้นอย่างมาก

Antibody-mediated immunity to dengue virus infection

พบว่ากลไกของการป้องกันการติดเชื้อเดงกีประกอบไปด้วย virus neutralization, complement lysis และ antibody-dependent cellular toxicity

จากการทดลองในหนูพบว่า monoclonal antibody ต่อส่วนที่เป็น protein E และ pre-M ของไวรัสเดงกี สามารถที่จะป้องกันการติดเชื้อเดงกีซ้ำได้ ได้มีการทดลองโดยใช้ pre-M antibody จาก antibody ห้าชนิด พบว่าสอง antibody สามารถที่จะ neutralize ไวรัส และ สามารถที่จะ fix complement ได้ที่ความเข้มข้นของ antibody ต่ำๆ สอง ชนิดสามารถที่จะ fix complement เพียงอย่างเดียว และหนึ่ง antibodyที่เหลือ ไม่สามารถมี reactivity

Persistent infection in dengue virus

ไวรัสในกลุ่ม flavivivirus มักจะไม่มีการติดเชื้อแบบ persistence แต่อย่างไรก็ตามก็มีทดลองที่พบว่า Japanese encephalitis virus และ Westnile virus สามารถที่จะ ติดเชื้อและมี persistence ได้ใน vivo ส่วนใน dengue virus เองก็ได้มีการทกลองพบว่าสามารถทำให้เกิด persistent infection ได้ใน cell หลายชนิด ได้แก่ Epstein-Barr virus (EBV)-transformed human lymphoblastoid cell line, Raji cell [8]

โดยทั่วไปไวรัสสามารถที่จะใช้กลไกที่ทำให้เกิด persistent infection ได้ 2 วิธีได้แก่

1. มีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่อยู่ที่บริเวณผิวหน้าของเซลล์ เพื่อที่จะหลบจากการจดจำของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย
2. มีการเปลี่ยนแปลง gene expression เพื่อที่จะให้มีการแบ่งตัวที่ช้าลง เป็น nonlytic replication สาเหตุที่ virus ในกลุ่ม flavivivirus สามารถที่จะแบ่งตัวและเกิด persistence นั้นมีหลักฐาน จากการใช้ model ของ virus ในกลุ่มนี้ ได้แก่

Tick-borne encephalitis

Strain ที่แตกต่างกันของไวรัส TBEV มีผลต่อการเกิด persistent infection ที่แตกต่างกัน และ cell บางชนิดเองก็มีความจำเพาะ ต่อการติดเชื้อแตกต่างกัน ไวรัสที่มีความผิดปรกติทางโครงสร้างที่ ตำแหน่ง prM, E genes and NS1, gene fragments เป็นไวรัสที่มีความสามรถที่จะเกิด viral persistence มีการเปรียบเทียบการติดเชื้อ TBEV ใน human kidney cells ในระยะ acute กับ chronic infection ในไวรัสที่มีการเกิด persistence มีการเปลี่ยนแปลงของ NS1 และ E glycoprotein ซึ่งเป็น surface glycoprotein ของไวรัส [9]

Model ของการตรวจพบ Flavivirus ในไขกระดูก

ไวรัส GBV-C ถูกค้นพบในปี ค.ศ.1995 เนื่องจากมีลักษณะทางโครงสร้าง ที่คล้ายกับไวรัส hepatitis C ถึง 95% ขณะนั้นผู้ที่ค้นพบคิดว่าไวรัสนี้เป็นไวรัสชนิดเดียวกับ ไวรัสตับอักเสบ จึงได้ถูกเรียกอีกชื่อว่า hepatitis G virus แต่ภายหลังพบว่าไวรัสนี้ไม่ได้ เป็นสาเหตุ ของการเกิดโรคตับอักเสบ จึงทำให้ปัจจุบันนิยมเรียกว่า GBV-C มากกว่า

ในช่วงที่มีการค้นพบไวรัสนี้ใหม่ๆ เนื่องจากยังคิดว่าเป็นไวรัสที่คล้ายกับไวรัส HCV จึงมีผู้ที่พยายามทำการศึกษาเกี่ยวกับประเด็น extra-hepatic manifestations ของไวรัสนี้ว่าเหมือนกับ

ไวรัส HCV หรือไม่ ต่อมาก็พบว่าสามารถที่จะตรวจพบ GBV-C ได้ใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC), และตรวจพบไวรัสนี้ได้ในไขกระดูก, ม้าม และต่อมน้ำเหลือง โดยวิธการย้อม antigen ของไวรัส [10,11]

ในปี ค.ศ. 1998 ได้มีการทดลองหา GBV-C ในไขระดูกร่วมกับการใช้ strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Tth-based strand-specific assay) พบว่าทั้ง HCV และ GBV-C มี active replication ในไขกระดูกของผู้ป่วยโรคเลือด ที่เข้ามารับการเจาะตรวจ ไขกระดูก [12] มีหลักฐานที่สนับสนุนว่า GBV-C เป็น lymphotrophic virus จึงสันนิษฐานว่าไวรัสสามารถ ที่จะแบ่งตัวได้ในเซลล์ดังกล่าวและสามารถตรวจพบ GBV-C ได้ในอวัยวะต่างๆอยู่ในreticuloendothelial system

ในช่วงที่มีการระบาดของการติดเชื้อไวรัส HIV ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ GBV-C ไวรัส HIV เนื่องจากเป็นไวรัสที่มีคุณสมบัติที่จะติดเชื้อใน CD4 positive T cell เหมือนกัน และมีการศึกษา in vitro ที่พบว่าเมื่อเซลล์ CD4 positive T cell มี GBV-C อยู่ก่อนเมื่อมีการติดเชื้อ HIV เข้าไปในเซลล์เดียวกันจะทำให้ การแบ่งตัวของไวรัส HIV ลดลง [13,14] ซึ่งการค้นพบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านอกจากไวรัส GBV ในเซลล์แล้วยังสามารถ ทำให้เกิด interaction ระหว่างตัวมันเองกับไวรัสอื่นๆที่ติดเชื้อเข้าไปในเซลล์เดียวกัน

2.2 **อาการ/อาการแสดงของโรคเชื้อไวรัสเดงกี**

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นโรคติดต่อจากคนไปสู่คนโดยมีแมลงคือยุงลายเป็นพาหะ ยุงลายชนิดที่มีความสำคัญในทางระบาดวิทยาคือ Aedes aegypti ซึ่งเป็นยุงที่ออกหากิน ดูดเลือดคนในเวลากลางวัน โดยเชื้อไวรัสเดงกีจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และในที่สุดจะไปอยู่ ในต่อมน้ำลายของยุงตัวเมียที่ดูดเลือดของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในกระแสโลหิต ยุงที่มีเชื้อ ไวรัสอยู่จะสามารถแพร่เชื้อได้ตลอดช่วงชีวิตของมัน

ระยะฟักตัวของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในช่วงระยะเวลา 3-15 วัน โดยเฉลี่ยประมาณ 7 วัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไม่มีอาการ ส่วนในรายที่มีอาการนั้นสามารถมีอาการได้ 4 รูปแบบดังต่อไปนี้ (รูปภาพที่ 2.3)

1. **ไข้ทั่ว ๆ ไปหรือกลุ่มอาการติดเชื้อไวรัส** (undifferentiated fever or viral syndrome; UF) เป็นกลุ่มอาการที่มีลักษณะเหมือนกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถแยกกันได้จากอาการและอาการแสดงทางคลินิก คือมีไข้สูงเฉียบพลัน โดยอาจจะมีผื่น maculopapular ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ อาการในกลุ่มนี้มักพบในเด็กเล็ก
2. **ไข้เดงกี** (dengue fever; DF) ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงเฉียบพลัน ปวดศีรษะมาก ปวดรอบกระบอกตา ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดกระดูกอย่างรุนแรงที่เรียกว่า "break bone fever" การทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก (positive tourniquet test) ส่วนใหญ่จะตรวจพบเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดต่ำ อาการในกลุ่มนี้มักพบในเด็กโต และผู้ใหญ่
3. **ไข้เลือดออกเดงกี** (dengue hemorrhagic fever; DHF) อาการและอาการแสดงเหมือนกับไข้เดงกี (dengue fever) ร่วมกับมีการรั่วของพลาสมา ทำให้ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ Hct อาจตรวจพบน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดโดยเฉพาะช่องเยื่อหุ้มปอดข้างขวาจากการตรวจร่างกายหรือจากภาพเอ็กซเรย์ปอด บางรายอาจตรวจพบน้ำในช่องท้องได้ ความรุนแรงของอาการในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งที่สอง (การติดเชื้อไวรัสเดงกีทุติยภูมิ - secondary dengue infection) ซึ่งเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ต่างซีโรไทป์กับการติดเชื้อครั้งแรก (การติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิ – primary dengue infection) และจะมีแนวโน้มที่จะมีความรุนแรงมากกว่าการติดเชื้อครั้งแรก ยกเว้นในเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 1 ขวบซึ่งยังมีภูมิคุ้นกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีที่ได้รับจากมารดาซึ่งเคยติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อนและภูมิคุ้มกัน

ดังกล่าวยังหลงเหลืออยู่โดยที่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อแก่เด็กได้ แต่จะทำให้เกิดอาการของการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่รุนแรงได้

การดำเนินโรคของไข้เลือดออกเดงกีแบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะไข้ (febrile stage)

ไข้จะสูงเฉียบพลันและจะสูงลอยประมาณ 2-7 วัน ไม่ลดไข้เพียงเล็กน้อย ร่วมกับมีอาการปวดศีรษะ ปวดหน้าแดง จุกเสียดแน่นท้องบริเวณลิ้นปี่ ตับโตกดเจ็บ ตอบสนองหรือตอบสนองต่อยาเกต์ให้ผลบวก เลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น เลือดกำเดาออก ถ่ายอุจจาระเป็นสีดำ ผื่น petechiae ขึ้นที่ผิวหนัง เป็นต้น เมื่อยกล้ามเนื้อและกระดูกคลื่นไส้อาเจียน ผลทดสอบทูนิ

ระยะที่ 2 ระยะวิกฤต/ช็อก (shock stage)

เกิดพร้อม ๆ กับช่วงที่ไข้ลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดในช่วงระยะเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะเข้าสู่ระยะนี้หลังจากปริมาณเกร็ดเลือดต่ำลงประมาณ 12-24 ชั่วโมง [15] ถ้ามีการรั่วของพลาสมามากจะทำให้ผู้ป่วยมีความดันโลหิตต่ำและช็อกได้

ระยะที่ 3 ระยะฟื้นตัว (convalescent stage)

มีการหยุดการรั่วของพลาสมาร่วมกับอาการโดยทั่ว ๆ ไปของผู้ป่วยที่ดีขึ้น ผู้ป่วยจะมี ความอยากอาหารมากขึ้น ปัสสาวะออกมากขึ้น หัวใจเต้นช้าลง อาจมีผื่นขึ้นบริเวณลำตัว แขนขา ซึ่งเป็นผื่นที่มีลักษณะเฉพาะสำหรับโรคนี้ เรียกว่า "convalescent rash" โดยจะ เห็นมีลักษณะเป็นวงเล็ก ๆ สีขาวกระจายอยู่บนพื้นแดงซึ่งเป็น petechial rash ที่ขึ้น รวมกัน

ความรุนแรงของไข้เลือดออกเดงกี แบ่งออกเป็น 4 ระดับ (grade) ดังนี้ (รูปภาพที่ 2.4)

ระดับ 1 (grade I) ผู้ป่วยมีไข้ ร่วมกับการทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก โดยที่ไม่พบมีเลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ และ/หรือ มีจ้ำเลือดขึ้นได้ง่ายจากการโดนกระทบกระแทก (easy bruising)

ระดับ 2 (grade II) ผู้ป่วยมีเลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ เอง (spontaneous bleeding)

ระดับ 3 (grade III) ผู้ป่วยมีความดันโลหิตต่ำ, ชีพจรเบาเร็ว, pulse pressure แคบ (น้อยกว่า 20 มม.ปรอท), ช็อก

ระดับ 4 (grade IV) ผู้ป่วยมีภาวะช็อกอย่างรุนแรง (profound shock), คลำชีพจรไม่ได้, วัดความดันโลหิตไม่ได้

4. **ไข้เดงกีช็อก** (dengue shock syndrome; DSS) คือกลุ่มอาการไข้เลือดออกเดงกี (dengue hemorrhagic fever) ที่มีการรั่วของพลาสมามากจนทำให้ผู้ป่วยมีภาวะช็อก คือไข้เลือดออกเดงกีที่มีระดับความรุนแรง 3 หรือ 4 นั่นเอง

2.3 การเปลี่ยนแปลงทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ

2.3.1 **การตรวจนับเม็ดเลือด** (CBC) ระดับ Hct จะสูงขึ้นจากการที่ผู้ป่วยมีภาวะแห้งน้ำ เนื่องจากรับประทานได้น้อย ไข้สูง ร่วมกับมีการรั่วของพลาสมา โดยมักจะเกิดในวันเดียวกันหรือภายหลังจากวันที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดลดลงต่ำที่สุด ซึ่งมักจะพบในระยะก่อนไข้ลง ใกล้ที่จะเข้าสู่ระยะวิกฤต/ช็อก ส่วนในรายที่ระดับ Hct ต่ำลงควรที่จะพยายามค้นหาว่ามีเลือดออกจากอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะอวัยวะภายในช่องท้องหรือไม่ หรือผู้ป่วยอาจมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) จากโรคเลือดบางอย่างเช่น โรคธาลาสซีเมีย ฮีโมโกลบินเอช เป็นต้น ปริมาณเม็ดเลือดขาวในช่วงแรกอาจปกติหรือสูงกว่าปกติเล็กน้อย แต่ประมาณจะลดลงในช่วงเวลาต่อมา โดยอาจจะลดลงอยู่ในช่วง 1,000-2,000 ตัว/ลบ.มม. ได้ ร่วมกับมีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และจากการตรวจดูเสมียร์เลือด (peripheral blood smear) อาจพบว่าลักษณะของ lymphocyte จะเป็น atypical lymphocyte ชนิด plasmacytoid ได้สูงถึง 10-35% ส่วนปริมาณเกร็ดเลือดสามารถลดลงต่ำกว่า 20,000 /ลบ.มม. ได้[16]

2.3.2 **การตรวจการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง** (ESR) จะปกติในช่วงที่มีไข้ และจะลดต่ำลงในช่วงระยะวิกฤต/ช็อก ซึ่งอาจนำมาใช้ช่วยในการแยกโรคกับการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacterial sepsis) ได้

2.3.3 **การทดสอบทูนิเกต์** (tourniquet test) ทำโดยการใช้เครื่องวัดความดันโลหิตรัดที่ต้นแขน ขึ้นความดันให้อยู่กึ่งกลางระหว่างความดัน systolic และความดัน diastolic ค้างไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วอ่านผลหลังจากคลายความดันที่รัดไว้แล้วประมาณ 1 นาที โดยแปลผลว่า "บวก" ถ้ามีจุดเลือดออก (petechiae) มากกว่า 10-20 จุด/ตารางนิ้ว[15,18] โดยมีความไว (sensitivity) ของวันที่ 1, 3 และ 5 ของโรคอยู่ที่ 53.3%, 90.6% และ 98.7% ตามลำดับ ความจำเพาะ (specificity) ของวันที่ 1, 3 และ 5 ของโรคอยู่ที่ 75.8%, 77.8% และ 74.2% ตามลำดับ[18]

2.3.4 **การตรวจการแข็งตัวของเลือด** (coagulogram) จะตรวจพบว่าค่า PT และ PTT ยาวกว่าค่าควบคุมได้ โดยที่ค่า PTT จะมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า เกิดจากการที่การทำงานของตับบกพร่อง ร่วมกับมีภาวะ DIC

2.3.5 **การตรวจการทำงานของตับ** (liver function tests) ผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถตรวจพบการเพิ่มขึ้นของระดับ transaminase enzymes โดยที่ระดับ AST จะเพิ่มสูงกว่าระดับ ALT ผู้ป่วยมักไม่ค่อยมีอาการตาตัวเหลือง นอกจากจะมีภาวะแทรกซ้อนคือมีภาวะตับวายอย่างรุนแรง (fulminant hepatic failure) หรือมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยที่มีโรคเลือดบางชนิดอยู่แล้ว เช่น โรคธาลาสซีเมีย ฮีโมโกลบินเอช และโรคขาดเอนไซม์ G-6-PD เป็นต้น

2.3.6 **ภาพเอ็กซเรย์ปอด** (chest X-ray) จะพบน้ำในเยื่อหุ้มปอดได้ในระยะที่มีการรั่วของพลาสมา โดยเฉพาะช่องเยื่อหุ้มปอดข้างขวา

2.4 การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงกี/ไข้เลือดออกเดงกีช็อก

การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงกี/ไข้เลือดออกเดงกีช็อก (DHF/DSS) นั้นอาศัยอาการทางคลินิกและการเปลี่ยนแปลงทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้นตามเกณฑ์การวินิจฉัยตามองค์การอนามัยโลก (WHO) โดยใช้เกณฑ์อาการทางคลินิก 2 ข้อแรกเป็นหลัก ร่วมกับเกณฑ์การตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 1 ข้อ เกณฑ์ดังกล่าวนี้ช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกเดงกี/ไข้เลือดออกเดงกีช็อกได้ตั้งแต่ในระยะแรกของโรค ก่อนที่ผู้ป่วยจะเข้าสู่ภาวะช็อกเต็มขั้นได้ ดังนั้นจึงเป็นเพียงการวินิจฉัยเบื้องต้น (provisional diagnosis) เท่านั้น[17]

อาการทางคลินิก

1. ไข้สูงเฉียบพลัน (2-7 วัน)
2. อาการเลือดออก (นับรวมถึงผลบวกจากการทดสอบทูนิเกต์ด้วย)
3. ตับโต (มักกดเจ็บร่วมด้วย)
4. มีภาวะช็อก

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. ปริมาณเกร็ดเลือด < 100,000/ลบ.มม.
2. มีการเพิ่มขึ้นของ Hct > 20% เมื่อเทียบกับค่าปกติเดิม หรือค่าเฉลี่ยปกติสำหรับอายุและเพศของประชากรนั้น ๆ

2.5 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี

การตรวจทางน้ำเหลือง (Serologic diagnosis)

คือ การตรวจหา antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งมีอยู่หลายวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน แต่วิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไปคือวิธี ELISA และ HAI ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป ข้อเสียของการตรวจหา antibody คือสามารถมีปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ได้ระหว่าง flavivirus ด้วยกันเช่น Japanese encephalitis virus (JEV), St. Louis encephalitis virus, West Nile virus ซึ่งจะทำให้มีปัญหาในการแปลผล

ในพื้นที่ที่มีเชื้อเหล่านี้อยู่ด้วย สำหรับในประเทศไทยก็จะมีปัญหา ในการแปลผลเพื่อแยกจากการติดเชื้อ JEV ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมี IgM ขึ้นภายหลัง จากมีไข้ประมาณ 2-4 วัน IgM จะเพิ่มขึ้นและคงอยู่ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 3-6 เดือน สำหรับการติดเชื้อแบบทุติยภูมินั้นจะพบการเพิ่มขึ้นของ IgG ก่อน IgM ถึงแม้ว่าจะเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกี serotype ที่ต่างจากเดิมก็ตาม (รูปภาพที่ 2.5)

การตรวจทาง serology สำหรับ dengue virus จะค่อนข้างสลับซับซ้อน ในการแปลผลเนื่องมาจาก

1. ผู้ป่วยอาจจะมีการติดเชื้อหลายครั้ง โดยไวรัสเดงกี 4 subtype* ได้เนื่องจากไม่มีการ cross-protection ของ neutralizing antibodies
2. ในบางพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสในกลุ่ม flaviviviruses อื่นๆ ก็จะมี ผลการตรวจลวงเนื่องจากร่างกายมีการสร้าง antibodies ต่อ flaviviruses เหล่านี้เหมือนกัน
3. IgG antibodies มีความสามารถที่จะทำให้เกิดการ cross-reactivity ต่อ homologous และ heterologous flavivirus antigen
4. หลังจากที่มีการติดเชื้อครั้งก่อนร่างกายจะมีการสร้าง antibodies อยู่ได้นาน

การตรวจหา antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกีมีหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. Hemagglutination-inhibition test (HAI หรือ HI)

   หลักการของการตรวจโดยวิธีนี้ก็คือ antibodies ต่อ dengue virus สามารถที่จะยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน วิธีนี้จะเป็นวิธีที่เตรียมได้ง่ายและรวดเร็ว ขั้นตอนต้องมีการเตรียมสารที่ยับยั้ง non-specific inhibitor ต่างๆ ด้วยการเติม acetone หรือ kaolin และเติม type O red blood cells เพื่อ remove non- specific inhibitor of agglutinins ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องใช้การเปรียบเทียบ 2 serumในระยะเวลาที่ห่างกัน การตอบสนองของระดับ antibody ต่อการติดเชื้อ dengue virus ในกรณีที่เป็น primary infection จะมีระดับของการตอบสนองโดย antibodies จะสูงขึ้นช้าๆ และอยู่ระดับต่ำๆ ส่วนกรณีที่เป็น

secondary infection การตอบสนองจะรวดเร็วและขึ้นสูง ในกรณีที่เป็น primary infection ระดับของ antibodies response น้อยกว่า 1:2,560 แต่ถ้า เป็น secondary infection ระดับของ antibodies titer ควรจะมากกว่า 1:2,560

เนื่องจากเชื้อไวรัสเดงกีเป็นไวรัสที่มีสาร hemagglutinin ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่มกัน จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการหา antibody ต่อเชื้อไวรัสโดยดูการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง หลังจากผสมซีรั่มของผู้ป่วยที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ กับสาร hemagglutinin การแปลผลนั้นอ่านออกมาเป็นค่า titer ของซีรั่มที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ แต่ต้องแปลผลโดยใช้ซีรั่มสองครั้งที่เจาะห่างกันอย่างน้อย 7 วัน (ตารางที่ 2.3) วิธีนี้ในปัจจุบันยังถือว่าเป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นวิธีที่สามารถแยกการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า antibody ที่ขึ้นนั้นเป็นชนิด IgG หรือ IgM วิธีนี้สามารถแยก serotype ของเชื้อไวรัสเดงกีได้สำหรับการติดเชื้อแบบปฐมภูมิ ส่วนการติดเชื้อไวรัสเดงกีทุติยภูมินั้นไม่สามารถบอก serotype ได้เนื่องจากเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีซ้ำด้วย serotype อื่น จะมีการกระตุ้นให้มีการสร้าง antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกี serotype เดิมให้สูงขึ้น เพราะเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 serotypes มี antigen บางส่วนที่เหมือนกัน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “doctrine of original antigenic sin”

2. Plaque reduction neutralization test (PRNT) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากที่สุดเมื่อเทียบกับการตรวจทางน้ำเหลืองชนิดอื่น ๆ สามารถแยก serotype ในการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิได้[20]แต่เป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยากในการทำและเป็นวิธีที่ใช้เวลาในการทำนาน จึงไม่เป็นที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน ใช้หลักการลดการเกิดการเกาะกลุ่มกัน (plaque formation) ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี หลังจากนำเชื้อไวรัสเดงกีไปผสมกับซีรั่มของผู้ป่วย การแปลผลนั้นอ่านเป็นค่า titer ของซีรั่มที่สามารถลดจำนวน plaque ได้ 50-90% [21,22]
3. Complement fixation test (CF) เป็นการทดสอบที่อาศัยหลักการที่ว่า complement จะถูกนำใช้ถ้ามีการจับกันระหว่าง antigen กับ antibody ทำให้ไม่มีปริมาณ complement เหลือมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดการแตก (hemolysis) ของเม็ดเลือดแดงที่จับกับ antibody กับเม็ดเลือดแดง วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่สามารถแยก serotype ของเชื้อไวรัสเดงกีสำหรับการติดเชื้อแบบปฐมภูมิได้ แต่วิธีการทำยุ่งยาก และ antibody ขึ้นช้ากว่า antibody ที่ทดสอบได้โดยวิธี HAI [23]

Enazyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) เป็นการทดสอบที่มีความสะดวก รวดเร็ว และง่ายกว่าสามวิธีการทดสอบทางน้ำเหลืองข้างต้น มีความไวและความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดของ antibody ระหว่าง IgG และ IgM ได้ สามารถแยกการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ รวมทั้งยังสามารถแยกการติดเชื้อ JEV ได้

หลักการของ ELISA คือ การจับคู่กันระหว่าง antigen กับ antibody ดังนั้นการตรวจโดยวิธีนี้จะสามารถที่จะ detect ได้ทั้ง antigen และ antibody ที่อยู่ในตัวอย่างส่งตรวจ

ขั้นตอนของการทำ ELISA มีดังนี้

1. ในกรณีที่เป็นการตรวจหา antibody ก็จะใช้ antigen ที่เตรียมไว้ โดยที่ antigen จะเคลือบอยู่บนผิวของ หลุม
2. เติมสิ่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงไปในหลุมที่มี antigen coat อยู่ หากมี antibody ที่ต้องการหาอยู่ในตัวอย่างก็จะเกิดการจับกันของ antibody ที่อยู่ในส่งส่งตรวจกับ antigen ที่อยู่ในหลุม
3. ทำการล้างเอาส่วนของ antibody ที่ไม่ต้องการออก ทำให้เหลืออยู่แต่ antigen-antibody complex
4. เติม antibody ที่สองลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกริยากับ antigen-antibody complex อีกครั้ง แล้วทำการล้างเอาส่วนของ second antibody ออก
5. เติมสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นปฏิกริยาทำให้เกิดสีในหลุม แล้วทำการอ่านผล โดยวัดตามปริมาณของสี หรือแสงจากในหลุม การอ่านผลอาจจะใช้เป็น spectrophotometer หรือ optical device อื่นๆ

ปัจจุบันมีหลายวิธีย่อย ๆ แต่วิธีที่ได้รับความนิยมมากคือ Immunoglobulin M capture enzyme linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) และ rapid ELISA วิธี MAC-ELISA ถือเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี การแปลผลอาจใช้ผลจากซีรั่มเดี่ยวได้ หรือถ้าเป็นซีรั่มคู่นั้นสามารถเจาะเลือดห่างกันเพียง 2-3 วัน

การแปลผลว่ามีติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น ค่า antibody ต่อเชื้อไวรัสเดงกีจะต้องมากกว่า antibody ต่อ JEV ถ้าเป็นการติดเชื้อไวรัสเดงกีปฐมภูมิ ค่า IgM:IgG จะมากกว่า 1.8:1 และค่า IgM ต้องมีค่าอย่างน้อย 40 units หรือมีการเพิ่มขึ้นของ IgM จากค่าที่น้อยกกว่า 15 units เป็นมากกว่า 30 units ส่วนการติดเชื้อไวรัสเดงกีทุติยภูมินั้นค่า IgM:IgG จะน้อยกว่า 1.8:1 หรือ ค่า IgM น้อยกว่า 40 units ร่วมกับมีการเพิ่มขึ้นของ IgG อย่างน้อย 2 เท่า โดยที่ค่า IgG ในซีรั่มที่สองจะต้องมีค่าอย่างน้อย 100 units [17,24-26]

มีหลายการศึกษาที่ใช้วิธี ELISA ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้สิ่งส่งตรวจอื่น ที่ไม่ใช้เลือด ได้แก่ น้ำลาย[15-18] ปัสสาวะ ซึ่งได้ทั้งความไวและความจำเพาะสูง ส่วนการตรวจ IgM ในน้ำไขสันหลัง มีระดับต่ำกว่าระดับ IgM ในเลือดมาก ยังไม่สามารถนำมาเป็นวิธีที่ใช้ ในการวินิจฉัย ภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาทจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีได้

การแยกเชื้อไวรัสเดงกี (Viral isolation)

วิธีการแยกเชื้อไวรัสเป็นวิธีซึ่งเป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโดยทั่ว ๆ ไปรวมทั้งเชื้อไวรัสเดงกีด้วย แต่วิธีในการทำยุ่งยาก รวมทั้งใช้เวลานาน เป็นสัปดาห์ จึงไม่เป็นที่นิยม วิธีนี้จะตรวจได้ในช่วงที่มีไวรัสในกระแสเลือด (viremia) คือในช่วง 6 วันแรก หลังจากมีอาการ[33] เนื่องจากปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดจะสูงในช่วงแรกและจะลดลงเรื่อย ๆ สวนทางกันกับ antibody ซึ่งจะขึ้นสูงขึ้น

ไวรัส dengue สามารถเพาะเลี้ยงได้ครั้งแรกในปี 1940 โดยใช้ซีรั่มของผู้ป่วยใน suckling mouse brain และในปี 1960 สามรถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ใน mammalian cell เช่น Vero, LLC, MK2, BHK ซึ่งแต่ละ cell จะมี sensitivity ที่แตกต่างกัน และเซลล์เหล่านี้จะมีการแสดง cytopathic effect เมื่อถูกติดเชื้อโดยไวรัสเดงกี โดยสามารถสังเกตได้ จากการที่มี plaque เกิดขึ้นใน agar

ปัจจุบันการเลี้ยงเชื้อใน mammalian cell นิยมน้อยลงเนื่องจากมีการนำเ ซลล์ที่ได้มาจากยุงมาใช้แทน ซึ่งเป็นวิธีที่ไวมากกว่าการใช้เซลล์อื่น แต่การใช้เซลล์ที่ได้จากยุงจะเกิด cytopathic effect ได้ยากเนื่องจากจำนวนของไวรัส ในเซลล์จะสูงมาก ทำให้เซลล์ตายได้ง่าย ดังนั้นจึงจะต้องใช้วิธีพิเศษในการตรวจพิเศษ ได้แก่ FA test, PCR และนอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงในระบบนี้ จะใช้ได้เฉพาะในบางห้องปฏิบัติการที่มีการเตรียมเซลล์จากแมลงได้เป็นอย่างดี สำหรับ cell ของยุงที่นิยมใช้ได้แก่ AP-61 จากยุง *Ae. psuedoscutallaris* , C6/36 clone จาก *Ae. albopictus* และ TRA-284 จาก *Tx amboinensis* จากเซลล์ดังกล่าวเซลล์ที่มีความไวที่สุดได้แก่ TRA-284 แต่ C6/36 cell line นิยมใช้อย่างกว้างขวางมากกว่าชนิดอื่นๆ เนื่องจากดูแลรักษาได้ง่ายประกอบกับยังมีความไวที่ดี

การอ่านผลใช้การดูวิธีการทำปฏิกิริยาของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี cytopathic effect (CPE) กับ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละ serotype โดยใช้วิธีการย้อม Immunofluorescence (IF)

การตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Molecular detection)

วิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลสามารถตรวจได้ไวกว่าวิธีการแยกเชื้อไวรัส เนื่องจากมีกระบวนการเพิ่ม ปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัส ทำให้สามารถ ตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีปริมาณ

น้อย ๆ ได้ การตรวจทางซีวโมเลกุลนี้มีข้อดีกว่าการตรวจหา antibody จากซีรั่มหลายประการ สามารถแยก serotype ของเชื้อไวรัสได้ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ไม่มีผลบวกข้ามกับ Flaviviruses ชนิดอื่น ๆ สามารถวินิจฉัยโรคโดยไม่จำเป็นต้องเก็บสิ่งส่งตรวจสองครั้ง ส่วนความไวนั้น ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของโรคในขณะที่เก็บสิ่งส่งตรวจ และขึ้นกับชนิดของสิ่งส่งตรวจด้วย โดยความไวในการตรวจจะสูงมากในช่วงที่มีไข้ทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ในระยะแรกของ โรค ซึ่งในขณะนั้นการตรวจทางน้ำเหลืองอาจให้ผลลบได้ การตรวจวิธีนี้ถ้าเก็บสิ่งส่งตรวจในช่วงระยะก่อนไข้ลงเพียงเล็กน้อยหรือหลังไข้ลงไปแล้วอาจตรวจได้ผลลบจากซีรั่ม แต่ยังอาจจะสามารถตรวจพบได้ใน buffy coat หรือ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เนื่องจากเชื้อไวรัสเดงกีมีการเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดขาว

การทำ RT-PCR โดยหลักการคือการ amplify ชิ้นส่วนของ ribonucleic acid (RNA) โมเลกุล โดยการสร้าง DNA จากสาย RNA ด้วยกระบวนการ reverse transcription DNA ที่ได้ก็จะเรียกว่า complementary DNA หลังจากนั้น จะมีวิธีการในการเพิ่มจำนวนของ specific part of DNA หรือที่เรียกว่า amplification โดยวิธี polymerase chain reaction ซึ่งกระบวนการนี้จะใช้ enzyme DNA polymerase ทำให้เกิดปฏิกริยาที่อุณหภูมิต่างๆ

RT-PCR มีขั้นตอนในการทำดังนี้

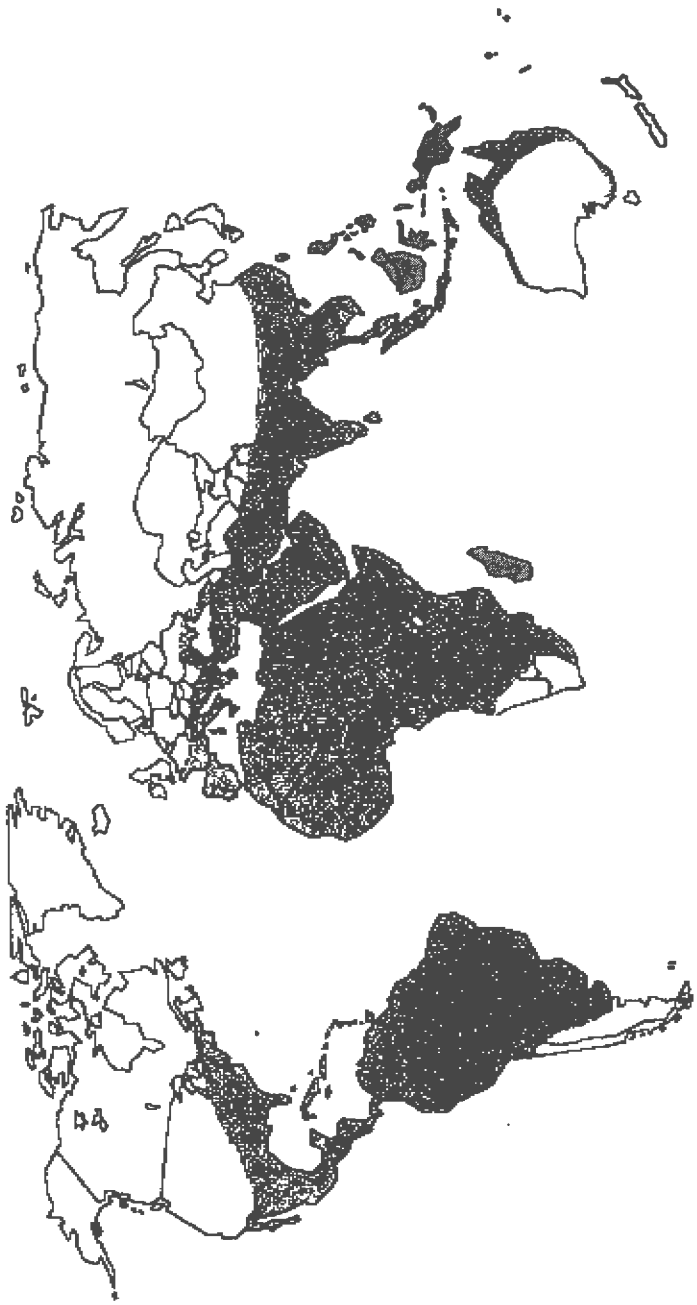
First strand reaction: เป็นการสร้าง complimentary DNA จาก messenger RNA template ด้วย dNTPs และ an RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase) โดยการนำ template มาทำปฏิกริยา dNTPs, reverse transcriptase, primer และ reverse transcriptase buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Second strand reaction: เป็นการเพิ่มจำนวนของ DNA โดยใส่ upstream และ downstream primer ทำปฏิกริยากับ DNA polymerase เพื่อที่จะสร้าง double-stranded DNA จากสาย complimentaryDNA เมื่อได้ double-stranded DNA หลังจากนั้น ทำการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ประมาณ 95 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะแยกสาย cDNA ให้เป็นสองสาย ต่อมาก็ทำให้อุณหภูมิลดลงเพื่อให้เกิดปฏิกริยาขั้นแรกใหม่ หลังจากที่มีการ run ปฏิกริยาหลายรอบก็จะได้จำนวนของสาย DNA เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่นถ้าทำ 30 cycle ก็จะได้ DNA หลายล้าน copies ขั้นตอนต่อไปคือการ purificatiuon โดย degrade สาย RNA ที่คงเหลืออยู่เพื่อให้ได้ product ที่มีแต่ DNA ขั้นตอนนี้จะทำโดยการใส่ enzyme RNase H

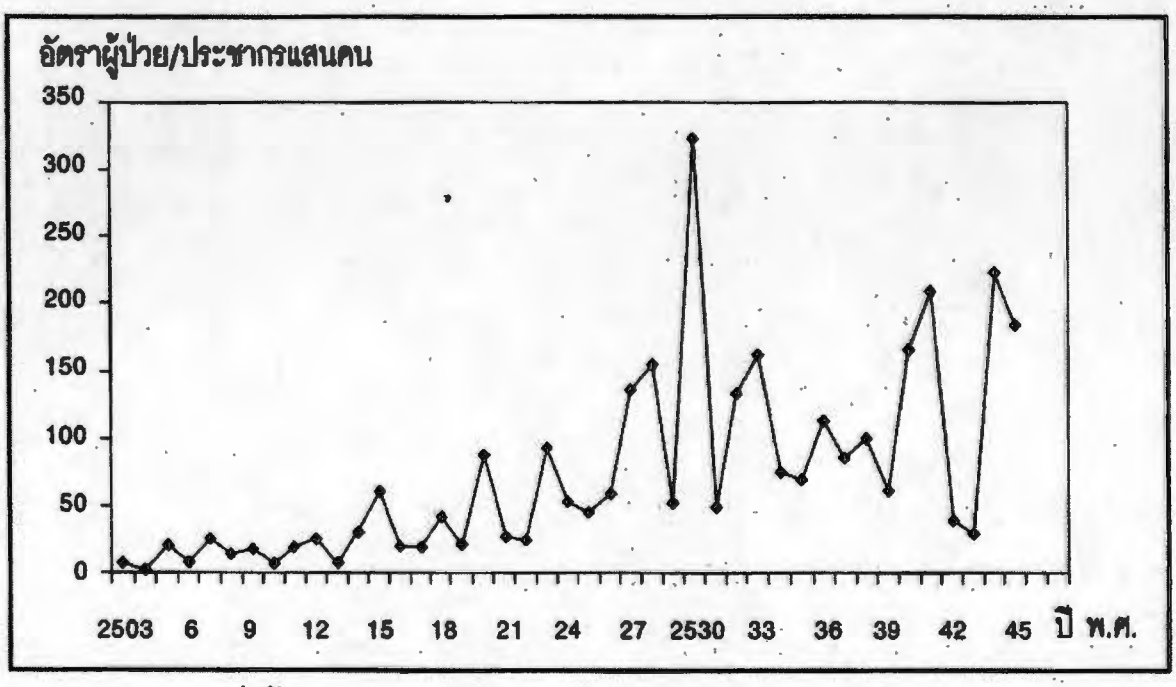
การทำ RT-PCR จะเป็นวิธีที่ช่วยให้ตรวจหา DNA ที่ sensitive สามารถตรวจหา ได้แม้จะมีปริมาณเล็กน้อยก็ตาม นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงเทคนิคการทำ PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และ specificity เช่นการใช้เทคนิค two-step nested PCR, multiplex PCR, NASBA assay การตรวจทางชีวโมเลกุลสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีมีหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นการตรวจหา DNA ที่ถูกทำให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น (amplification) เป็น DNA ที่เปลี่ยนมาจาก RNA ของเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ปัจจุบันมีชนิดย่อย ๆ อีกหลายวิธี เช่น nested RT-PCR, real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR เป็นการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูงสำหรับเลือดเมื่อเทียบกับการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mosquito C6/36 โดยมีความไวอยู่ในช่วง 84-100% และความจำเพาะอยู่ในช่วง 86-100%[32-39] จะเห็นว่าแต่ละการศึกษาความไวและความจำเพาะต่างกัน เนื่องจากมีการใช้ primer ต่างกัน สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาต่าง ๆ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ ต่าง ๆ แตกต่างกัน ทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีการทดสอบ RT-PCR ที่เป็นมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี สิ่งส่งตรวจอื่นที่ไม่ใช่ซีรั่มเช่น เลือด, buffy coat และปัสสาวะ [40-43] ก็สามารถนำมาเป็นสิ่งส่งตรวจเพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR ได้ มีการศึกษาที่เทียบสิ่งส่งตรวจระหว่างเลือดซีรั่มและ buffy coat พบว่าซีรั่มเป็นสิ่งส่งตรวจที่ดีที่สุด[44]
2. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) เป็นวิธีที่ตรวจหา RNA ที่ถูกทำให้เพิ่มปริมาณขึ้น โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนอุณหภูมิขึ้นลงเหมือนกับวิธี RT-PCR และมีการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการน้อยเนื่องจากเป็นการตรวจหา RNA ซึ่งเป็นข้อดีของวิธีนี้ที่เหนือกว่าวิธี RT-PCR แต่ RNA มีความคงตัว (stability) น้อยกว่า DNA การอ่านผลใช้วิธี electrochemiluminescence (ECL) การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี NASBA โดยใช้เลือดเป็นสิ่งส่งตรวจมื่อเทียบกับการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด mosquito C6/36 โดยมีความไว 98.5% และความจำเพาะสูงถึง 100% [45]แต่การศึกษาเกี่ยวกับวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี NASBA ยังไม่ได้รับความนิยมและยังไม่เป็นที่แพร่หลายเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี RT-PCR

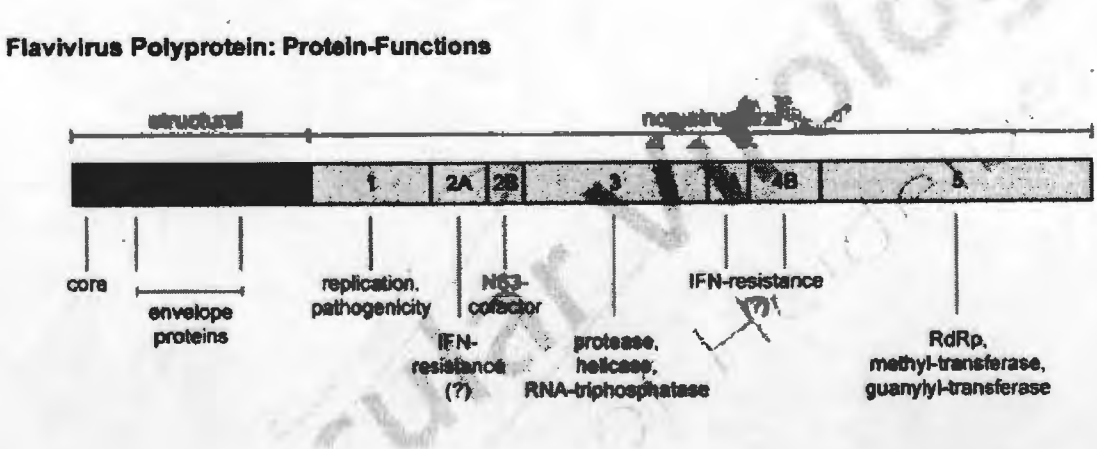
รูปที่ 2.1: ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศต่าง ๆ



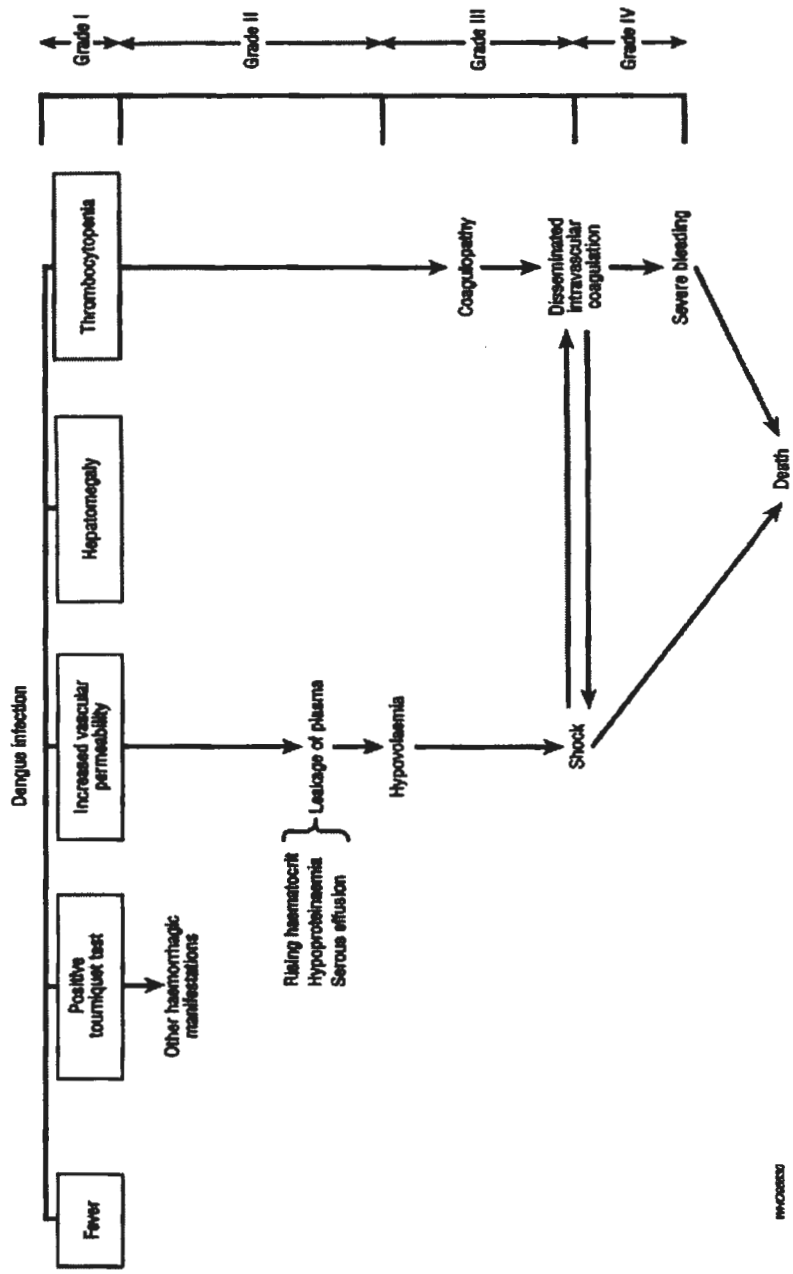
รูปที่ 2.2: อัตราการป่วยจากโรคไข้เลือดออกปี 2503-2545



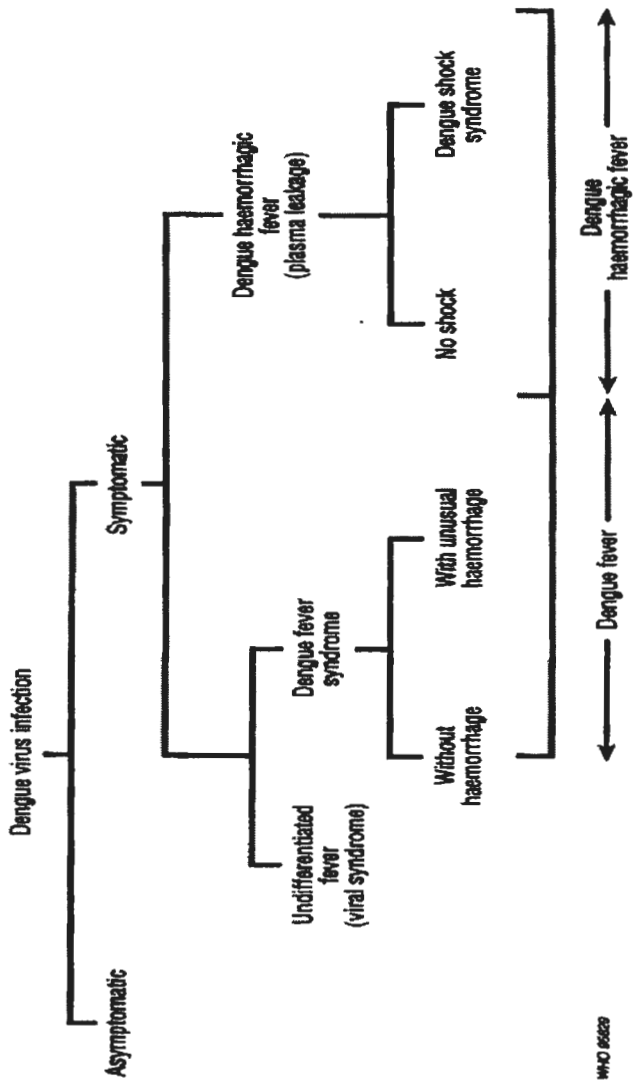
รูปที่2.3: แสดง โปรตีนของไวรัสเดงกี



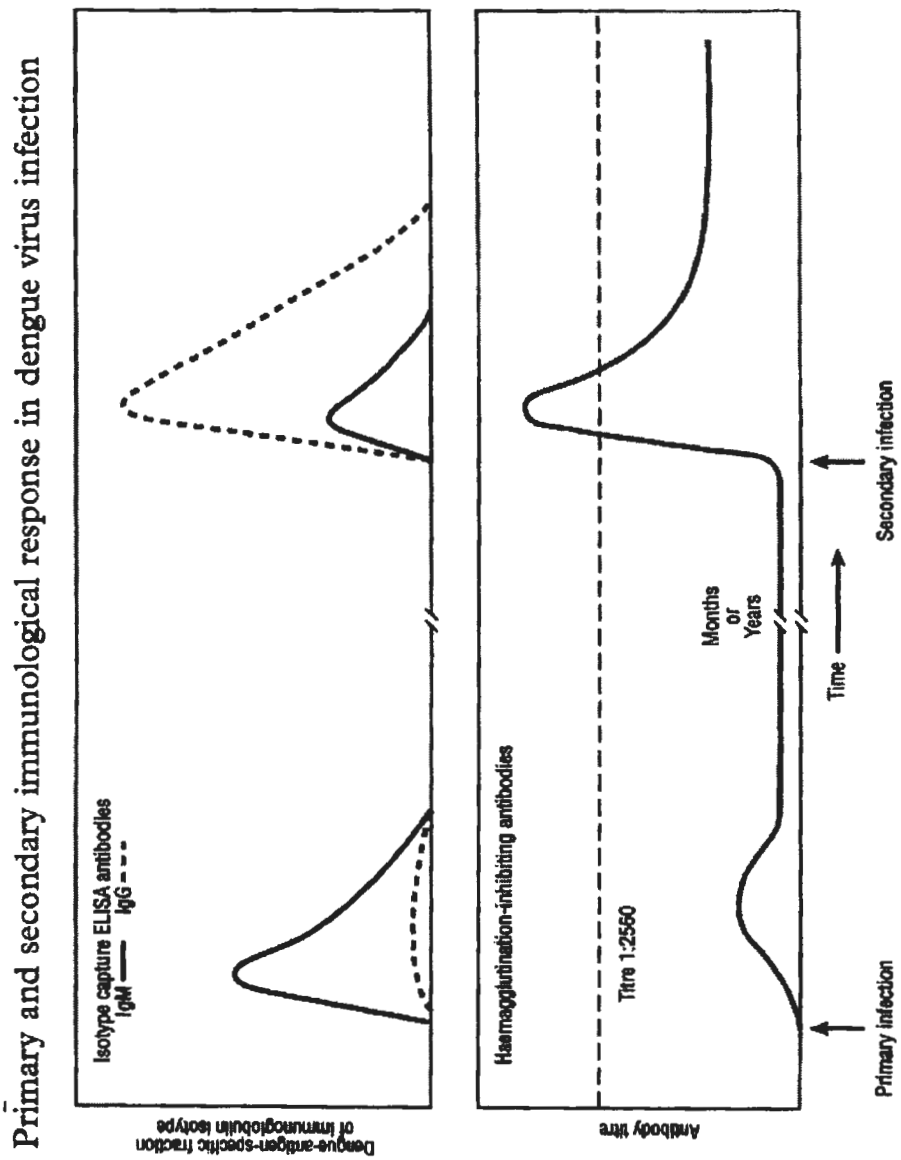
รูปภาพที่2.4: ระดับความรุนแรงของไข้เลือดออกเดงกี



รูปภาพที่2.5 : รูปแบบของอาการ/อาการแสดงของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี



รูปภาพที่2.6: **ตอบสนองของภูมิคุ้มกันใน** primary **และ** secondary dengue infection



ตารางที่ 2.1 การกระจายของเชื้อไวรัสเดงกีในภูมิภาคต่าง ๆแยกตาม serotype

Geographic distribution of dengue virus serotypes and genotypes identified by comparative sequence analysis of RT/PCR fragments	
Dengue-1	I. Thailand/Indonesia/Malaysia/Pacific islands (1970s) II. Thailand/ The Americans-Carribean/Africa/Pacific Island (1980s) III. Thailand/The Phillipines
Dengue-2	I. Thailand/Burma/Malaysia/Vietnam/New Guinea/The America-Caribean (1980-90s) II. Sri Lanka/ The Seychelles III. Africa IV. Africa (endemic)
Dengue-3	I. Malaysia/Indonesia/Pacific islands II. Thailand/Malaysia/Indonesia/Burma/Vietnam/The Philippines III. Carribean/ Pacific islands (1970) IV. Thailand (1971)
Dengue-4	I. The Philippines/Malaysia/Burma/Indonesia/Sri lunka/Africa/The American-Carribean/Pacific islands

ตารางที่2.2 แสดงการพบไวรัสเดงกีในอวัยวะต่าง ๆของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก

Reference	Method	Tissue	
		No virus detected (positive/no. tested)	Virus not detected (no. tested)
Nisalak et al, 1970	Virus isolation (tissue culture, newborn mice)	Blood (5/103),lymph node (1/22), bone marrow (1/21), liver (1/9)	Liver (92), spleen(65), kidney(59), skin
Guzman et al, 1984	Virus isolation (tissue culture, newborn mice)	Liver (1/9)	Blood(4), spleen(6), brain(5), kidney(4)
Rosen et al, 1989	Virus isolation (mosquitoes)	Liver(4/16), spleen(1/16), midbrain, (1 /16), heart blood(1/15)	Lymph node (16) Cerebrum (16) Cerebellum (16) Kidney (5)
Sumarto et al, 1983	Virus isolation (mosquitoes)	Liver (1/17)	Brain, CSF
Bhamarapravati and Boonyapaknavil, 1966	Antigen detection	Spleen (1/21), thymus (1/21)	Liver (21), lymph node(21), skin(21), kidney(21)

ตารางที่ 2.3: การแปลผล Hemagglutination-inhibition test ของเชื้อไวรัสเดงกี

Antibody response	S1–S2 interval[b]	Convalescent titre[c]	Interpretation
≥4-fold rise	≥7 days	≤1:1280	Acute flavivirus infection, primary
≥4-fold rise	Any specimen	≥1:2560	Acute flavivirus infection, secondary
≥4-fold rise	<7 days	≤1:1280	Acute flavivirus infection, either primary or secondary
No change	Any specimen	>1:2560	Recent flavivirus infection, secondary
No change	≥7 days	≤1:1280	Not dengue
No change	<7 days	≤1:1280	Uninterpretable
Unknown	Single specimen	≤1:1280	Uninterpretable

[a] These criteria were derived empirically from data collected at the U.S. Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand. Laboratories should assess the sensitivity of their assay with standard sera from WHO Collaborating Centres for Arboviruses and/or Haemorrhagic Fever Reference and Research or WHO Collaborating Centres for New, Emerging and Re-emerging Diseases (see Annex 6). Laboratories should also establish baseline data for the population they serve during a period of little or no flavivirus transmission.

[b] Interval in days between acute (S1) and convalescent (S2) specimens.

[c] Against any dengue antigen.