การตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชั่นโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (อาร์ทีพีซีอาร์)

นาย โอภาส พุทธเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF DENGUE VIRUS IN BONE MARROW BY REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT – PCR)

Mr. Opass Putcharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

490662

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธีเวอร์สทรานสคริปชั่นโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (อาร์ทีพีซีอาร์)
โดย	นาย โอภาส พุทธเจริญ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธานินทร์ อินทรกำธรชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์

..... กรรมการ

(อาจารย์ วีนัส อุดมประเสริฐกุล)

โอภาส พุทธเจริญ : การตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกโดยวิธีรีเวอร์สทรานสคริปชั่นโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (อาร์ทีพีซีอาร์) (DETECTION OF DENGUE VIRUS IN BONE MARROW BY REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. นพ. วันล่า กุลวิชิต, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. นพ. พลภัทร โรจน์นครินทร์. 62 หน้า.

ที่มา เนื่องจากโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทย จากการตรวจสำรวจทางน้ำเหลืองวิทยาพบว่าประชากรผู้ใหญ่ไทยเกือบทั้งหมดเคยผ่านการติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อนแล้ว โดยที่ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อที่ไม่มีอาการ การติดเชื้อส่วนใหญ่ในผู้ใหญ่มักจะเป็นการติดเชื้อแบบทุติยภูมิและยังไม่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าไวรัสเดงกีสามารถที่จะคงอยู่ภายหลังจากที่มีการติดเชื้อครั้งก่อน แต่มีการศึกษาไวรัสชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ไวรัสตับอักเสบซี และไวรัสจีบีวี สามารถที่จะคงอยู่และมีการแบ่งตัวในผู้ที่เคยติดเชื้อนี้มาก่อนได้ เนื่องจากไวรัสเดงกีเป็นไวรัสที่มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อในเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มโมโนซัยท์และลิมพ์โฟซัยท์ คณะผู้ทำการศึกษาจึงสนใจที่จะตรวจหาไวรัสเดงกีในไขกระดูกของผู้น่าจะเคยมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีตมาก่อน

วิธีการศึกษา ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาไวรัสเดงกีโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ในผู้ป่วยที่มารับการเจาะไขกระดูกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยที่มีการถามประวัติเพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบมีอาการในอดีต และใช้การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (HAI และ ELISA) เพื่อเป็นหลักฐานยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีต นอกจากนี้ได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วยแต่ละราย

ผลการศึกษา จากจำนวนผู้ป่วยที่เข้าในการศึกษา 74 ราย สามารถตรวจพบ ไวรัสเดงกีในผู้ป่วย 3 ราย โดยที่ทั้งผู้ป่วยทั้ง 3 รายมีผลการตรวจ HAI และ ELISA เข้าได้กับการติดเชื้อไวรัสเดงกีในอดีต และทั้งสามรายมีผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของไขกระดูกที่แสดงว่าอยู่ในช่วงที่โรคเลือดสงบ

สรุปผลการศึกษา สามารถที่จะตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูกของผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสนี้มาก่อนในอดีต ซึ่งการที่มีไวรัสเดงกีอยู่ในร่างกายหลังจากการติดเชื้อครั้งก่อนอาจจะมีผลต่อการเกิดโรคติดเชื้อเดงกีภายหลัง เนื่องจากที่ไวรัสที่อยู่ในไขกระดูกอาจจะมีการแบ่งตัว หรือเนื่องทำให้มีผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อซ้ำโดยไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่นๆ ต่อมา แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้รายละเอียดเกี่ยวกับผลของไวรัสที่อยู่ในร่างกายต่อไป

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2549	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

487 48203 30 : MAJOR MEDICINE (INFECTIOUS DISEASES)
KEYWORD: DENGUE VIRUS / BONE MARROW / PCR

OPASS PUTCHAROEN : DETECTION OF DENGUE VIRUS IN BONE MARROW BY REVERSE TRASCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PONLAPAT ROJNUCKARIN, M.D., Ph.D. 62 pp.

Backbround Our country is considered endemic area for dengue virus infection. Serosurveillance indicates that almost native all adults have been infected, mostly asymptomatically. A long-held mechanism for clinical severity involves sequential infections by different serotypes. Even though some of its peer flaviviruses are known to reside persistently within the host and contribute to host illnesses, dengue virus has not been shown to behave in a similar fashion. As dengue is a haematotropic virus, we sought to find evidence of its persistence in the bone marrow of previously-infected persons.

Methods We studied patients clinically suspected of haematologic malignancies and indicated to have diagnostic bone marrow studies. A fraction of cellular marrow was employed for RNA extraction for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) by dengue-specific primers. Serologic assessment by haemagglutination inhibition test (HI) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to minimise a chance of including patients with recent dengue infection. Demographic data of all patients were analysed, especially for the history of prior recent febrile illness and diagnosis of dengue infection.

Results Of 74 enrolled patients, dengue genome was detected in cellular marrow of 3 cases. These patients had had no history of febrile illness prior to the bone marrow study and HI and ELISA results of single or paired sera of from these patients were, similar to those of the rest, compatible with either remote or remote/no infection by flaviviviruses. Indication for bone marrow examination in these patients were for follow-up and pathological results also confirmed they were in the stage of remission.

Conclusions Dengue virus genome could be detected in bone marrow of asymptomatic haematologic patients by using RT-PCR. Sequential infections by different serotypes seem to be a key in severe dengue pathogenesis. The persistent first-serotype virus, defective or complete, could possibly confer a biological influence when co-infected with a second serotype later on in their life. As our understanding of dengue pathogenesis is far from perfect, this finding obviously opens up a door to a new arena of dengue research.

Department.....Medicine..... Student's signature.....
Field of study.....Medicine..... Advisor's signature.....
Academic year.....2006..... Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ รองศาสตราจารย์นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต อาจารย์ที่ปรึกษา ที่เสนอและสนับสนุนประเด็นที่จะทำการศึกษาในครั้งนี้ นางสาวสุนิสา กระจิว นิสิตปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นผู้ช่วยดำเนินการเก็บข้อมูลของกระบวนการทำการตรวจทางชีวโมเลกุล นางสาว เกศินี อรุณยิ่งมงคล พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ช่วยทำหารตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาของผู้ป่วยทุกราย และผู้ป่วยทุกท่านที่ร่วมในการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่
1 บทนำ.....1
2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3
3 รายระเอียดกระบวนการทำ RT-PCR และการตรวจทาง serology โดยวิธี HAT และ ELISA.....26
4 วิธีการดำเนินการวิจัย.....28
5 ผลการวิจัย.....32
6 อภิปรายผลการวิจัย.....41
รายการอ้างอิง.....44
ภาคผนวก.....49
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....62

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การกระจายของเชื้อไวรัสเดงกีในภูมิภาคต่างๆแยกตาม serotype.....27
ตารางที่ 2.2 แสดงการพบไวรัสเดงกีในอวัยวะต่างๆของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก.....28
ตารางที่ 2.3 การแปลผล Hemagglutination-inhibition test ของเชื้อไวรัสเดงกี.....29
ตารางที่ 5.1 ลักษณะของผู้ป่วยที่เข้าในการศึกษา.....44
ตารางที่ 5.2 ลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเดงกีในไขกระดูก.....45
ตารางที่ 5.3 ผลการตรวจ HAI และ ELISA.....46

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1: ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศต่าง ๆ.....21
รูปที่ 2.2: อัตราการป่วยจากโรคไข้เลือดออกปี 2503-2545.....22
รูปที่2.3: แสดงโปรตีนของไวรัสเดงกี.....23
รูปที่2.4: ระดับความรุนแรงของไข้เลือดออกเดงกี.....24
รูปที่2.5 : รูปแบบของอาการ/อาการแสดงของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี.....25
รูปที่2.6: ตอบสนองของภูมิคุ้มกันใน primary และ secondary dengue infection.....26
รูปที่5.1-5.4: ภาพแสดงผลการตรวจ RT-PCR จากในไขกระดูก.....47