2 8 มี.ค. 2534

การเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ที่จังหวัดลำพูนในรอบ 1 ปี

DENGUE VIRUS SURVEILLANCE AT LAMPHUN PROVINCE IN ONE YEAR

อภินันทนาการ

จาก

มหาวิทยาลัย พ.มหิดล

กนิษฐา จำรูญสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิทยาการระบาด
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2533

Copyright by Mahidol University

19779

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ที่จังหวัดลำพูน ในรอบ 1 ปี

.....

กนิษฐา จำรูญสวัสดิ์

ผู้วิจัย

.....

สมชาย สุพันธุ์วณิช, พ.บ., ส.ม., M.P.H. & T.M.

ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

ธวัช จายนียโยธิน, พ.บ., ส.ม., D.P.H.,

D.T.M. & H.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

สุธี ยกส้าน, พ.บ., ปร.ด.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

สุมาลี สิงหนิยม, วท.บ., วท.ม.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

มันตรี จุลสมัย, พ.บ., Ph.D.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย

.....

ไพโรจน์ อุ่นสมบัติ, พ.บ., M.P.H

ประธานโครงการบัณฑิตศึกษา

สาขาวิทยาการระบาด

คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ที่จังหวัดลำพูน ในรอบ 1 ปี

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการระบาด

วันที่ 3 พฤษภาคม 2533

.....

กนิษฐา จำรูญสวัสดิ์

ผู้วิจัย

.....

สมชาย สุพันธุ์วณิช, พ.บ., ส.ม., M.P.H. & T.M.

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

ธวัช จายนียโยธิน, พ.บ., ส.ม., D.P.H., D.T.M. & H.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

สุชี ยกส้าน, พ.บ., ปร.ด.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

สุมาลี สิงหนิยม, วท.บ., วท.ม.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

สารรัตน์ ยงใจยุทธ, พ.บ., Ph.D.

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

มันตรี จุลสมัย, พ.บ., Ph.D.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

.....

ประดิษฐ์ เจริญไทยทวี, พ.บ., F.F.A.R.C.S. (Eng.), D.A. (Eng.), Hon. F.R.C.S. (Thailand)

คณบดี

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahidol University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวกนิษฐา จำรูญสวัสดิ์
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, พ.ศ. 2525-2528 : วิทยาศาสตรบัณฑิต (พยาบาลศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล, พ.ศ. 2531-2533 : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาการระบาด)
ทุนการศึกษา	1. ทุนการศึกษา สำหรับนักศึกษาผู้มีความสามารถทางวิชาการดีเด่น ประจำปีการศึกษา 2532-2533 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล 2. ทุนการศึกษา สำหรับนักศึกษาผู้มีความสามารถทางวิชาการดีเด่น และมีหน่วยงานของทางราชการยินดีรับเข้าปฏิบัติงานภายหลังที่จบการศึกษาแล้ว จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
ทุนวิจัย	เงินทุนอุดหนุน เพื่อการทำวิจัย จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahidol University

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลงได้เนื่องจากได้รับความกรุณาจากท่านอาจารย์ที่ปรึกษาทุก ๆ ท่าน ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในการเขียนวิทยานิพนธ์

ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์สมชาย สุพันธุ์วณิช ประธานกรรมการควบคุมการทำวิทยานิพนธ์ นายแพทย์ธวัช จายนียโยธิน นายแพทย์สุธี ยกส้าน และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุมาลี สิงหนิยม ซึ่งเป็นคณะกรรมการควบคุมการทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์วิชัย รุ่งปิตะรังสี รองศาสตราจารย์นายแพทย์สารรัตน์ ยงใจยุทธ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ นายแพทย์สมทรง รักษ์เผ่า นายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดลำพูน ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อมูลและความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ผู้อำนวยการ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการเก็บข้อมูลทางคลินิก เก็บตัวอย่างเลือด และที่พักแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณ คุณอรพินท์ ใจสุนทร และคุณบุญลอย ใจกลาง ที่กรุณาช่วยเหลือติดต่อ ประสานงานกับทางโรงพยาบาลต่าง ๆ ให้ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสุนทรี โรจนสุพจน์ นายแพทย์คำนวณ อึ้งชูศักดิ์ นายแพทย์ศุภมิตร ชุณห์สุทธิวัฒน์ นายแพทย์ครรชิต ลิมปกาญจนวัฒน์ และคุณอมรา ทองหงษ์ ที่กรุณาให้ข้อมูลและเอกสารประกอบการวิจัย พร้อมกันนี้ขอขอบพระคุณ คุณชัชวาลย์ กลัดนาคะ ที่กรุณาช่วยถ่ายภาพติดประกอบวิทยานิพนธ์เล่มนี้ และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ทุกท่านของโครงการศูนย์พัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดล ณ ศาลายา ที่ช่วยแนะนำในด้าน LAB ให้ อนึ่งการวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนบางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นางสาวกนิษฐา จำรูญสวัสดิ์

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ที่จังหวัดลำพูน ในรอบ 1 ปี
ผู้วิจัย	กนิษฐา จำรูญสวัสดิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาการระบาด)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	สมชาย สุพันธุ์วณิช, พ.บ., ส.ม., M.P.H. & T.M. ธวัช จายนียโยธิน, พ.บ., ส.ม., D.P.H., D.T.M & H. สุธี ยกส้าน, พ.บ., ปร.ด. สุมาลี สิงหนิยม, วท.บ., วท.ม. (ชีวสถิติ)
วันที่สำเร็จการศึกษา	3 พฤษภาคม พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ หาทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูน เปรียบเทียบกับส่วนอื่นของประเทศ และหาความสัมพันธ์ระหว่าง อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรคกับทัยป์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับอัตราป่วยที่พบ รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาแต่ละเดือนกับจำนวนผู้ป่วยในแต่ละอำเภอ โดยการเจาะเลือดตรวจในกลุ่มผู้ป่วยนอก และผู้ป่วยในของโรงพยาบาลชุมชนทุกอำเภอในจังหวัดลำพูน ที่แพทย์วินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก ซึ่งพบว่ามีผู้ป่วยในช่วงระยะเวลาตั้งแต่เดือนพฤษภาคม - เดือนกันยายน 2532 โดยใช้วิธี Haemagglutination Inhibition (HI) Test หาระดับแอนติบอดีย์ในซีรั่ม ใช้วิธีการแยกทัยป์ไวรัสในเซลเพาะเลี้ยง และการพิสูจน์ทัยป์ของไวรัสโดยวิธี Indirect Fluorescent Antibody Staining Technique

ผลการศึกษาพบว่า มีเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1 ในเขตอำเภอเมืองลำพูน และทัยป์ 2 ในเขตอำเภอบ้านโฮ่ง ส่วนในอำเภออื่น ๆ ไม่สามารถแยกทัยป์ไวรัสได้ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างอายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรค กับทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-value > 0.05) พบว่ามีค่าอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร สูงที่สุดในเดือนกรกฎาคม โดยมีค่าเป็น 4.1 ต่อ 100,000 ประชากร และพบว่า มีความแตกต่างกันของอัตราป่วยรายเดือนที่พบในแต่ละอำเภอ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Dengue Virus Surveillance at Lamphun Province in One Year
Name	Kanittha Chamroonsawasdi
Degree	Master of Science (Epidemiology)
Thesis Supervisory Committee	Somchai Supunvanich, M.D.,M.P.H. & T.M. Thavaj Chayaniyayodhin,M.D.,D.P.H., D.T.M & H. Sutee Yoksan, M.D., Ph.D. Sumalee Singhaniyom, B.Sc.,M.Sc.(Biostat)
Date of Graduation	3 May B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

The objectives of this study were to find the type distribution of Dengue Virus at each Amphur in Lamphun Province and compared with other places in Thailand. The association of age, sex and grading of severity, and type of the virus, the association between time and morbidity rate including the association between number of patients in each Amphur and each month. It was Descriptive Study, by using a seroepidemiological survey in out and admitted patients from every community hospital of Lamphun Province who were diagnosed as haemorrhagic fever cases and found on May to September, 1989. The Techniques used in this study were Haemagglutination Inhibition (HI) Test to determine serological antibody, virus isolation in tissue culture and virus identification by using Indirect Fluorescent Antibody Staining Technique.

Copyright by Mahidol University

The results showed that in Amphur Maung Lamphun Dengue Virus was type 1 and in Amphur Banhong Dengue Virus was type 2 and others Amphur could not find any types of virus. No association between age sex, grading of severity and isolated types of the virus. (p-value > 0.05) and the highest morbidity rate per 100,000 of population in Lamphun Province was 4.1 in July. The incidence rates by month in each Amphur were difference.

Copyright by Mahidol University

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ฌ
บทที่		
1	บทนำ	1
2	วรรณคดีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
3	ระเบียบวิธีในการวิจัย	44
4	ผลการวิจัย	53
5	อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลและข้อเสนอแนะ	93
บรรณานุกรม		102
ภาคผนวก		
	ภาคผนวก ก	112
	ภาคผนวก ข	115
	ภาคผนวก ค	139
	ภาคผนวก ง	151

Copyright by Mahidol University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราป่วย อัตราตาย (ต่อ 100,000 ประชากร) และอัตราป่วยตาย (ร้อยละ) ด้วยโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2501-พ.ศ. 2531	3
2	อัตราป่วย อัตราตาย (ต่อ 100,000 ประชากร) และอัตราป่วยตาย (ร้อยละ) ด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510-พ.ศ. 2531	6
3	อัตราป่วย (ต่อ 100,000 ประชากร) โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ในป่วยปี พ.ศ. 2527-พ.ศ.2531 จำแนกตามอำเภอ	7
4	โปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่พบในเชื้อไวรัสเด็งกี่	23
5	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ส่งซีรั่มตรวจโดยวิธี HI Test จำแนกตามผลการวินิจฉัยของแพทย์ว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก และไม่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก	54
6	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ส่งซีรั่มตรวจ จำแนกประเภทตามผล HI Test	55
7	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกตามผล HI Test ที่จำแนกตามลำดับที่ของการติดเชื้อ	56
8	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกตามผล HI Test ที่จำแนกตามผลการตรวจและวินิจฉัยของแพทย์	57
9	จำนวนและร้อยละของผู้ไม่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกตามผล HI Test ที่จำแนกตามผลการตรวจและวินิจฉัยของแพทย์	58
10	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ไม่สามารถสรุปผลการป่วยจากการตรวจเลือดโดยวิธี HI Test ได้ จำแนกตามผลการตรวจและวินิจฉัยของแพทย์	59

Copyright by Mahidol University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจและวินิจฉัยจากแพทย์ว่าป่วยและไม่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก จำแนกตามผล HI Test	60
12	จำนวนและร้อยละของซีรั่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ที่ตรวจพบว่ามีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่จริง โดยการทำ Plaque Assay	63
13	ปริมาณของเชื้อไวรัส (PFU/ML) ที่ได้จากการทำ Plaque Assay	64
14	ทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้จากซีรั่มที่ตรวจพบว่ามีประมาณของของเชื้อไวรัสอยู่	64
15	การแพร่กระจายทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่พิสูจน์ได้จากซีรั่มของผู้ป่วยไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ในรอบ 1 ปี (พ.ศ. 2532)	65
16	จำนวน ร้อยละ และอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามอายุ	66
17	จำนวน ร้อยละ และอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามเพศ	67
18	จำนวน ร้อยละ และอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามกลุ่มอายุและเพศ	68
19	จำนวน ร้อยละ และอัตราป่วย ต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามอำเภอที่อยู่	70
20	จำนวน และร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลาที่มีไข้ก่อนมารับการรักษา ณ โรงพยาบาล	72
21	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลาที่ทำการเจาะเลือด ภายหลังจากวันเริ่มมีไข้ (viremia)	73
22	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลารวมทั้งหมดที่มีไข้	74
23	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลารวมทั้งหมดที่รับการรักษาตัวในโรงพยาบาล	75
24	ระยะเวลาระหว่างการเจาะเลือดครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2	76

Copyright by Mahidol University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
25	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอุณหภูมิของร่างกายขณะมารับการตรวจครั้งแรก	77
26	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการแสดงถึงการที่มีเลือดออกเองในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย	78
27	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามภาวะตับโตตามที่แพทย์ตรวจพบครั้งแรก	79
28	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการกดเจ็บตรงตำแหน่งของตับ	80
29	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย ที่มีอาการช็อกจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด	81
30	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามความดันโลหิตซิสโตลิคขณะแรกรับการรักษา	82
31	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามความดันโลหิตไดแอสโตลิคขณะแรกรับการรักษา	83
32	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามค่า pulse pressure ขณะแรกรับการรักษา	84
33	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอัตราการเต้นของชีพจรที่วัดได้ขณะแรกรับการรักษา	85
34	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการกระสับกระส่าย/หมดสติขณะแรกรับการรักษา	86
35	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการมือเท้าเย็น และ/หรือลำตัวเย็น	86
36	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามผลการตรวจนับภาวะเกล็ดเลือดในกระแสเลือด	87
37	จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก จำแนกตามระดับความรุนแรงของโรค ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2529	88

Copyright by Mahidol University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
39	อายุและเพศของผู้ป่วย กับ ทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	121
39	ความสัมพันธ์ระหว่าง อายุ กับ ทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	121
40	ความสัมพันธ์ระหว่าง เพศ กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	122
41	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของโรคกับทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	122
42	อุณหภูมิเฉลี่ยของช่องแช่แข็งตู้เย็นที่ใช้เก็บซีรั่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกก่อนนำมาทำการแยกทัยป์เชื้อไวรัสเด็งกี่	129
43	การแปลผลระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ตรวจโดยวิธี HI test	124
44	ส่วนผสมของ overlayer medium	132

Copyright by Mahidol University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อัตราป่วยโรคไข้เลือดออกต่อ 100,000 ประชากร และอัตราป่วยตายต่อผู้ป่วย 100 คน ประเทศไทย พ.ศ. 2501-2531	4
2	อาการของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ : องค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2529	33
3	รายละเอียดของจังหวัดลำพูนและอาณาเขตติดต่อ	45
4	การตอบสนองของอิมมูน ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่แบบปฐมภูมิ และทุติยภูมิ	49
5	ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนต่าง ๆ ของการเก็บรวบรวมข้อมูล	51
6	อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532 จำแนกตามอายุ	66
7	อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532 จำแนกตามเพศ	67
8	อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532 จำแนกตามอายุและเพศ	69
9	อัตราอุบัติการณ์ (Incidence Rate) ต่อ 100,000 ประชากร ด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน พ.ศ. 2532 ที่ยืนยันผลการป่วยด้วยการตรวจเลือดโดยวิธี HI Test จำแนกตามอำเภอที่อยู่	71
10	อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามระยะเวลาเป็นเดือน ตั้งแต่ มกราคม-ธันวาคม 2532	91
11	อัตราป่วยโรคไข้เลือดออกต่อ 100,000 ประชากร ที่พบในแต่ละอำเภอ ของจังหวัดลำพูน จำแนกตามระยะเวลาเป็นเดือน	92
12	การแปลผล HI test ของเชื้อไวรัสเด็งกี่	123
13	เซล LLC-MK2 ที่เลี้ยงบน Cover slip ใน Leighton tube	127
14	เซล C6/36 ที่เลี้ยงบน Cover slip ใน Leighton tube	128
15	การเกิด CPE ของเซล LLC-MK_2 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่	130
16	ลักษณะการเกิด Plaque บน Agar	134
17	เซลที่ติดเชื้อไวรัส มีการเรืองแสงสีเขียวอ่อนในส่วนของซัยโตปลาสซึม	136

Copyright by Mahidol University

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้เลือดออก (Haemorrhagic Fever) เป็นโรคติดต่อจากเชื้อไวรัส (1,2,3,4) ส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมีเพียง 2 ชนิดคือ เชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งพบได้บ่อยและก่อให้เกิดอาการรุนแรง รวมทั้งอัตราป่วยตายค่อนข้างสูง และเชื้อไวรัสชิกุนกุนยา ซึ่งพบไม่ค่อยบ่อยนัก และเกิดอาการไม่รุนแรง (5-10)

โรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ (Dengue Haemorrhagic Fever or DHF.) เป็นโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากมียุงเป็นสื่อนำโรค (3,5,6,9,10) ทำให้เกิดอาการได้ในหลาย ๆ ระบบ และมีความรุนแรงแตกต่างกัน ได้แก่ อาการมีไข้ปานกลางจนถึงไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดตามกล้ามเนื้อ ปวดข้อ มีผื่น จุดเลือดขึ้นตามบริเวณผิวหนัง ต่อมน้ำเหลืองโต ตับโต ตลอดจนมีเลือดออกในระบบทางเดินอาหาร ฯลฯ จนถึงขั้นรุนแรงคือมีการช็อก และเสียชีวิตได้ (1,3,4,5,6,7,9,10,11) จึงนับว่าเป็นโรคที่ยังเป็นปัญหาแก่ประเทศไทย

โรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ เป็นโรคที่มีมานานแล้ว และพบว่าได้มีการระบาดใหญ่มาแล้วในหลายประเทศ โดยเริ่มมีการระบาดครั้งแรกที่เมืองฟิลาเดลเฟีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2323 (4,7,9,10) แล้วระบาดไปยังทวีปยุโรป ทวีปออสเตรเลีย ทวีปเอเชีย แล้วมายังประเทศไทย (4,7,9,10,12)

ระบาดวิทยาของโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ในประเทศไทย

โรคไข้เลือดออกจากไวรัสเด็งกี่ เริ่มพบครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2492 (1,11,12) โดยมีจำนวนผู้ป่วยประปรายพบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2494-2500 มีผู้ป่วยประมาณ 1,500 ราย และมีอัตราผู้ป่วยตายเฉลี่ยสูงถึงร้อยละ 17 (13)

Copyright by Mahidol University

ต่อมาได้มีการระบาดครั้งใหญ่ครั้งแรกขึ้นในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2501 ในเขตกรุงเทพ-ธนบุรี และจังหวัดใกล้เคียง ได้แก่ นนทบุรี และสมุทรปราการ พบผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร 2,701 ราย ตาย 296 ราย (14) โดยมีอัตราป่วยตายในช่วงต้น ๆ ของการระบาดสูงถึงร้อยละ 50

ปี พ.ศ. 2503 พบโรคนี้ประปรายที่จังหวัดเชียงใหม่ (1) และในปี พ.ศ. 2505 มีการแพร่กระจายของโรคไปยังจังหวัดนครสวรรค์ นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี (14) จนมีการระบาดทั่วไปทั้งในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อ ปี พ.ศ. 2507 โดยการระบาดในระยะเริ่มแรก มีลักษณะแน่นอนคือเป็นแบบปี เว้นปี และจากเมืองใหญ่แพร่ไปสู่เมืองเล็ก หรือชนบท ปี พ.ศ. 2510 มีการระบาดไปเกือบทั่วประเทศจนทำให้มีการตราพระราชบัญญัติ ให้โรคนี้เป็นโรคติดต่อที่ต้องแจ้งความตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2510 (13,14)

ปี พ.ศ. 2515 มีการระบาดใหญ่ทั่วประเทศอีกครั้งหนึ่ง โดยมีผู้ป่วยถึง 23,782 ราย ตาย 685 ราย (13) หลังจากนั้นเป็นต้นมา ก็มีการระบาดของโรคเกิดขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงปัจจุบัน

จากรายงานอัตราป่วย อัตราตาย และอัตราป่วยตาย ด้วยโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2501 จนถึง ปี พ.ศ. 2531 มีดังแสดงในตารางที่ 1

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 1 อัตราป่วย อัตราตาย (ต่อ 100,000 ประชากร) และอัตราป่วยตาย (ร้อยละ) ด้วยโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2501 ถึงปี พ.ศ. 2531

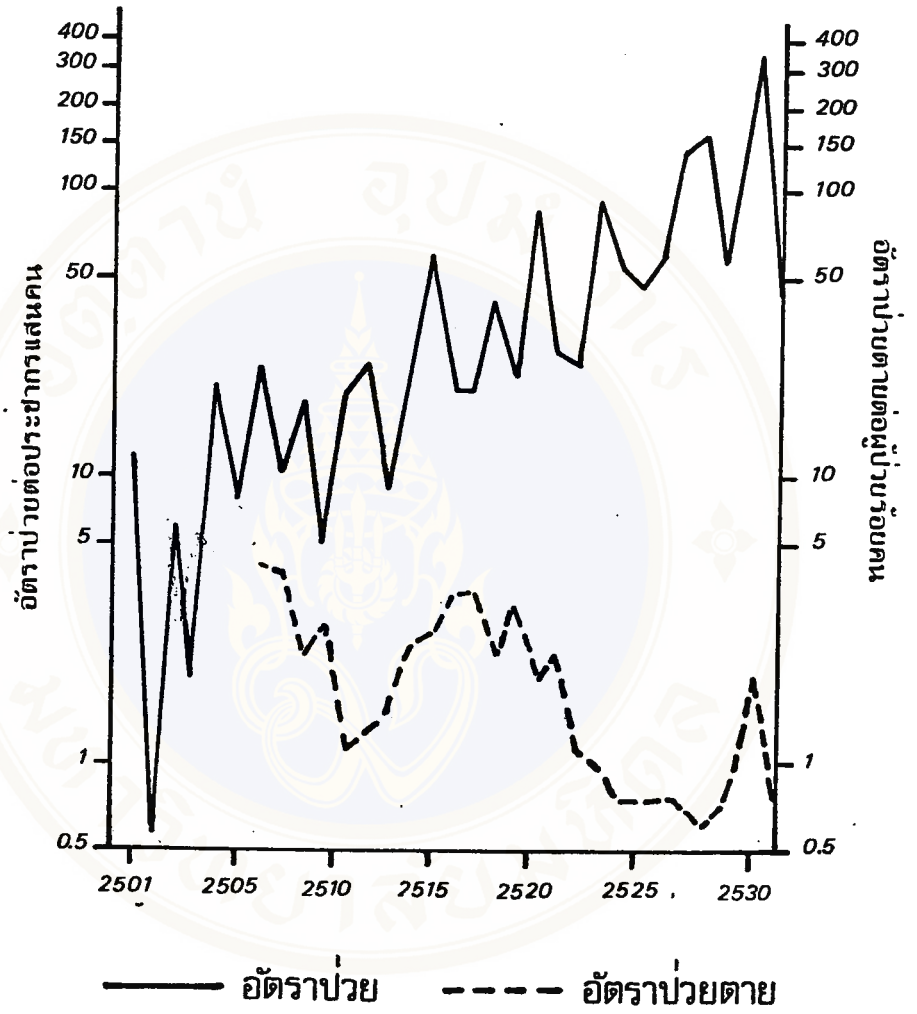
พ.ศ.	อัตราป่วย	อัตราตาย	อัตราป่วยตาย	พ.ศ.	อัตราป่วย	อัตราตาย	อัตราป่วยตาย
2501	11.50	10.94	95.13	2516	20.92	3.80	18.16
2502*	0.66	-	-	2517	20.05	4.02	20.04
2503	7.01	3.51	50.07	2518	42.43	2.47	5.82
2504*	2.07	-	-	2519	22.43	3.75	16.71
2505	21.36	5.18	34.25	2520	88.28	1.95	2.20
2506*	7.75	-	-	2521	27.90	0.68	2.43
2507	26.08	5.02	19.25	2522	24.92	0.28	1.12
2508	13.56	4.71	34.73	2523	91.96	0.85	0.92
2509	18.75	2.36	12.59	2524	54.05	0.42	0.77
2510	6.46	3.16	48.91	2525	45.89	0.33	0.71
2511	19.62	1.10	5.60	2526	60.71	0.46	0.76
2512	25.73	1.26	4.90	2527	137.12	0.98	0.71
2513	7.61	1.70	22.33	2528	154.94	1.05	0.67
2514	30.85	2.59	8.40	2529	52.88	0.44	0.83
2515	61.81	2.88	4.65	2530	325.13	1.88	0.58
				2531	45.0	0.27	0.60

ที่มา: ฝ่ายประเมินผล กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข

หมายเหตุ *การเก็บข้อมูลอัตราตายและอัตราป่วยตายไม่ครบถ้วน

Copyright by Mahidol University

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2503 เป็นต้นมา อัตราป่วยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 อัตราป่วยโรคไข้เลือดออกต่อประชากร 100,000 คน (พ.ศ. 2501-2531) และอัตราป่วยตายต่อผู้ป่วย 100 คน (พ.ศ. 2507-2531) ประเทศไทย

Copyright by Mahidol University

รายงานการเฝ้าระวังโรคดังกล่าวพอจะสรุปได้ว่าในช่วง 10 ปีแรก โรค DHF มีรูปแบบของการระบาดเป็นแบบปีเว้นปี ส่วนในรอบ 10 ปีที่สองและสาม (พ.ศ. 2511-2530) จนถึงปัจจุบันรูปแบบของการระบาดเป็นแบบไม่แน่นอนคือ มีการระบาดเกิดขึ้นเป็นปีเว้นปีหรือเว้นสองปี ยกเว้นในปี พ.ศ. 2528 มีอัตราการป่วยสูงสุดคือ 154.9 รายต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2529 อัตราป่วยลดลงเหลือ 52.8 รายต่อแสนประชากร ซึ่งใน 10 ปีหลังนี้มีอัตราการป่วยเฉลี่ยเท่ากับ 54 ต่อแสนประชากร และคาดการณ์ว่าในกรณีที่แนวโน้ม ยังคงเป็นเช่นเดิมในอีก 10 ปีข้างหน้า (พ.ศ. 2531-2540) อัตราป่วยของโรคนี้จะมีประมาณ 124 ต่อแสน ประชากร นอกจากนี้ยังได้มีการคาดการณ์ไว้อีกว่าจะไม่มีการระบาดรุนแรงใน ปี พ.ศ. 2531 โดยใช้ข้อสังเกตเกี่ยวกับการลดลงตามปกติของจำนวนผู้ป่วยในสามเดือนสุดท้ายของ ปี พ.ศ. 2530 ร่วมกับลักษณะของการเกิดโรคพอจะชี้ได้ว่าการระบาดจะไม่เกิดขึ้นใน ปี พ.ศ. 2532 แต่อัตราป่วยจะสูงกว่าในปี พ.ศ. 2531 และอาจอยู่ในระดับกลาง ๆ คือ ราว 60-100 ต่อแสนประชากร (16)

สำหรับในปี พ.ศ. 2531 สถานการณ์ของโรคไข้เลือดออกทั่วประเทศ จำแนกผู้ป่วยด้วยโรค DHF 23,494 ราย เด็งกี่ชีอกซินโดรม (Dengue Shock Syndrome : DSS) 497 ราย เด็งกี่ฟีเวอร์ (Degue Fever : DF) 597 ราย อัตราป่วยรวมคิดเป็น 45 ต่อแสนประชากร ตาย 137 ราย คิดเป็นอัตราผู้ป่วยตายร้อยละ 0.6 ซึ่งมีอัตราน้อยกว่าใน ปี พ.ศ. 2530 โดยในปี พ.ศ. 2530 จากสรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคของกองระบาดวิทยา พบว่าเป็นปีที่มีผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกสูงสุดเท่าที่เคยมีมา คือมีจำนวนถึง 174,285 ราย จำนวนผู้ตาย 1,007 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 325.1 ต่อแสนประชากร อัตราตาย 1.88 ต่อแสนประชากร มากกว่าปี พ.ศ. 2531 ถึง 1.67 ต่อแสนประชากร ส่วนภาคกลาง ภาคใต้ และภาคเหนือ มีอัตราป่วย 40, 29 และ 17 ต่อแสนประชากร ตามลำดับ

อุบัติการณ์ของโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ ของจังหวัดลำพูน

จังหวัดลำพูนพบมีรายงานการป่วย และตายด้วยโรคไข้เลือดออกเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2510 แต่ในปีถัดมาไม่มีรายงานผู้ป่วยหรือตายเลย หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2512 จนถึงปัจจุบันมีรายงานการป่วยและตายตลอด (13,17) ดังแสดงในตารางที่ 2

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 2 อัตราป่วย อัตราตาย (ต่อ 100,000 ประชากร) และอัตราป่วยตาย (ร้อยละ) ด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 ถึงปี พ.ศ. 2531

พ.ศ.	อัตราป่วย	อัตราตาย	อัตราป่วยตาย	พ.ศ.	อัตราป่วย	อัตราตาย	อัตราป่วยตาย
2510	1.36	1.34	98.52	2521	10.50	0.58	5.52
2511	0	0	0	2522	19.68	0	0
2512	8.67	0	0	2523	75.80	0	0
2513	0.33	0	0	2524	182.39	0.28	0.15
2514	2.27	0.32	14.10	2525	140.40	0	0
2515	9.28	0	0	2526	149.23	0	0
2516	25.13	1.80	7.16	2527	65.46	0	0
2517	3.56	0	0	2528	163.46	0	0
2518	2.07	0	0	2529	9.23	0	0
2519	49.75	1.18	2.37	2530	143.03	1.74	1.22
2520	20.52	0	0	2531	1.71	0	0

ที่มา: ฝ่ายประเมินผล กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข

สถิติดังกล่าวพบว่า การระบาดของโรคไข้เลือดออกในจังหวัดลำพูน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 ถึงปี พ.ศ. 2531 เป็นแบบปีเว้นปี ซึ่งในปี พ.ศ. 2530 มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 577 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 143.03 ต่อแสนประชากร สูงกว่าเป้าหมายของกรมควบคุมโรคติดต่อ ที่จะให้อัตราป่วยของโรคไข้เลือดออกคงเหลือไม่เกิน 85 ต่อแสนประชากร ถึงเกือบ 2 เท่า ในปี พ.ศ. 2531 จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกลดลงเหลือเพียง 7 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 1.96 ต่อแสนประชากร (ประชากรกลางปี พ.ศ. 2531 ของจังหวัดลำพูนมี 409,357 คน) แม้ว่าอัตราป่วยจะลดลงในปี พ.ศ. 2531 ก็ตาม แต่จากแนวโน้มของการระบาดในจังหวัดลำพูนเป็นแบบปีเว้นปี ดังนั้นอัตราป่วยในปี พ.ศ. 2532 คงจะมากกว่าในปี พ.ศ. 2531

Copyright by Mahidol University

ในการวางแผนปฏิบัติงานเพื่อควบคุมโรคไข้เลือดออกและโรคไข้สมองอักเสบของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดลำพูน ประจำปี พ.ศ. 2532 นั้น ทางจังหวัดได้นำเสนอข้อมูลสถิติผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก ย้อนหลัง 5 ปี คือ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 - ปี พ.ศ. 2531 แยกตามอำเภอ (18) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อัตราป่วย (ต่อ 100,000 ประชากร) โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ในช่วงปี พ.ศ. 2527 ถึง ปี พ.ศ. 2531 จำแนกตามอำเภอ

พ.ศ.	อัตราป่วย ต่อ 100,000 ประชากร					
	อำเภอเมือง	อำเภอป่าซาง	อำเภอแม่ทา	อำเภอบ้านโฮ่ง	อำเภอลี้	กิ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง
2527	7.24*	147.42	43.70	116.88	16.06	12.70
2528	63.53*	204.20	141.20	548.42	110.90	24.88
2529	2.07	2.37	0	63.89	5.22	0
2530	158.20	112.41	301.67	123.02	87.88	103.01
2531	3.72	1.17	0	0	0	0

ที่มา : แผนปฏิบัติงานควบคุมโรคไข้เลือดออก/ไข้สมองอักเสบ จังหวัดลำพูน ปี 2532
หมายเหตุ *ตกสำรวจจำนวนผู้ป่วยในเขตเทศบาล ไม่มีการรวบรวมข้อมูลไว้

ถึงอย่างไรก็ตามจากรายงานการเกิดโรคไข้เลือดออกที่ กองระบาดวิทยา ได้รับจากเครือข่ายเฝ้าระวังโรค ทั้ง 73 จังหวัด นั้น พบว่า สถานการณ์ตั้งแต่ต้นเดือนมกราคม ถึงปลายเดือนมีนาคม 2532 นี้ ยังไม่มีรายงานการป่วยหรือตายด้วยโรคไข้เลือดออก ในจังหวัดลำพูนเลย (16)

Copyright by Mahidol University

ลักษณะทางระบาดวิทยาของโรค DHF ในประเทศไทย (15,16,19)

1. เวลา จะพบผู้ป่วยโรค DHF ได้ตลอดปี แต่พบมากในฤดูฝน จำนวนผู้ป่วยจะเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างมากในเดือนพฤษภาคม และสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระดับสูงสุดในเดือนกรกฎาคม หรือสิงหาคม แล้วเริ่มลดลงสู่ระดับก่อนมีการระบาดในเดือนธันวาคม

2. สถานที่ โรค DHF พบได้ทั่วไปทุกภูมิภาคของประเทศไทย ข้อมูลจากปี พ.ศ. 2518 ถึงปี พ.ศ. 2530 ภาคกลางมีอัตราป่วยสูงสุด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมีอัตราป่วยใกล้เคียงกัน ภาคใต้มีอัตราป่วยต่ำสุด ค่าเฉลี่ยของอัตราป่วยต่อแสนประชากรตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518-2529 ในแต่ละภาคเรียงตามลำดับได้ดังนี้ คือ 65, 51, 50, 26 ลักษณะการเกิดโรคในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีลักษณะคล้ายกัน คือ เกิดการระบาดปีเว้นปีหรือสองปี ในขณะที่ภาคเหนือและภาคใต้ไม่มีลักษณะดังกล่าวชัดเจน

เมื่อพิจารณาการระบาดในแต่ละจังหวัดก็เช่นเดียวกัน บางจังหวัดมีการระบาดปีเว้นปีหรือสองปี ในขณะที่บางจังหวัดก็ไม่เป็นเช่นนั้น ปรากฏการณ์นี้ค่อนข้างจะสอดคล้องกับภาพรวมในระดับภาค

ส่วนรายงานในปี พ.ศ. 2531 นั้น พบว่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีอัตราป่วยสูงสุดถึง 66 ต่อแสนประชากร ส่วนภาคกลาง ภาคใต้ และภาคเหนือ มีอัตราป่วย 40, 29, และ 17 ต่อแสนประชากร ตามลำดับ

อัตราการเกิดโรคนี้ใน 73 จังหวัด ในปี พ.ศ. 2531 แตกต่างกันไปนับตั้งแต่ไม่มีผู้ป่วยเลยจนถึง 173 รายต่อแสนประชากร และพบว่ามีอยู่ 18 จังหวัดที่มีอัตราป่วยมากกว่า 60 ต่อแสนประชากร เทียบกับในปี พ.ศ. 2530 ซึ่งมีถึง 67 จังหวัด ที่มีอัตราป่วยสูงกว่า 100 ต่อแสนประชากร มีอยู่ 7 จังหวัด ได้แก่ มุกดาหาร ราชบุรี เลย ชัยภูมิ อุบลราชธานี นครปฐม และยโสธร ซึ่งในปี พ.ศ. 2530 จังหวัดเหล่านี้มีอัตราป่วยสูงมากกว่า 100 ต่อแสนประชากรเช่นกัน

สำหรับสถานที่เกิดโรคนั้น กองระบาดวิทยาได้จำแนกผู้ป่วยออกตามเขตเทศบาลและนอกเขตเทศบาล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521-2525 พบว่า อัตราป่วยนอกเขตเทศบาลมากกว่าในเขตเทศบาล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526 เป็นต้นมาพบผู้ป่วยในเขตเทศบาลสูงกว่านอกเขตเทศบาล 2-3 เท่า (20)

Copyright by Mahidol University

จากอดีตจนถึงปัจจุบัน แนวโน้มของโรคยังคงมีการแพร่กระจายออกจากเขตเทศบาลสู่หมู่บ้านตามชนบท ทั้งนี้เนื่องจากการคมนาคมสะดวกขึ้น ทำให้คนจากชนบทหรือในเมืองไปมาหาสู่กันมากขึ้น โรคจึงมักแพร่จากในเมืองใหญ่ ๆ ที่คนอยู่อาศัยกันหนาแน่นไปสู่บริเวณเมืองที่อยู่รอบ ๆ นอกจากนี้ การสร้างภาชนะไว้เก็บกักน้ำในชนบทเพิ่มมากขึ้นตามนโยบายมีน้ำสะอาดไว้ใช้ แหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายจึงเพิ่มขึ้นด้วย (21, 22)

3. บุคคล จากรายงานของกองระบาดวิทยา ปี พ.ศ. 2522-2530 พบว่า กลุ่มอายุที่มีอัตราป่วยสูงที่สุดคือ กลุ่มอายุ 5-9 ปี รองลงมาคือ 0-4 ปี 10-14 ปี 15-24 ปี และ 25 ปี ขึ้นไปตามลำดับ

ในปี พ.ศ. 2522-2526 กลุ่มอายุ 10-14 ปี มีอัตราป่วยรองจากกลุ่มอายุ 0-4 ปี และกลุ่มอายุ 5-9 ปี แต่หลังจากปี พ.ศ. 2526 เป็นต้นมา พบว่า กลุ่มอายุ 10-14 ปี มีอัตราป่วยสูงขึ้นกว่ากลุ่มอายุ 0-4 ปี ส่วนกลุ่มอายุ 5-9 ปี ยังคงมีอัตราป่วยสูงกว่ากลุ่มอายุอื่น อย่างไรก็ตามอัตราป่วยในเพศชายและเพศหญิง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521-2530 ก็มีอัตราใกล้เคียงกัน คือ มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:1

เนื่องจากโรคนี้มีระยะเวลาในการดำเนินของโรคเร็ว ส่วนมากผู้ป่วยมักถึงแก่กรรมบ่อยที่สุด ในวันที่ 4 ของโรค (10,23) แต่ถ้ามีการตรวจวินิจฉัยและให้การรักษาตั้งแต่เริ่มแรกอย่างถูกต้องแล้ว จะช่วยลดอัตราตายลงได้มาก (4,6,9) การเกิดโรคเกิดขึ้นเมื่อยุงลายตัวเมียมากัดและดูดเลือดคนในตอนกลางวัน เมื่อยุงไปกัดคนที่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่ในกระแสเลือดเข้า ยุงสามารถที่จะแพร่เชื้อไวรัสเด็งกี่นั้นได้ทันที ถ้ามีเชื้อไวรัสในกระแสเลือดคนไข้ที่ยุงไปกัดมามากพอ หรือต้องอาศัยระยะเวลาหนึ่ง ประมาณ 8-10 วัน (21) ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อไวรัสต้องมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในต่อมน้ำลายยุงเสียก่อนจนมีจำนวนมากพอที่จะถ่ายทอดไปสู่คนปกติและทำให้เกิดโรคได้

ยุงลายที่เป็นตัวนำโรคไข้เลือดออกที่สำคัญ คือ **Aedes aegypti** นอกจากนี้ก็อาจพบพวก **Aedes albopictus, Aedes polynesiensis** หรือบางสปีชีส์ของ **Aedes scutellaris** เป็นตัวแพร่เชื้อได้บ้าง (10,21,24)

Copyright by Mahidol University

นอกจากนี้ การระบาดและความรุนแรงของโรคที่สำคัญที่สุดยังขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากร และกลไกการตอบสนองทางด้านอิมมูนด้วย (21,25,26) พบว่าโรค DHF นี้ จะระบาดมากในบริเวณที่มีประชากร ซึ่งมีภูมิไวรับต่อเชื้อ (susceptible host) อาศัยอยู่มาก เช่น โรงเรียน โรงพยาบาล แล้วเชื้อแพร่กระจายไปยังที่ต่าง ๆ จากเมืองใหญ่ ไปสู่เมืองเล็ก หรือชนบทได้ โดยมียุงลายเป็นตัวนำโรค (1,2,4) กลไกการตอบสนองทางอิมมูนนั้น พบว่าโรค DHF จะระบาดมากในคน 2 กลุ่ม คือ (25,27,28,29)

1. กลุ่มเด็กที่เคยมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ใดทัยป์หนึ่งมาก่อนในจำนวนทั้งหมด 4 ทัยป์

2. กลุ่มเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี ที่ได้รับภูมิคุ้มกันโรค ทัยป์ใดทัยป์หนึ่งจากมารดา

การระบาดเกิดเมื่อมีการติดเชื้อ DHF ซ้ำ แต่เป็นคนละทัยป์ กับที่เคยได้รับและมีอิมมูนอยู่ ผลการติดเชื้อใหม่ดังกล่าวทำให้มีการทวีเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเชื้อไวรัสเด็งกี่ดังกล่าว ในเซล เม็ดเลือดขาวชนิด โมโนซัยต์ เรียกว่า Enhancement by heterotypic antibody (25) เซลโมโนซัยต์ ที่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่อยู่นั้น จึงกลายเป็นแหล่งเพาะแอนติเจนของร่างกายทำให้เกิดปฏิกริยาตอบสนองทางอิมมูนของร่างกายขึ้น โดยจะมีการหลั่ง chemical mediator หลายชนิดจากเซลเม็ดเลือดขาวที่มาล้อมสิ่งแปลกปลอม หรือแอนติเจนนั้น ทำให้เกิดการรั่วซึม ของผนังเส้นเลือด มีการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ เพื่อช่วยในการทำลายแอนติเจน โดยไปทำให้ไวรัสเกิดการแตกสลายของเซลขึ้น และมีการหลั่งของ ทรอมโบปลาสติน จากเนื้อเยื่อมากขึ้น (21) ระยะเวลาของการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน มักไม่เกิน 5-7 วัน ภายหลังจากที่ร่างกายได้สร้างอิมมูนขึ้นต่อต้านการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์หนึ่งทัยป์ใดในครั้งแรก ซึ่งผลของอิมมูนที่สร้างขึ้นในครั้งแรกนี้จะอยู่เพียงชั่วคราว หรืออาจมีผลคุ้มกันได้บ้างกับไวรัสอีก 3 ทัยป์ ที่เหลือ แต่อย่างไรก็ตามโอกาสในการติดเชื้อแบบทุติยภูมิก็มีได้ในระยะเวลาอันสั้น (21)

สาเหตุการตายจากการติดเชื้อซ้ำ ด้วยทัยป์ที่แตกต่างจากการติดเชื้อครั้งแรกนั้นก็เนื่องมาจาก (26,30,31,32,33)

1. มีการรั่วซึมของพลาสมาออกนอกเส้นเลือดมาก ทำให้เกิดภาวะเลือดข้นแรงดันเลือดต่ำและช็อก

Copyright by Mahidol University

2. สมดุลระบบไหลเวียนโลหิตในร่างกายบกพร่อง (disorder in haemostasis) ซึ่งก็ได้แก่การรั่วซึมของพลาสมาออกนอกกระแสเลือด ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และภาวะเลือดไหลไม่หยุดจากการขาดสารที่ทำให้เลือดแข็งตัว

ปัจจุบันการศึกษาที่เกี่ยวกับโรค DHF มุ่งไปทางด้านการควบคุมและป้องกันโรคด้วยการกำจัดยุงลาย (22,34,35) แต่ในเรื่องของการเฝ้าระวังโรคนั้นยังไม่มีผู้ใดได้ศึกษากันอย่างจริงจังและอย่างกว้างขวาง ผู้ทำการวิจัยเห็นว่าการศึกษาการเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่นี้เป็นเรื่องที่สำคัญและน่าสนใจ เพราะจะได้ทราบสถานการณ์ของโรคได้ก่อนที่จะมีการระบาด ตลอดจนสามารถที่จะหาวิธีการต่าง ๆ มาใช้ในการควบคุมโรคไม่ให้เกิดการระบาดรุนแรงขึ้น การเฝ้าระวังโรคจะต้องกระทำทั้งในบริเวณที่เป็นแหล่งชุมชุมของโรคและในบริเวณที่เป็นแหล่งที่ง่ายต่อการรับเชื้อ เช่น บริเวณที่มีเด็กซึ่งเคยมีประวัติติดเชื้อด้วยทัยป์ใดทัยป์ หนึ่งมาก่อนเป็นต้น

จากคู่มือ diagnostic, treatment and control โรค DHF ขององค์การอนามัยโลก (21, 36) ได้กล่าวถึงวิธีการเฝ้าระวังโรค (Surveillance) ดังนี้

1. การเฝ้าระวังโรค ในผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีไข้จากเชื้อไวรัสเด็งกี่ หรือมีไข้ไม่ทราบสาเหตุ โดยการสังเกตอาการอย่างใกล้ชิด การตรวจร่างกาย การตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ทราบอาการผิดปกติและให้การช่วยเหลือได้ทันที

2. การให้ความดูแลผู้ป่วย DHF อย่างใกล้ชิด ตามระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่มีไข้ มีเลือดออก ไปจนถึงอาการช็อก

3. การรายงานผู้ป่วยอย่างถูกต้องตามการวินิจฉัยอาการของโรคไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนส่วนกลาง คือ กองระบาดวิทยาอย่างสม่ำเสมอ เพื่อจะได้เตรียมการอย่างถูกต้องในการระบาดครั้งต่อไป

4. การเฝ้าระวังด้านยุงลายซึ่งเป็นแมลงนำโรค การให้สุขศึกษาถึงวิธีกำจัดวิธีป้องกันตนเองจากการถูกยุงกัด และการกำจัดยุงโดยเจ้าหน้าที่ของรัฐ

5. การเฝ้าระวังโรคด้วยการเจาะเลือดตรวจหาแอนติบอดีย์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในกลุ่มเสี่ยงต่อโรค เพื่อดูว่ามีแอนติบอดีย์ต่อทัยป์ ใดอยู่ในกระแสเลือดแล้ว และโรคจะเกิดการระบาดได้เมื่อมีไวรัสต่างทัยป์ ใดบ้างเมื่อเกิดการติดเชื้อทุติยภูมิ

6. การเฝ้าระวังโรคด้วยการตรวจหาเชื้อไวรัสในซีรั่มผู้ที่มีการติดเชื้อในเขตที่มีการระบาดของโรคด้วยวิธีแยกเชื้อไวรัส แล้วนำมาเปรียบเทียบกับการแยกเชื้อจาก

Copyright by Mahidol University

ยุงลายที่อยู่ในเขตนั้นว่า เป็นทัยป์เดียวกันหรือต่างทัยป์กันอย่างไร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในอนาคต

จังหวัดลำพูน เป็นจังหวัดหนึ่งที่มีการระบาดของโรคไวรัสเด็งกี่มาสม่ำเสมอเกือบทุกปี จึงน่าที่จะได้มีการศึกษาการเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ขึ้น ทั้งนี้เพื่อจะได้เป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานเฝ้าระวังโรคของจังหวัด เพื่อดำเนินการควบคุมและป้องกันมิให้เกิดการระบาดรุนแรงของโรคต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งมีการระบาดในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูน เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดในส่วนอื่น ๆ ของประเทศ

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรคของผู้ป่วยกับทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

3. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกกับระยะเวลา และอัตราป่วยรายเดือนในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูน รวมทั้งศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดในจังหวัดนี้

3. สมมติฐานของการวิจัย

1. การระบาดของเชื้อไวรัสเด็งกี่แต่ละทัยป์ ในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูนจะมีความแตกต่างกัน

2. อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรคของผู้ป่วย จะมีความสัมพันธ์กับทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ทำให้เกิดการระบาดในจังหวัดลำพูน ได้อย่างถูกต้อง และสามารถนำไปเปรียบเทียบกับการระบาดในส่วนอื่น ๆ ของประเทศได้

Copyright by Mahidol University

2. ทราบปัจจัยที่เกี่ยวข้องทางระบาดวิทยาต่อการแพร่กระจายทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ได้แก่ อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรค

3. แนวทางในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ให้เหมาะสมกับทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในจังหวัดลำพูนต่อไป

4. ข้อมูลที่เป็นประโยชน์แก่หน่วยงานเฝ้าระวังโรคและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของจังหวัดลำพูน ในการทำนายทัยป์ของไวรัสในการระบาดครั้งต่อไป และเป็นแนวทางในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรค

5. แนวทางในการศึกษาวิจัยด้านอื่น ๆ ต่อไป

5. ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาในช่วงระยะเวลา 1 ปี โดยเริ่มตั้งแต่ 1 มกราคม 2532 - 31 ธันวาคม 2532 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลชุมชนทุกอำเภอของจังหวัดลำพูน และโรงพยาบาลจังหวัดลำพูน รวม 6 โรง

สาเหตุที่เลือกศึกษาในจังหวัดลำพูนเพราะ

1. จังหวัดลำพูน เป็นจังหวัดเล็กที่พอจะเอื้ออำนวยให้ทำการเก็บข้อมูลทั้งจังหวัดได้ ทั้งในด้านงบประมาณ และระยะเวลา

2. จังหวัดลำพูนมีภูมิประเทศหลายแบบ ทั้งที่ราบ และภูเขา เหมาะแก่การศึกษาทางระบาดวิทยา

3. ได้มีการศึกษาเรื่องวัคซีนไว้ป้องกันไข้เลือดออก ในจังหวัดลำพูนอยู่ก่อนแล้ว และเจ้าหน้าที่และประชาชนมีความคุ้นเคยกับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโรคไข้เลือดออก ในเรื่องของวัคซีนมาก่อน จึงให้ความร่วมมือดีในการศึกษาครั้งนี้

4. การคมนาคมสะดวกพอสมควร

ข้อจำกัดของการวิจัย

การเฝ้าระวังโรคจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ ในจังหวัดลำพูน ศึกษาได้เพียงระยะเวลา 1 ปีเท่านั้น ไม่สามารถศึกษาติดต่อกันไปหลาย ๆ ปี เพื่อดูแนวโน้มของการเปลี่ยน

Copyright by Mahidol University

แปลงตามเป้าหมายที่ต้องการได้ เนื่องจากมีขีดจำกัดด้านงบประมาณและระยะเวลาของผู้วิจัยเอง

7. ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ข้อมูลที่ได้จากการวินิจฉัยของแพทย์ และการบันทึกในรายงานถือว่าถูกต้องทั้งหมด

2. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออก ได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดส่งตรวจทุกคน

3. ผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้เลือดออกจริง ยึดถือตามการแปลผลจากระดับแอนติบอดีย์ในซีรั่มด้วยวิธี Haemagglutination Inhibition (HI) Test เท่านั้น

4. การเก็บตัวอย่างเลือด ถูกต้องตามขั้นตอนทุกราย

5. จำนวนประชากรทั้งหมดของจังหวัดลำพูน เมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2532 ไม่เปลี่ยนแปลงจากค่าของจำนวนประชากร เมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2531 โดยถือว่า ไม่มีการเพิ่มขึ้น หรือลดลงของจำนวนประชากรในปี พ.ศ. 2532

8. นิยามจำกัดความ

1. อายุของผู้ป่วย จะนับตามวันที่เริ่มเกิด จนถึงวันที่เจาะเลือดส่งตรวจ ถ้าเศษของอายุเป็นเดือนเกินกว่า 6 เดือนขึ้นไป ให้ปัดขึ้นอีก 1 ปี แต่ถ้าเศษของอายุน้อยกว่า 6 เดือน ให้ถือแค่อายุเต็มปี ไม่นับเศษเดือนดังกล่าว

2. ผู้ป่วย หมายถึง ผู้ที่แพทย์ในแต่ละโรงพยาบาลของจังหวัดลำพูนได้ทำการตรวจและวินิจฉัยร่างกาย และระบุว่าเป็นโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ หรือสงสัยว่าเป็น แล้วมีแผนการรักษาให้ทำการเจาะเลือดส่งตรวจทางไวรัสวิทยา

3. ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจริง หมายถึง ผู้ป่วยที่มีอาการตามคำจำกัดความของ WHO ปี พ.ศ. 2529 (21,36) ข้อใดข้อหนึ่งขึ้นไป คือ

3.1 มีไข้สูง 40-41°C นาน 2-7 วัน

Copyright by Mahidol University

3.2 มีผื่นหรือจุดเลือดออก ตลอดจนการมีเลือดออกในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย การทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก (มีจุดเลือดตั้งแต่ 20 จุด ขึ้นไปต่อพื้นที่ผิว 1 ตารางนิ้ว) มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ คือ มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100,000 /ลูกบาศก์มิลลิเมตร และมีความเข้นข้นของเลือดสูงกว่าปกติถึง 20% หรือมากกว่า

3.3 มีภาวะตับโต

3.4 ระบบไหลเวียนของโลหิตล้มเหลว โดยมีค่า Pulse pressure น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตรปรอท ความดันโลหิตต่ำกว่า 90/60 มิลลิเมตรปรอท ร่วมกับภาวะหมดสติ มือเท้าเย็น

โดยทั้งนี้ต้องมีผลการตรวจเลือดหาระดับแอนติบอดีย์ โดยวิธี HI Test ตามหลักการของ Clarke and Casal (37) ที่แปลผลสรุปได้ว่าเป็นการป่วยจากเชื้อไวรัสเด็งกี่จริง

9. ตัวแปรต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่ สถานที่ ในที่นี้ได้แก่ อำเภอต่าง ๆ ในจังหวัดลำพูน (อำเภอเมืองลำพูน อำเภอป่าซาง อำเภอแม่ทา อำเภอบ้านโฮ่ง อำเภอลี้ และกิ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง) ระยะเวลาเป็นเดือน เพศ อายุ และระดับความรุนแรงของโรคของผู้ป่วย

2. ตัวแปรตาม ได้แก่ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Copyright by Mahidol University

บทที่ 2

วรรณคดีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ (Dengue Haemorrhagic Fever-DHF) เป็นโรคติดเชื้อที่เป็นสาเหตุให้เกิดการป่วยและตายปีละมาก ๆ (4,6,9,20) เกิดในแทบทุกส่วนของโลก ได้แก่ ทวีปเอเชีย อาฟริกา ออกเตรเลีย อเมริกา และยุโรป (2,3,4,6,9,38) จึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลก (4,7,10,38)

คำว่า "เด็งกี่" เป็นคำที่มาจากภาษาในกลุ่มเกาะอินเดียตะวันตก เริ่มใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2470-2471 (38) เพื่อใช้เรียกโรคที่มีอาการกระตุกเกร็งอย่างกะทันหันคล้ายการชัก ปวดศีรษะ เจ็บปวดตามกระดูกข้อต่อ และกล้ามเนื้อ ซึ่งมาจากคำในภาษาสเปน คือ "Ki denga pepo"

โรคนี้พบครั้งแรกที่เมืองฟิลาเดลเฟีย เมื่อ ปี พ.ศ. 2323 (4,7,9,10) ในปี พ.ศ. 2327 ระบาดแถบยุโรป (10) ปี พ.ศ. 2361 มีการระบาดที่ประเทศเปรู (7) ปี พ.ศ. 2395 ระบาดแถบเกาะตาฮิติ และหมู่เกาะทะเลใต้ (1) ปี พ.ศ. 2414-2416 มีการระบาดที่ทวีปแอฟริกา ปี พ.ศ. 2419 พบที่เกาะฮ่องกง (4) ในปี พ.ศ. 2428 พบการระบาดของ DHF ในรัฐควีนแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย (9,10) มีผู้ป่วย 60 ราย ต่อมาในปี พ.ศ. 2441 พบมีการระบาดในประเทศออสเตรเลีย (9,10) ปี พ.ศ. 2472 ระบาดในประเทศกรีก (7,9,10) สำหรับประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และหมู่เกาะแปซิ-ฟิคตอนใต้ มีการระบาดอย่างประปรายมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2428 (7,10,12) ในปี พ.ศ. 2494 มีการระบาดใหญ่ครั้งแรกที่กรุงมะนิลา ประเทศฟิลิปปินส์ (4,7,12) มีผู้ป่วยกว่า 700 ราย โดยมีอาการคล้าย ๆ กับที่เกิดในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2492 คือ มีไข้สูง มีเลือดออกใต้ผิวหนัง และช็อก ซึ่งพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในวัยเด็ก จนถึงวัยรุ่น มีอายุระหว่าง 2-15 ปี ในปี พ.ศ. 2499 มีการระบาดของโรคนี้ซ้ำอีกในกรุงมะนิลา (4) มีผู้ป่วยไม่ต่ำกว่า 1,200 ราย จากการระบาดทั้ง 2 ครั้งนี้ สามารถแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุได้จากผู้ป่วย และยุงลาย เพิ่มเติมจากเดิมที่มีอยู่ 2 ทัยป์ คือ ทัยป์ 1 และ ทัยป์ 2 เป็น ทัยป์ 3 และ 4 ตามลำดับ (7,39) การ

Copyright by Mahidol University

ระบาดดังกล่าวนี้ได้ถูกเรียกว่าเป็นไข้เลือดออกฟิลิปปินส์ (Philippines Haemorrhagic Fever) (4,7)

ไข้เลือดออกในประเทศไทย แม้ว่าจะพบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2492 แต่เกิดการระบาดขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2501 (1,14) ในท้องที่เขตกรุงเทพ-ธนบุรี และพบการระบาดในอีกหลาย ๆ ประเทศใกล้เคียง ได้แก่ประเทศสิงคโปร์ ประเทศเวียดนามใต้ ในปี พ.ศ. 2503 (4) ประเทศกัมพูชา ปี พ.ศ2504 (1,4) เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย และประเทศลาว ปี พ.ศ. 2505 (1,4,40) ประเทศอินเดีย ปี พ.ศ. 2506 (4) กรุงร่างกุ้ง ประเทศพม่า ปี พ.ศ. 2507 (1) ประเทศอินโดนีเซีย ปี พ.ศ. 2511 (1,40)

ในปี พ.ศ. 2520 มีการระบาดที่ทวีปอเมริกา ณ ประเทศจาไมก้า แล้วแพร่กระจายไปยัง หมู่เกาะแคริบเบียน ทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกากลาง และประเทศเม็กซิโก ตามลำดับ (4,6,7,9,10)

ตั้งแต่ช่วงปี พ.ศ. 2513 - พ.ศ. 2526 นับเป็นเวลานาน 13 ปี มีจำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลของประเทศพม่า เท่าที่รายงานได้ทั้งหมดมี 33,421 ราย ตาย 1,476 ราย ในประเทศอินโดนีเซียมีผู้ป่วย 21,818 ราย ตาย 916 ราย สำหรับประเทศไทยนั้น พบว่ามีรายงานจำนวนผู้ป่วยมากถึง 284,290 ราย และตาย 6,228 ราย ในช่วงระยะเวลา 25 ปี คือ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2501 - พ.ศ. 2526 (40,41) และในช่วงปี พ.ศ. 2527-2530 มีผู้ป่วยในไทยถึง 350,333 ราย ผู้ป่วยตาย 2,005 ราย (42) นอกจากนี้ ยังมีรายงานผู้ป่วยที่อยู่ในแถบแปซิฟิคตะวันตก ในช่วงปี พ.ศ. 2518 - พ.ศ. 2521 คือ ประเทศมาเลเซีย พบผู้ป่วยทั้งหมด 1,288 ราย ประเทศฟิลิปปินส์ พบ 836 ราย และประเทศสิงคโปร์พบ 533 ราย (มีรายงานเฉพาะในปี พ.ศ. 2519 - พ.ศ. 2520)

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า เชื้อไวรัสเด็งกี่ มีการแพร่กระจายไปอย่างกว้างขวาง ทั่วทุกแถบของโลก ทั้งทวีปเอเชีย ทวีปยุโรป และแถบแปซิฟิคตะวันตก ซึ่งกำลังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของหลายประเทศที่อยู่ในแถบนี้อยู่ในปัจจุบัน (4,7,10,40,41)

Copyright by Mahidol University

แมลงนำโรค (The vectors)

เชื้อไวรัสเด็งกี่มีการติดต่อโดยอาศัยยุงลาย (**Aedes aegypti**) เป็นแมลงนำโรคที่สำคัญที่สุด (1,2,3,4,5,6,7,10) ทั้งในเขตภาคพื้นเอเชีย และแปซิฟิคตะวันตก สามารถวางไข่ได้ในทั่วทุกแห่ง ไม่เฉพาะแต่เมืองใหญ่ ๆ เท่านั้น แต่จะอยู่ทั่วไปทั้งในเมืองและชนบทด้วย (1,7,20,21) โดยวางไข่ได้ตามภาชนะเก็บกักน้ำตามบ้านเรือน เช่น กระป๋อง ตุ่มน้ำ ถัง รวมทั้งขารองตู้กับข้าว ภาชนะแตกบางส่วน กะลา และยางรถยนต์ที่ไม่ใช้แล้ว ฯลฯ (20) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝนซึ่งมีน้ำขังตามแหล่งดังกล่าว ยุงลายจะเพาะพันธุ์ทวีจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว (1,7,10,20) เมื่อยุงนี้ไปกัดผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่อยู่ในกระแสเลือดก็จะสามารถแพร่กระจายไปสู่คนปกติได้ต่อไปเรื่อย ๆ (6,7,9,10) จนทำให้เกิดการระบาดขึ้น ซึ่งเชื้อจะอยู่ในตัวยุงลายได้ตลอดอายุของยุง คือ ประมาณ 1-2 เดือน (6,7) เพราะฉะนั้นเมื่อยุงลายไปกัดใครก็จะถ่ายทอดเชื้อได้ตลอดเวลาโดยมีคนเป็นแหล่งเก็บโรคนี้ (6)

เชื่อว่ายุงลายมีถิ่นกำเนิดจากทวีปอาฟริกาแล้วแพร่เข้ามาอยู่ในทวีปเอเชีย จนกลายมาเป็นตัวนำโรคไข้เลือดออกที่สำคัญที่สุดในปัจจุบัน (40) อาศัยการดูดเลือดจากคนและสัตว์เลี้ยงเป็นอาหาร

ยุงลาย สามารถแพร่พันธุ์ได้ในแหล่งน้ำที่จำกัด โดยเฉพาะแหล่งเก็บกักน้ำตามภาชนะในบ้านเรือน ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของคนและสัตว์เลี้ยง จึงเรียกเป็น "Domistic habit and habitat" แต่เนื่องจากรัศมีการบินมีจำกัดเพียง 100 เมตร ดังนั้นจึงมีความชุกชุมของโรคสูงในบริเวณที่มีประชากรอาศัยกันอย่างหนาแน่น (20)

ยุงในสปีชีส์อื่น ๆ ที่สามารถทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ในบางครั้งได้แก่ **Aedes albopictus, Aedes polynesiensis** และ **Aedes scutellaris** ซึ่งยุงเหล่านี้มีลักษณะการแพร่กระจาย และการอยู่อาศัยที่คล้ายคลึงกับ **Aedes aegypti** มาก แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีความสำคัญเท่ากับพวก **Aedes aegypti** (24,40)

Copyright by Mahidol University

ไวรัสวิทยา

เชื้อไวรัสเด็งกี่ (Dengue Virus) จัดอยู่ใน แฟมิลี่ ฟลาวิวิริดี่ (Family Flaviviridae) (5-10) ซึ่งแต่เดิมเคยจัดเป็นจีนัสหนึ่งในแฟมิลี่ โตก่าวิริดี่ (Family Togaviridae) ซึ่งเป็นกลุ่มที่รวมเอาเชื้อไวรัสที่มีแมลงเป็นตัวนำโรค (1-10) มีอยู่ด้วยกัน 4 จีนัส คือ อัลฟาไวรัส (Alphavirus) ฟลาวิไวรัส (Flavivirus) เพสติไวรัส (Pestivirus) และรูบิไวรัส (Rubivirus) (1,8,9) สำหรับไวรัสเด็งกี่นี้เดิมจัดเป็นพวกเดียวกับจีนัสฟลาวิไวรัส (4,6,7,8,9) แต่เนื่องจากมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากเชื้อกลุ่มอื่น ๆ ในแฟมิลี่นี้ คือ มีความแตกต่างในขบวนการเพิ่มจำนวนและคุณสมบัติอื่น ๆ (43) ในปี พ.ศ. 2527 จึงแยกเป็นแฟมิลี่ฟลาวิวิริดี่ (6,43) ซึ่งมีเพียงจีนัสเดียวในแฟมิลี่นี้คือ จีนัส ฟลาวิไวรัส (Genus Flavivirus)

เชื้อไวรัสในจีนัสฟลาวิไวรัส เดิมเคยเรียกเป็น อาร์โบไวรัส กรุ๊พบี เชื้อนี้มีแอนติเจนร่วมกัน และมีแอนติเจนที่จำเพาะสปีชีส์ (37,44)

เชื้อไวรัสเด็งกี่ มีลักษณะทางระบาดวิทยา และคุณสมบัติทางชีววิทยาที่คล้ายคลึงกับไวรัสในจีนัสนี้ ได้แก่ เยลโลฟีเวอร์ (Yellow Fever) เซนต์หลุยส์ เอนเซฟาไลติส (St. Louis Encephalitis) แจแปนนิสเอนเซฟาไลติส (Japanese Encephalitis) เวส ไนท์ (West Nite), เมอร์เรย์ แวลลี่ย์ เอนเซฟาไลติส (Murray Valley Encephalitis) และรุสเซี่ยน ติคบอร์น เอนเซฟาไลติส (Russian tickborne Encephalitis) (5-8,43) ซึ่งมีแมลงดูดเลือดเป็นตัวนำโรค (hemophagous insects) (6,8)

เมื่อยุงลายดูดเลือดจากคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ป่วยและมีเชื้อไวรัสเด็งกี่อยู่ในกระแสเลือด (viremia) (1,5,6) ถ้าเชื้อไวรัสมีจำนวนมากพอ เมื่อยุงดังกล่าวไปกัดคนปกติต่อ ก็จะสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่อยู่ในต่อมน้ำลายของยุงไปสู่กระแสเลือดคนปกตินั้น และทำให้เกิดอาการป่วยได้ (7) แต่ถ้าเชื้อไวรัสที่ยุงได้รับมาจากผู้ป่วยมีจำนวนเล็กน้อย เชื้อไวรัสจะเข้าไปอยู่ในทางเดินอาหารของยุง และเนื้อเยื่อของยุงรอระยะเวลาในการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนไวรัสในตัวยุงให้มีจำนวนมากพอแล้ว จึงออกมาอยู่ที่ต่อมน้ำลายของยุง (6) ระยะเวลาตั้งแต่ยุงดูดเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่เข้าไป จนสามารถปล่อยเชื้อออกจากต่อมน้ำลายได้ เรียกว่าระยะฟักเชื้อภายนอก (Extrinsic

Copyright by Mahidol University

incubation period) ซึ่งกินเวลานานประมาณ 8-10 วัน (6,21,43) ถ้าอุณหภูมิของอากาศทั่วไปเป็น 30°c และกินเวลานานประมาณ 26 วัน (43) ถ้าอุณหภูมิของอากาศเป็น 26°c หรือต่ำกว่านี้ ซึ่งจัดอยู่ในช่วงฤดูหนาวจากการที่เชื้อไวรัสมีวงจรชีวิตที่มีการเพิ่มจำนวนในตัวแมลงพาหะนั้น จึงเรียกวิธีการติดต่อนี้ว่า การติดต่อทางชีวภาพ (biological transmision) (43)

การระบาดเกิดขึ้นภายหลังจากยุงที่มีเชื้อไวรัสดังกล่าวไปกัดคนหรือสัตว์ปกติ แล้วถ่ายทอดเชื้อไวรัสให้จนเกิดการติดเชื้อ และมีเชื้อไวรัสเด็งกี่ทวีจำนวนในร่างกายของคนหรือสัตว์ที่ถูกยุงกัด จนมากพอที่จะทำให้เกิดอาการป่วยได้เรียกระยะนี้ว่า ระยะฟักตัวของโรค (intrinsic incutation period) ซึ่งกินเวลานาน 4-6 วัน (6,21) แล้วเชื้อไวรัสแพร่ต่อไปยังคนปกติอื่น ๆ ได้อีกเรื่อย ๆ โดยอาศัยยุงนำโรคมากัดและดูดเลือดจากคนหรือสัตว์ที่ป่วย ถ่ายทอดไปยังคนปกติเหล่านั้น

เชื้อไวรัสเด็งกี่ พบอยู่ในกระแสเลือดได้ 2 ระยะด้วยกันคือ ระยะแรก (primary viremia) (43) เชื้อจะผ่านทางผิวหนังเข้าสู่เส้นเลือดฝอย และเข้าไปอยู่ในเซลเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยต์ ระยะแรกนี้เชื้อไวรัสยังมีจำนวนน้อยอยู่ จนไม่สามารถทำให้เกิดอาการป่วยได้ ดังนั้นจึงไม่แสดงอาการของโรค เชื้อไวรัสจะทวีจำนวนขึ้นในเซลโมโนซัยต์ เมื่อเซลโมโนซัยต์ตายลงจากการมีไวรัสอยู่มาก หรือเกิดขบวนการทำลายทางอิมมูน ไวรัสจะแพร่กระจายในกระแสเลือด และไปยังอวัยวะที่เป็น lymphoid tissue ได้แก่ ตับ และม้าม (43) ไปเพิ่มจำนวนขึ้นตามอวัยวะเหล่านั้น แล้วเดินทางกลับเข้าสู่กระแสเลือดอีกเป็นระยะที่ 2 (secondary viremia) (43) เชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีมากพอในกระแสเลือด จะเข้าสู่อวัยวะต่าง ๆ เกือบทุกระบบของร่างกาย จนเกิดพยาธิสภาพขึ้นที่อวัยวะนั้น ๆ แล้วแสดงอาการป่วยขึ้น (1,43) ดังนั้นการตรวจพบเชื้อไวรัสจึงพบในระยะที่ 2 (secondary viremia) นี้

ระยะที่มีเชื้อในกระแสเลือด ในคนกินเวลาประมาณ 5 วัน หลังจากเริ่มปรากฏอาการป่วยเกิดขึ้น (43) เชื้อไวรัสเด็งกี่ปกติจะอยู่ในเซลเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยต์ (25) แต่ก็มีบางส่วนที่อยู่เป็นอิสระในพลาสมา (45)

Copyright by Mahidol University

เมื่อจำแนกตามปฏิกริยาทางซีรั่ม ด้วยวิธี Monoclonal antibody และวิธี Neutralizing antibody จะแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ออกเป็น 4 ซีโรทัยป์ (serotypes) ด้วยกัน (25) คือ

DEN-1 แยกได้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2487 ในรัฐฮาวาย โดย Sabin (46) มี โปรโตทัยป์ คือ Hawaii เชื้อที่นำมาศึกษามากที่สุดตัวหนึ่งคือ TH. SMAN

DEN-2 แยกได้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2487 ในประเทศนิวกินี (46) มี โปรโตทัยป์ คือ New Guinea C., เชื้อที่นำมาศึกษาคือ TH.-36

DEN-3 แยกได้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2499 ในประเทศฟิลิปปินส์โดย Hammon และคณะ (21,47) มี โปรโตทัยป์ คือ H.87

DEN-4 แยกได้พร้อมกับ DEN-3 โดยคณะเดียวกัน (47) มี โปรโตทัยป์ คือ H.241

โดย ทัยป์ 1 และ 3 แยกโดยวิธี Monoclonal antibody และ ทัยป์ 2 และ 4 แยกโดยวิธี Neutralizing antibody (1,6,10) ทั้ง 4 ทัยป์ นี้จัดอยู่ใน Arbovirus group B subgroup 2

ทัยป์ ที่ 3 พบบริเวณตาฮิติ และแถบทะเลแคริบเบียน เมื่อปี พ.ศ. 2526 (6,10) ส่วนในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อาฟริกา และบางส่วนของแถบแคริบเบียนนั้น มักพบเป็น ทัยป์ 1 เสียเป็นส่วนใหญ่ถึง 50-75% (10) ส่วน ทัยป์ 2 และ 4 นั้น พบที่ประเทศอินเดีย (1)

สำหรับประเทศไทยนั้น ทำการแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1 และ 2 ได้ในปี พ.ศ. 2493 และ พ.ศ. 2494 (21,43) ส่วน ทัยป์ 3 และ 4 แยกได้เมื่อปี พ.ศ. 2499 (43,47)

คุณสมบัติของเชื้อไวรัสเด็งกี่

1. **คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี**

เชื้อไวรัสเด็งกี่ มีรูปร่างสันฐานกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร (5-10) มีเปลือกหุ้มชั้นนอก (envelope) เป็นชั้นไขมันเรียงตัว 2 แถว

Copyright by Mahidol University

(lipid bilayer membrane) ที่มีกลัยโคโปรตีนชนิดเดียว เรียกว่า อี-โปรตีน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น haemagglutinin และ membrane like M-protein (48) ชั้นของเปลือกหุ้มชั้นนอกนี้ง่ายต่อการละลายในสารไขมันชนิดต่าง ๆ (6,7,8)

การจัดเรียงตัวของ แคปซิด เรียงตัวเป็นรูปลูกบาศก์ ขนาด 25-30 นาโนเมตร ส่วนแคพโซเมอร์จะมีการจัดเรียงเป็นรูปเหลี่ยมมี 12 มุม 20 หน้า (ichosahedral symmetry) (5,8)

ยีโนมประกอบด้วย RNA โปรตีนชนิดสายเดี่ยว (single strand RNA) เป็นเส้นตรง ขั้วบวก และมีน้ำหนักโมเลกุล 4.2 ล้านดาลตันเป็นแกนใน มีคุณสมบัติติดเชื้อได้ (43) รูปร่างของนิวคลีโอแคพซิดเป็นรูปยาว มีปลายกลม (round) ขนาด 22 นาโนเมตร

โปรตีนของเชื้อเด็งกี่ แบ่งเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง (structural protein) ได้แก่ โปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้มชั้นนอก ส่วนที่เป็นแกนใน และส่วนที่เป็นเมมเปรนห่อหุ้ม ส่วนโปรตีนที่เหลือคือโปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้าง (non-structural protein)

โปรตีนโครงสร้าง ประกอบด้วยโพลีเปปไตด์อย่างน้อย 3 สาย คือ ชนิด VP.1 หรือ M เป็น non-glycosylate protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,000 ดาลตัน เชื่อมติดกับเปลือกหุ้มชั้นนอก VP.2 หรือ C เป็นส่วนของ core protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13,000 ดาลตัน เชื่อมติดกัน RNA (ในส่วนของ neucleocapsid protein) และ VP.3 หรือ E มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 59,000 ดาลตัน เป็นกลัยโคโปรตีนที่เป็นส่วนของเปลือกหุ้มชั้นนอก (43,44)

โปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้าง แต่เดิมมี 5 ชนิดย่อย ๆ ด้วยกัน คือ NV1, NV2, NV3, NV4 และ NV5 ต่อมาเรียกใหม่เป็น NS แยกได้เป็น 7 ชนิดย่อย ๆ คือ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b และ NS5 (43,44)

โปรตีนที่พบในเด็งกี่ไวรัสทั้งหมด แสดงได้ดังตารางที่ 4

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 4 โปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่พบในเชื้อไวรัสเด็งกี่ (43,44,49)

ชนิดของโปรตีน ชื่อเดิม (ชื่อใหม่)	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	จำนวน amino acid	% ของยีโนมที่ใช้สร้าง สร้าง (encoding)
Structural			
V1 (M-membrane)	7-9	50	02
V2 (C-Core)	13-16	120	05
V3 (E-envelope)	54-60	470	18
Non-structural			
NV1 (NS4b)	9-11	70	03
NV2 (NS2a)	16-21	150	06
NV3 (NS1)	42-46	390	15
NV4 (NS3)	92-98	600	23
NV5 (NS5)	92	740	28

2. **คุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน**

เชื้อไวรัสเด็งกี่สามารถเพิ่มจำนวนในซัยโตพลาสซึมของเซลสิ่งมีชีวิต และเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ในบริเวณซัยโตพลาสมิค เวสวิเคิล (6,10,37)

ไม่พบ mRNA ที่สร้างจากยีโนม และไม่พบโพลี่โปรตีนที่เป็นตัวนำมาก่อน คาดกันว่าการ translation เกิดขึ้นโดยตรงจากตำแหน่งต่าง ๆ ของ viral RNA โดย viral RNA polymerase ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะที่ต่างจากไวรัสกลุ่มอื่น (37)

เชื้อไวรัสเด็งกี่ จะถูกยับยั้งขบวนการเมตาบอลิสม โดย metabolic inhibitors บางตัว ได้แก่ 5-fluorouridine, 6-azauridine และ puromicin เป็นต้น

Copyright by Mahidol University

3. คุณสมบัติทางชีวภาพ

3.1 โฮสต์

ตามธรรมชาติคือ มนุษย์ ลิง และยุง Aedes สปีชีส์ต่าง ๆ

ในห้องทดลอง พบว่า เชื้อไวรัสเด็งกี่ สามารถเจริญเติบโตได้ในเซลเพาะเลี้ยงชนิดปฐมภูมิ (primary and continuous cell cultures) ได้แก่ เซลของมนุษย์ (BSC-1) เซลไตลิง (LLC-MK_2) เซลไตแฮมสเตอร์ (BHK-21) และเซลยุง **Aedes albopictus** (c 6/36), **Aedes pseudoscutellaris** (6,10,43)

นอกจากนี้เชื้อไวรัสเด็งกี่ยังเจริญแบ่งตัวได้ในสมองของลูกหนูที่ยังไม่หย่านมตลอดจนสมองแฮมสเตอร์ที่ถูกฉีดเชื้อเข้าสมอง แต่ในสัตว์ดังกล่าวเชื้อไวรัสไม่ได้ทำให้มีอาการรุนแรงเสมอไป อาจพบเพียงบางตัวเท่านั้นที่มีอาการรุนแรง เสียชีวิต หรืออัมพาตได้ (6) แต่ในพวกหนูตะเภา กระต่าย หนูฝ้าย แฮมสเตอร์ ลูกไก่ และจิ้งจกนั้นไม่พบว่ามีการติดเชื้อนี้ (6,7) ในไข่ฟักมีเพียงไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1 และ 2 เท่านั้นที่เจริญแบ่งเซลได้ ส่วนในยุง เชื้อไวรัส จะแบ่งตัวมากบริเวณส่วนอกหรือส่วนหัวของยุง **Aedes spp.** และ **Toxorhynchites spp.** (6,7)

3.2 **Haemagglutination**

เฉพาะเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีก เช่น เลือดห่าน หรือนก โดยขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในปฏิกริยานั้น (43)

ลักษณะทางแอนติเจนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ แบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. **โปรตีนแอนติเจน ที่เป็นส่วนโครงสร้าง** มี common group antigen ที่เป็นส่วนของ นิวคลีอิก แอซิด หรือ แคพซิด (1,10,43,49,50) หรือเป็นส่วนที่เรียกว่าโปรตีนแกนใน ประกอบด้วยแอนติเจนชนิดต่าง ๆ กัน 2 ชนิด คือ

1.1 Haemagglutination antigen (HA) ชนิดตกตะกอนเร็วเมื่อนำไปปั่นจึงเรียกได้อีกชื่อว่า Rapidly sedimenting haemagglutination antigen (RHA) ซึ่งเป็นส่วนของ virion จะแสดงคุณสมบัติ haemagglutinin, complement-fixing และติดเชื้อเพิ่มจำนวนได้

Copyright by Mahidol University

1.2 Complement fixing antigen (CF) เป็นแอนติเจนชนิดที่ต้องอาศัยคอมพลีเมนต์ในการเกิดปฏิกริยาทางอิมมูน

แอนติเจนทั้งสองชนิดนี้อยู่ใน virion ซึ่งได้แก่บริเวณแคพซิด หรือนิวคลีโอแคพซิด จะแสดงลักษณะจำเพาะของทั้งจีนัสและ ทัยป์ของเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงอาจเรียกได้อีกชื่อว่า "virion protein antigen"

2. **โปรตีนแอนติเจนที่ไม่เป็นโครงสร้าง** มีแอนติเจนที่ไม่ได้เป็นส่วนของโครงสร้าง (1,10,43,50) ประกอบด้วยแอนติเจน 2 ชนิดคือ

2.1 Haemagglutination antigen ชนิดตกตะกอนช้าเมื่อนำไปปั่น เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Slowly sedimenting haemagglutination antigen (SHA) ซึ่งเป็นส่วนของไวรัสที่ขาดนิวคลีโอแคพซิดไปบางส่วนจะแสดงคุณสมบัติ haemagglutinin, complement-fixing แต่ไม่มีการติดเชื้อ แสดงทั้งจีนัสและทัยป์ของไวรัส

2.2 Soluble complement fixing antigen (SCF) เป็นโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติเฉพาะ Complement fixing เท่านั้น จึงแสดงเฉพาะทัยป์ของเชื้อไวรัส ตรงกับ non-structural protein ที่เรียกว่า NV 3(NS1)

แอนติเจนทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้อยู่ใน virion ดังนั้นจึงเรียกได้อีกชื่อว่า "non-virion protein antigen"

การตอบสนองทางระบบอิมมูนต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่

เนื่องจากไวรัสเด็งกี่มี 4 ทัยป์ ที่แตกต่างกันตามลักษณะของแอนติเจน เมื่อเชื้อเด็งกี่เข้าสู่ร่างกายจะเกิดการตอบสนองทางอิมมูน ดังนี้ (1,6,7,10,51)

1. **การตอบสนองต่อการติดเชื้อครั้งแรก** (primary infection) การตอบสนองแบบนี้จะเกิดเป็นครั้งแรกในผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสเด็งกี่มาก่อน เช่น เด็กเล็กหรือชาวต่างประเทศ ที่เดินทางมาจากภูมิภาคที่ปลอดโรค หรือไม่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นโรคประจำถิ่น ร่างกายจะเริ่มมีการสร้างแอนติบอดีย์ภายหลังการได้รับเชื้อ ตั้งแต่ตอนปลายระยะเฉียบพลันของโรค ในระหว่างวันที่ 4-7 ในระดับต่ำ ๆ หลังจากนั้น แอนติบอดีย์จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น และสูงสุดเจนในปลายสัปดาห์ที่ 2 ของโรค แต่แม้ว่าจะมีภูมิต้านทานเกิดขึ้น ภูมิต้านทานนี้คุ้มกันได้จำเพาะทัยป์ ที่เกิดการติดเชื้อนั้นไปตลอดชีวิต และคุ้มกัน

Copyright by Mahidol University

การติดเชื้อในกลุ่ม ฟลาวิไวรัส ด้วยกันได้ในเวลาสั้น ๆ 3-6 เดือน หลังจากนั้น ภูมิต้านทานจะลดระดับลง จนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ ทัยป์ อื่น ๆ ได้ นอกจากนี้แอนติบอดีย์ที่เกิดขึ้นบางตัว อาจเป็นตัวช่วยกระตุ้นให้เชื้อไวรัสเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลโมโนซัยต์ได้มากขึ้น (enhancing antibody) (25,59)

1.1 ในเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี จะได้รับแอนติบอดีย์ต่อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ใดทัยป์หนึ่ง ผ่านจากมารดามาทางรก จากการศึกษาของ Halstead และคณะ ปี พ.ศ. 2513 (29) พบว่าในกรุงเทพมหานคร หญิงมีครรภ์มีแอนติบอดีย์ต่อเด็งกี่ทุกคน และถ่ายทอดไปยังทารกในรูปของ อิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ระดับแอนติบอดีย์ดังกล่าวจะลดลงต่ำกว่าระดับที่พอจะคุมกันโรคได้ (protective threshold) ก่อนอายุ 6 เดือน นอกจากจะไม่คุ้มกันโรคแล้วยังกลายเป็น sensitizing immunity ส่งเสริมให้มีการติดเชื้อที่มีอาการรุนแรงได้ ดังนั้น จึงพบว่ามีเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ป่วยเป็นโรคไข้เลือดออกจากไวรัสเด็งกี่ได้ตั้งแต่อายุ 4 เดือน พบมากในกลุ่มอายุ 8-9 เดือน

1.2 ในเด็กอายุมากกว่า 1 ปี หรือผู้ใหญ่ อาการมักไม่ค่อยรุนแรง และไม่เห็นเด่นชัด (29)

2. **การตอบสนองต่อการติดเชื้อครั้งที่สอง** (secondary infection) พบในผู้ป่วยที่เคยมีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่มาก่อนแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง โดยเป็นทัยป์ใด ทัยป์หนึ่งก็ได้ใน 4 ทัยป์ เนื่องจากเชื้อมีแอนติเจนที่คล้ายคลึงกันทั้ง 4 ทัยป์ ดังนั้นเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำ การตอบสนองทางอิมมูน จึงเป็นแบบสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเด่นชัด ตั้งแต่สัปดาห์แรกของโรคและสูงติดต่อกันเรื่อยไป ตลอดระยะการดำเนินของโรค เรียกว่า anamnestic response (51) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับแอนติบอดีย์ดังกล่าวจะเพิ่มสูงกว่าการติดเชื้อครั้งแรก และจะเป็นแอนติบอดีย์ต่อไวรัสเด็งกี่ตั้งแต่ 2 ทัยป์ ขึ้นไป โดยระดับแอนติบอดีย์ที่ตรวจได้จะเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัสที่ผู้ป่วยเคยได้รับในการติดเชื้อครั้งแรกมากกว่าการติดเชื้อครั้งที่สอง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "The doctrine of original antigenic sin" (29,39,51)

3. **การตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยการสร้างแอนติบอดีย์** พบแอนติบอดีย์เกิดขึ้น 3 ชนิด ภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่แล้ว ซึ่งแอนติบอดีย์ดังกล่าวมีประโยชน์ในการเป็นหลักวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ คือ (1)

ชนิดที่ 1 ก่อให้เกิดการยับยั้งปฏิกริยา การจับเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเรียกว่า Haemagglutination inhibition antibody (HIA)

Copyright by Mahidol University

ชนิดที่ 2 เมื่อเกิดปฏิกริยาทางอิมมูน ต้องการคอมพลีเมนต์ เรียกว่า Complement fixing antibody (CFA)

ชนิดที่ 3 สามารถทำลายฤทธิ์ของไวรัสได้ เรียกว่า Neutralizing antibody (NA)

การตรวจหาแอนติบอดีย์ทั้ง 3 ตัวดังกล่าว วิธี NA สามารถบอกได้ว่าเป็นการติดเชื้อจาก ทัยป์ ใด ส่วนอีก 2 วิธีบอกได้ยาก (1,10)

การมีปฏิกริยาระหว่าง แอนติเจน-แอนติบอดีย์ เกิดเป็นอิมมูนคอมเพล็กซ์ขึ้น (1,10) นั้น จะเกิดหลังการติดเชื้อครั้งแรก 6 เดือน แต่ไม่เกิน 5 ปี (1) ปฏิกริยาจะเกิดรุนแรงแตกต่างกันไปตามจำนวนทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดอยู่ในบริเวณนั้นคือ

1. หากเป็นการแพร่เชื้อครั้งแรก หรือนานเกินกว่า 5 ปี ไปแล้ว ในเด็กจะมีอาการอ่อน ๆ คล้ายไข้หวัด เพราะติดเชื้อครั้งแรก ในผู้ใหญ่จะรุนแรงเพราะติดเชื้อครั้งที่สอง

2. หากทัยป์นั้นแพร่ประจำถิ่นอยู่แล้ว โรคมักเป็นกับเด็ก ผู้ใหญ่ไม่ค่อยเป็น เพราะมีอัตราการติดเชื้อในประชากรสูง จึงมีภูมิต้านทานอยู่ ในเด็กเล็ก ๆ อาการไม่รุนแรง

3. หากมีการระบาดของไวรัสเด็งกี่อย่างน้อย 2 ทัยป์ในชุมชน จะเกิดโรค 2 รูปแบบคือ

3.1 หากระบาดไม่พร้อมกัน ประชากรส่วนใหญ่มีภูมิต้านทานเมื่อ ทัยป์ 2 ระบาดหลัง ทัยป์ 1 โรคจึงรุนแรงในผู้ใหญ่ แต่เด็กเล็กมักไม่รุนแรง

3.2 หากระบาดไปพร้อมกัน โรคจะดำเนินไปยาวนาน หลายลักษณะ ดังนี้

3.2.1 ถ้าอัตราติดเชื้อต่ำร้อยละ 5-6 ต่อปี อัตราการติดเชื้อซ้ำมักมีน้อย ถ้าโรคเป็นในผู้ใหญ่ จะไม่รุนแรง เพราะอาจเป็นการติดเชื้อครั้งแรกได้

3.2.2 หากอัตราติดเชื้อร้อยละ 15-20 ต่อปี พบประชากรที่มีการติดเชื้อสูงในเด็ก 3-5 ปี ในผู้ใหญ่เกือบไม่พบเลย

3.2.3 หากอัตราติดเชื้อร้อยละ 30-60 ต่อปี กลุ่มประชากรอายุน้อยมีการติดเชื้อซ้ำได้ในเวลาน้อยกว่า 6 เดือน ซึ่งเป็นเวลาไม่เหมาะสมในการเกิดอิมมูน โรคจึงไม่รุนแรง จึงพบโรคไข้เลือดออกน้อยในทุกกลุ่มอายุ

Copyright by Mahidol University

พยาธิกำเนิดและพยาธิสภาพของโรค

กลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคไวรัสเด็งกี่ ยังไม่มีใครทราบชัด (2,6,9,10, 26) แต่จากการสังเกตในลิง rhesus ที่ถูกฉีดเชื้อไวรัสเข้าใต้ผิวหนัง (6) พบเชื้อเด็งกี่แบ่งตัวเจริญที่ผิวหนังลิงอย่างรวดเร็ว ไวรัสที่เพิ่มจำนวนดังกล่าวจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง ซัยโตพลาสซึม ของเซลเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยต์ ไขกระดูก ม้าม ตับ ต่อมไธมัส และบริเวณ Payer's patches อย่างเร็วเช่นกัน ใน 12-24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบเชื้อในกระแสโลหิตของลิงด้วย ส่วนในคน ระยะมีเชื้อในกระแสเลือดมีไข้และอาการอื่น ๆ จะนานกว่าสัตว์ (6,10) ในท้ายระยะมีเชื้อในกระแสเลือดจะพบโมโนซัยต์ล่องลอยในกระแสเลือดนาน 1-2 วัน จึงเป็นระยะแพร่เชื้อสู่คนอื่นได้ (10)

จากอาการของไข้เด็งกี่ที่สำคัญ คือ การช็อก และมีเลือดออกในอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบทางเดินอาหาร (1,6-10,26,31,33) ซึ่งอาการทั้ง 2 อย่าง เชื่อว่ามาจากสาเหตุที่สำคัญทางพยาธิสรีรวิทยา 2 ประการด้วยกันคือ (21,25,26)

1. การเปลี่ยนแปลงของผนังเส้นเลือดฝอยทำให้มีรูรั่ว และเกิดการรั่วของพลาสมา ออกนอกกระแสเลือดเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลทำให้เลือดมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ค่า pulse pressure ลดต่ำลง จนเกิดอาการช็อก จากการสูญเสียพลาสมาออกนอกกระแสเลือดมาก

2. การเปลี่ยนแปลงของภาวะสมดุลในระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกาย จากการเปลี่ยนแปลงของผนังเส้นเลือดฝอยที่ทำให้พลาสมารั่วออกนอกเส้นเลือด จากภาวะเกล็ดเลือดแข็งตัว จึงเกิดภาวะเลือดไหลไม่หยุด ทำให้มีเลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายได้แก่ ผิวหนัง เนื้อเยื่อต่าง ๆ ระบบทางเดินอาหาร หัวใจ ปอด ตับ ไต และในสมอง ที่สำคัญก็คือการมีภาวะพลาสมาคั่งในช่องปอดและช่องท้องมากจนสูญเสียโปรตีนอัลบูมินไปจากกระแสเลือด

กลไกที่ทำให้ผนังเส้นเลือดฝอยมีการรั่วเพิ่มขึ้นยังไม่ทราบกันดี เพราะเมื่อตรวจดูพยาธิสภาพของผนังเลือดฝอยด้วยกล้องจุลทัศน์ทั้งกล้องชนิดธรรมดา และกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน ไม่พบว่ามีความผิดปกติ (52) รวมทั้งการช็อกและเลือดออกมากขึ้น เกิดในระยะเวลาเพียง 24-48 ชั่วโมง แล้วการดำเนินของโรคจึงกลับเป็นปกติอย่างรวดเร็ว (26) จึงน่าจะสันนิษฐานได้ว่ามีการหลั่งสารบางอย่างออกมา ซึ่งมีผลให้ผนังของเส้น

Copyright by Mahidol University

เลือดฝอยมีการรั่วเพิ่มขึ้นและเปราะแตกง่ายขึ้น สารนั้นอาจจะเกิดจากปฏิกริยาทางอิมมูนของร่างกายที่ร่างกายผู้ป่วยสร้างขึ้นภายหลังได้รับเชื้อไวรัสเด็งกี่

หลักฐานที่สนับสนุนว่าน่าจะมีปฏิกริยาทางอิมมูนเกิดขึ้น คือ (15,43,53)

1. ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรง มักจะเป็นผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ครั้งที่ 2 ที่ต่างชนิดกับครั้งแรก (secondary heterologous dengue virus infection) มีน้อยรายที่เกิดจากการติดเชื้อครั้งแรก (primary dengue virus infection) ซึ่งมีการพบในเด็กเล็กอายุน้อยกว่า 1 ปี

2. การสร้างแอนติบอดีย์ตอบสนองภายหลังการได้รับเชื้อ

จากการศึกษาของ Russel และคณะ (52) พบว่าในการติดเชื้อครั้งแรกร่างกายจะสร้างแอนติบอดีย์ชนิด อิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (IgM) ขึ้น ส่วนในผู้ป่วยติดเชื้อซ้ำมีอาการรุนแรงจนถึงช็อกนั้น ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีย์ต่อต้านเชื้อไวรัสเด็งกี่ในปริมาณสูง เป็นชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG)

ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงนั้น จะพบว่าระดับแอนติบอดีย์ชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี มีระดับสูงตั้งแต่ในระยะแรกของโรค ทั้งนี้เนื่องจากมีการสร้างแอนติบอดีย์ตอบสนองแบบ anamnestic อย่างรวดเร็ว

3. เชื้อไวรัสจะคงอยู่ในกระแสเลือดและอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายในระยะเวลาอันสั้นไม่เกิน 5 วัน หลังจากมีไข้ (21,43)

4. ระดับของคอมพลีเมนต์ลดลงในระยะที่มีการช็อก

จากการศึกษาของ วินัย สุวัตถี และคณะ กับ Russel และคณะ ปี พ.ศ. 2517 (1,10,26) ในเรื่องของคอมพลีเมนต์ชนิด C_3 และ C_4 ในน้ำเหลืองผู้ป่วยเพื่อยืนยันการติดเชื้อครั้งที่ 2 พบว่าระดับคอมพลีเมนต์ทั้ง 2 ชนิด ลดต่ำกว่าค่าปกติ (100-160 มก./100 มล.) ในวันที่ 4-7 ของโรคซึ่งเป็นระยะช็อกเนื่องจากถูกใช้ในปฏิกริยาอิมมูนคอมเพลกซ์

กลไกของการเกิดโรคสันนิษฐานว่ามาจาก

1. การหลั่งสาร mediator จากเซลโมโนซัยต์ ซึ่งเป็นเซลเม็ดเลือดขาวที่เชื้อไวรัสเด็งกี่จะเข้าไปแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากมาย ในระหว่างที่ผู้ป่วยกำลังมีไข้ (25) กลไกที่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยต์

Copyright by Mahidol University

เชื่อว่าเกิดจากการที่ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่จากการติดเชื้อครั้งแรกอยู่ในระดับต่ำ และมีการติดเชื้อซ้ำแต่เป็นเชื้อคนละทัยป์ กันกับครั้งแรก แอนติบอดีย์ดังกล่าวไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ แต่กลับทำให้ไวรัสเข้าไปในโดยเซลโมโนซัยต์ ง่ายขึ้น โดยไวรัสจะจับกับ IgG ที่เป็น enhancing antibody แล้วจับกับ FC-receptor บนผิวโมโนซัยต์ ไวรัสจึงเข้าไปเจริญเติบโตแบ่งตัวในเซลโมโนซัยต์มากขึ้น ทำให้เซลติดเชื้อได้ง่าย เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า enhancement (21,25,51) เซลดังกล่าวจึงกลายเป็นเป้าหมาย (target) ที่ทำให้เกิดขบวนการทำลายทางอิมมูน (25) เกิดการตายของเซลมากขึ้น ร่วมกับการตายเนื่องจากมีเชื้อไวรัสแบ่งตัวมากเกินไป เซลโมโนซัยต์ดังกล่าวจะหลั่งสารต่าง ๆ ออกมา ได้แก่ C_{3b}, ทรอมโบปลาสติน (thromboplastin), ลิวโคทริน (leukotrines) (25,26,43) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังหลอดเลือดฝอย เกิดการรั่วซึมมากขึ้นจนทำให้ผู้ป่วยมีอาการช็อกได้

2. การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์และการเกิดอิมมูนคอมเพลกซ์

หลังจากไข้ลดและเข้าสู่ระบบช็อค ไวรัสเด็งกี่จะออกจากเซลโมโนซัยต์และทำปฏิกริยากับแอนติบอดีย์ที่ร่างกายสร้างขึ้นมาอย่างรวดเร็ว(anamnestic response) เกิดเป็นอิมมูนคอมเพลกซ์จำนวนมาก ตามอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่

2.1 ไต จากการศึกษาของประสิทธิ์ ฟูตระกูล และคณะ (1) โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ พบ IgG และ C_3 คอมพลีเมนต์ที่เนื้อไต และ วิจิตร บุญพรรคนาวิก และคณะ (1) ก็พบอิมมูนคอมเพลกซ์ที่เนื้อไตด้วย

2.2 ผิวหนัง พบ IgG และคอมพลีเมนต์ เกาะตามผนังเส้นเลือดฝอยร้อยละ 25

2.3 เพลตเลต พบอิมมูนคอมเพลกซ์เกาะติดผนังเพลตเลต แต่ไม่พบ IgG ทำให้เพลตเลตถูกทำลาย และเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และเลือดออกในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย นอกจากนี้เมื่อเกล็ดเลือดถูกทำลายจะหลั่งสารซีโรโตนิน (serotonin) และ ฮีสตามีน (histamine) ออกมามีผลให้ผนังหลอดเลือดฝอยรั่วมากขึ้น (26)

2.4 เม็ดเลือดขาว ในช่วงอาการช็อก หรือวันไข้ลด พบอิมมูนคอมเพลกซ์เกาะตามผิวของ B-lymphocyte สูงสุด ซึ่งในการเกิดติดเชื้อครั้งที่ 2 นี้ เซลเม็ดเลือดขาวชนิด ฟาโกซัยต์ หรือ ลิมโพซัยต์ จะถูกกระตุ้นด้วยแอนติบอดีย์ชนิดต่างทัยป์กับการ

Copyright by Mahidol University

ติดเชื้อครั้งแรก หรือแอนติบอดีย์ชนิดทัยป์เดียวกัน แต่มีความเจือจางสูง (high dilution of monotypic) ทำให้มีการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวมากขึ้น เป็นผลให้เชื้อไวรัสที่อาศัยในเซลเม็ดเลือดขาวแพร่ขยายมากขึ้น สมศักดิ์ โล่ห์เลขา และคณะ ปี พ.ศ. 2519 พบว่า เซลเม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocyte จะมีการแบ่งตัวเป็น blast transformed cell จำนวนมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำ

จากปฏิกริยาระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีย์เกิดเป็นอิมมูนคอมเพลกซ์หลังการติดเชื้อซ้ำเป็นครั้งที่สองนั้น อิมมูนคอมเพลกซ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าวจะไปทำให้คอมพลีเมนต์ชนิด C_{3a} และ C_{5a} ถูกกระตุ้นให้มีการทำงานหลั่งสาร อนาฟัยแลท้อกซิน (Anaphylatoxin) ซึ่งมีผลทำให้กรานูลของเซลเม็ดเลือดขาวชนิด Mast cell แตกออก และหลั่งสารฮีสตามีน ซึ่งมีผลทำให้เพิ่มการไหลซึมผ่านเข้าออกของหลอดเลือดมากขึ้นยังผลให้พลาสมารั่วออกนอกกระแสเลือด จนทำให้เกิดอาการช็อกดังกล่าว (54) แต่ในการติดเชื้อเป็นครั้งแรกนั้น ไม่พบว่ามีอิมมูนคอมเพลกซ์เกิดขึ้น และในผู้ป่วยบางรายก็ไม่พบอิมมูนคอมเพลกซ์แม้ว่าจะติดเชื้อซ้ำก็ตาม นอกจากนี้ปริมาณของอิมมูนคอมเพล็กซ์ยังไม่สัมพันธ์กับอาการของโรคด้วย (26)

3. การเกิดปฏิกริยาอิมมูนชนิดพึ่งเซล (cell mediated immunity) เชื้อไวรัสเด็งกี่ที่เข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลโมโนซัยต์ และการสร้างแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ของร่างกาย จะมีผลไปกระตุ้น T delayed hypersensitivity cell เพื่อให้มาทำลายเซลโมโนซัยต์ ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่มากขึ้น ซึ่งพบว่ามีเซลลิมโฟซัยต์รูปร่างผิดปกติ ชนิด B cell (Blast cell) มากขึ้น T cell ดังกล่าวจะหลั่ง ลิมโฟไคน์ ชนิดต่าง ๆ ออกมา ซึ่งอาจเป็น mediators ที่สำคัญที่ทำให้ผนังหลอดเลือดฝอยรั่วมากขึ้น เพลตเลตถูกทำลายจนเกิดอาการช็อกและเลือดออกมากได้ (25)

จากการตรวจดูศพผู้ตายไข้เด็งกี่ ทั้งการดูด้วยตา ดูด้วยกล้องจุลทัศน์ และตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการนั้น พบพยาธิสภาพในทุกระบบของร่างกาย (1,6,7,9,10,36) ได้แก่ การมีเลือดออกในบริเวณผิวหนัง เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มหัวใจ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ ซึ่งในหัวใจนั้นพบจุดเลือดออกบริเวณผนังกั้นหัวใจห้องล่างซ้ายมาก(6) นอกจากนี้ก็มีเลือดออกในเนื้อปอด ต่อมหมวกไต ตับ ตับอ่อน ไต ต่อมใต้สมอง และเยื่อหุ้มสมอง (6,9,10)

Copyright by Mahidol University

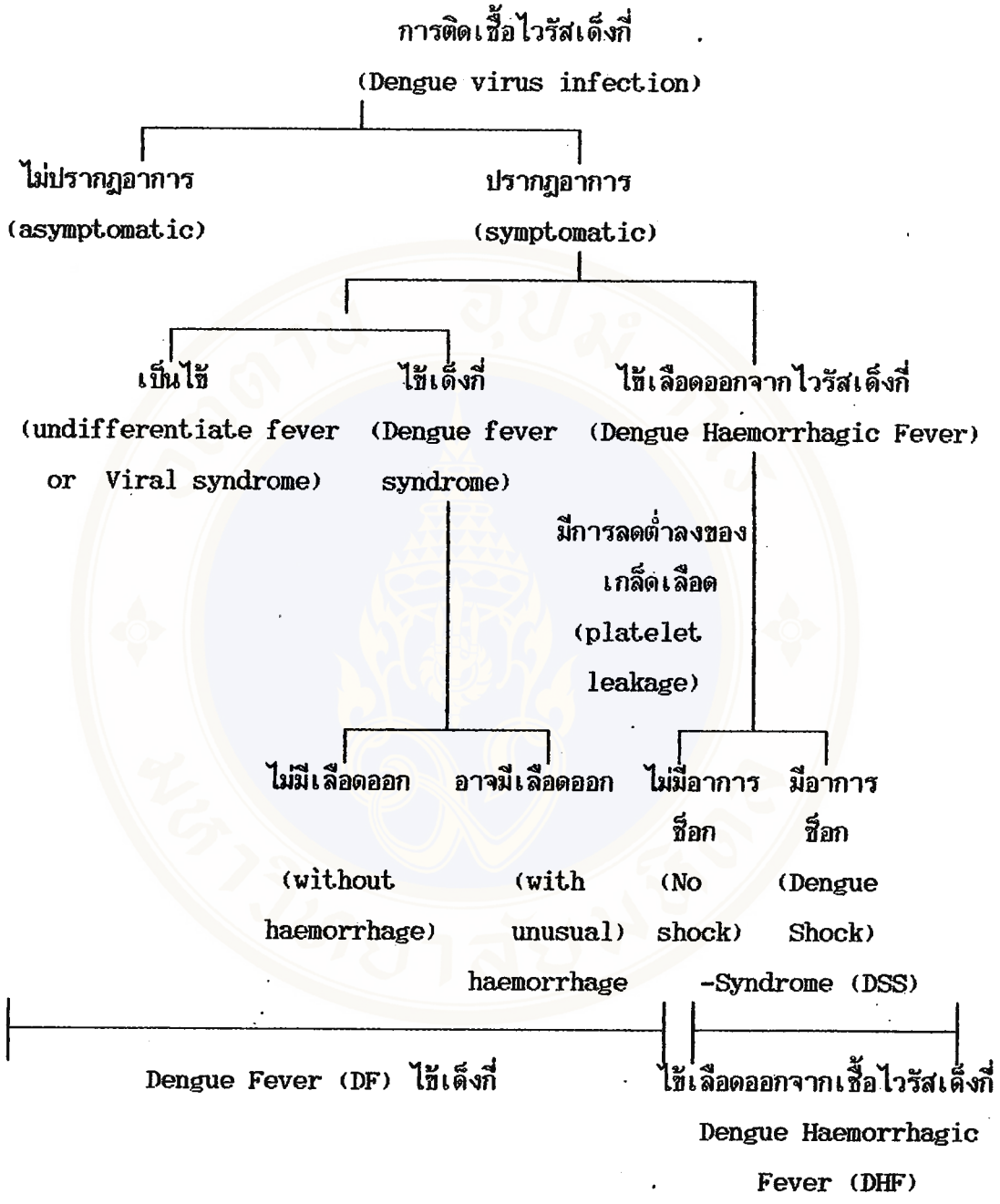
จากการดูด้วยกล้องจุลทัศน์นั้น พบว่า มีเซล B-lymphocyte เพิ่มจำนวนขึ้นในไขกระดูก ปอด ต่อมไธมัส ฯลฯ (6) เซลตับตาย มีไขมันแทรกและเซลบวมน้ำ (6,7)

ส่วนการตรวจเลือดพบว่า มีระดับโปแตสเซียมเพิ่มขึ้น (7)

อาการทางคลินิก

การติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ อาจทำให้เกิดอาการของโรคได้หลายระดับตั้งแต่อาการของไข้ไม่ทราบสาเหตุไปจนถึงเลือดออก และช็อกได้ดังแผนภาพที่ 2

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 2 อาการของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ : องค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2529 (36)

Copyright by Mahidol University

19779 | 10832397

อาการของโรคขึ้นกับอายุของผู้ป่วย คือ ในเด็กเล็กมาก ๆ มักมีอาการไม่รุนแรงมีเพียงไข้และมีจุดเลือดออกเท่านั้น ส่วนในเด็กโตหรือผู้ใหญ่มีอาการได้ตั้งแต่ไม่รุนแรง จนถึงรุนแรงคือ มีไข้สูง ปวดศีรษะมาก ปวดกระบอกตา ปวดกล้ามเนื้อ กระดูก ข้อต่อต่าง ๆ มีจุดเลือดออก ทำทูนิเกต์ ได้ผลบวก (มีจุดเลือด 20 จุดขึ้นไปต่อ 1 ตารางนิ้ว) มีภาวะเม็ดเลือดขาวปกติแต่เกล็ดเลือดต่ำ มักตายจากการมีเลือดออกมาก ได้แก่ อาเจียนเป็นเลือด เลือดออกในกระเพาะอาหาร ถ่ายปัสสาวะ อุจจาระเป็นเลือด หรือประจำเดือนไหลไม่หยุด เป็นต้น

Haemorrhagic Fever ซึ่งมีสาเหตุจาก ชิกุนกุนยาไวรัส พบในไทยเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น (1)

Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) พบทั่วไปในแถบเอเชีย มีอาการทางคลินิค 4 อย่าง คือ ไข้สูง มีผื่น หรือจุดเลือดออก ตลอดจนมีเลือดออก ตับโต และระบบไหลเวียนโลหิตล้มเหลวมี 2 กลุ่มคือ

1. **DHF without shock** มีคำจำกัดความดังนี้

1.1 ไข้สูง 40-41° c เกิดอย่างรวดเร็วนาน 2-7 วัน แล้วลดลงสู่ภาวะปกติหรือต่ำกว่าปกติ

1.2 มีเลือดออกตามร่างกายชัดเจน ทดสอบทูนิเกต์ ให้ผลบวก

1.3 มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ คือ น้อยกว่า หรือเท่ากับ 100,000/ลูกบาศก์มิลลิเมตร

1.4 มีความเข้มข้นของเลือดสูงกว่าปกติ โดยมีค่า ฮีมาโตคริต เพิ่มขึ้นจากปกติ 20% หรือมากกว่า

2. **DHF with shock หรือ Dengue Shock Syndrome (DSS)**
มีคำจำกัดความดังนี้

2.1 มีอาการทั้งหมดของข้อ 1 และ

2.2 ช็อก มีค่า pulse pressure น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตรปรอท (2.7 กิโลปาสกาล) มีเหงื่อออก ตัวเย็นชื้น และหมดสติ

นอกจากอาการทั้ง 4 ข้อแล้ว ที่พบเสมอและสำคัญคือ ภาวะตับโต คลำตับได้ต่ำกว่าระดับชายโครง 2-4 เซนติเมตร พบในเด็กไทยที่มีอาการช็อกถึงร้อยละ 90-96

ระยะวิกฤติช่วงที่มีช็อก คือ 12-24 ชั่วโมง ซึ่งผู้ป่วยจะดีขึ้นหรือเสียชีวิตก็อยู่ในช่วงนี้

Copyright by Mahidol University

การแบ่งระดับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ แบ่งได้ 4 ระดับ ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (36) ดังนี้

เกรด 1 มีไข้ แต่อาการอื่นไม่ชัดเจน นอกจากทดสอบ ทูนิเกต์ ได้ผลบวก

เกรด 2 มีอาการของเกรด 1 ร่วมกับการมีเลือดออกเองตามผิวหนังเป็นปื้น มีเลือดออกตามไรฟัน

เกรด 3 ระบบไหลเวียนโลหิตล้มเหลว ชีพจรเต้นเบาเร็ว มีค่า pulse pressure แคบ (≤ 20 มิลลิเมตรปรอท) มีค่าความดันโลหิตต่ำกว่า 90/60 มิลลิเมตรปรอท และมีอาการแสดงอื่นร่วมได้แก่ ผิวหนังเย็นชืด ชื้น กระสับกระส่าย และหมดสติ

เกรด 4 มีอาการช็อก ไม่สามารถคลำชีพจร หรือวัดความดันโลหิตได้

เกรด 1 - เกรด 2 เป็นอาการของ DHF without shock

เกรด 3 - เกรด 4 เป็นอาการของ DHF with shock (DSS)

การวินิจฉัยเพื่อแยกโรค DHF และ DSS ควรรีบทำในวันที่ 3-4 ของโรคก่อนการช็อก โดยตรวจดูระดับเกล็ดเลือด ความเข้มข้นของเลือด และระมัดระวังการติดเชื้ออื่นแทรก เช่นเชื้อแบคทีเรีย (21)

การควบคุมและการป้องกันโรค

ปัจจุบัน เน้นในเรื่องของการกำจัดยุงลาย ทั้งการทำลายแหล่งเพาะพันธุ์หรือทำลายลูกน้ำยุงลาย ตลอดจนการพ่นหมอกควัน หรือน้ำยาเคมี เพื่อทำลายตัวเต็มวัยของยุง (20,34,40) โดยอาศัยกลวิธีหลักขององค์การอนามัยโลก 4 ประการ (21) ดังนี้

1. การนำฤดูกาลมาใช้ประโยชน์ โดยควบคุมยุงในฤดูสงบ เพื่อตัดการกระจายของเชื้อไวรัส
2. ตัดวงจรการแพร่เชื้อ โดยลดความชุกชุมของยุง ให้อยู่ในระดับต่ำสุด
3. ควบคุมยุงอย่างเข้มงวด ในบริเวณที่แพร่เชื้อง่าย เช่น โรงเรียน โรงพยาบาล
4. ควบคุมยุงอย่างถาวรในบริเวณที่เสี่ยง ได้แก่ ชุมชนที่อยู่อาศัยหนาแน่น

Copyright by Mahidol University

ในการป้องกันและควบคุมโรคโดยการกำจัดยุง **Aedes aegypti** นั้น แม้ว่าจะได้ผลดี แต่การกำจัดยุงก็เป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ดังนั้น ในปัจจุบันจึงได้มีการค้นคิดถึงวิธีการป้องกันโรคที่ดีกว่านี้ โดยการพัฒนาด้านวัคซีน และได้ทดลองใช้วัคซีนดังกล่าวขึ้นที่จังหวัดลำพูน เมื่อปี พ.ศ. 2528 (55) โดยใช้วัคซีนไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ทัยป์ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจในทัยป์ 1,2 และ 4 ส่วน ทัยป์ 3 กำลังปรับปรุงอยู่และมีโครงการที่จะรวมทั้ง 4 ทัยป์ เข้าเป็นเข็มเดียวกัน

แม้ว่าจะได้มีการทดลองใช้วัคซีนที่จังหวัดลำพูนมา 4 ปีแล้วก็ตาม แต่ยังไม่มีผู้ใดได้ทำการศึกษาทางด้านทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีอยู่ในจังหวัดลำพูนเลยว่าในการระบาดแต่ละคราวนั้นเป็นการระบาดจากเนื่องจากไวรัสทัยป์ใด

ผลงานที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาโดยวิธีการเจาะเลือดตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการเฝ้าระวังโรคอย่างหนึ่งตามวิธีขององค์การอนามัยโลก (21) ที่ได้เสนอไว้นั้น กระทำกันอย่างกว้างขวางทั้งต่างประเทศและในประเทศไทยเอง เพื่อให้ทราบถึงทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดอยู่ในบริเวณพื้นที่ที่ศึกษา โดยเริ่มครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2505-2507 จากการศึกษาของ Halstead S.B. และคณะ (56) ทำการแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่จากซีรั่มของผู้ตาย 103 ราย แยกได้ไวรัส 4 ราย พบว่าเป็นไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 2 3 ราย และ ทัยป์ 1 อีก 1 ราย ขณะเดียวกันผู้ทำการศึกษาชุดนี้ได้ศึกษาแยก ทัยป์ จากผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานครด้วย (11,56) พบว่า ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำจะแยกไวรัสเด็งกี่ได้ทั้งหมด 84 ราย เป็น ทัยป์ 1 10 ราย ทัยป์ 2 52 ราย ทัยป์ 3 11 ราย ทัยป์ 4 9 ราย และจำแนกไม่ได้อีก 2 ราย ส่วนในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรกนั้น แยกได้ไวรัสเด็งกี่ทั้งสิ้น 108 ราย เป็นทัยป์ 1 34 ราย ทัยป์ 2 36 ราย ทัยป์ 3 33 ราย ทัยป์ 4 3 ราย และจำแนกทัยป์ไม่ได้อีก 2 ราย

Copyright by Mahidol University

ระหว่างปี พ.ศ. 2505-2526 อนันต์ นิสาลักษณ์ และคณะ (57) ได้ทำการศึกษาเพื่อแยกทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่จากโรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพมหานคร พบว่าแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ที่ 2 มากที่สุด ถึงร้อยละ 62.1 เด็งกี่ทัยป์ 1 ร้อยละ 19.2 เด็งกี่ทัยป์ 3 ร้อยละ 13.0 และเด็งกี่ทัยป์ 4 พบน้อยที่สุดเพียงร้อยละ 5.7 โดยพบว่าทัยป์ที่ 2 มีการระบาดแทบทุกปีที่ทำการศึกษา และ ทัยป์ ที่ 4 พบในช่วงหกปีหลังที่ทำการศึกษา โดยก่อนหน้านี้ไม่พบว่าแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 4 เลย ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาที่เปอร์โตริโก สหรัฐอเมริกาในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า อัตราส่วนที่พบเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ ที่ 2 และทัยป์ ที่ 3 มีเท่า ๆ กัน และไม่พบทัยป์ ที่ 1 และ 4 ในช่วง 15 ปีแรกของการศึกษาเลยกลับมาพบในระยะหลัง ๆ เท่านั้น ซึ่งก็คล้ายคลึงกับของประเทศไทย

ปี พ.ศ. 2520-2522 จากการศึกษาในผู้ป่วย 104 ราย ที่มีการเจาะเลือดตรวจทั้งในระยะ acute และระยะ convalescent ของสถานีอนามัยในเมือง Ulu Langat ประเทศมาเลเซีย พบว่าเป็นผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจริง 3 ราย และแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 3 1 ราย (58)

ในช่วงเวลาไล่เลี่ยกันนี้ คือ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520-2525 สมภพ อนันทริก และคณะ (59) ทำการศึกษาการเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ในประเทศไทย โดยการเจาะเลือดตรวจ พบว่า ระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 2 และ 4 สูงกว่า ทัยป์อื่น ซึ่งคาดว่าคงเป็นการระบาดที่มาจากทั้ง 2 ทัยป์ นี้ ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว

Igarashi A. และคณะ (60) ทำการศึกษาที่จังหวัดเชียงใหม่ในปี พ.ศ. 2525 เพื่อแยกเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ และเชื้อไวรัสเด็งกี่ในผู้ป่วย ผลการศึกษาพบว่าจากการเพาะเลี้ยงในเซลยุง (C6/36) สามารถแยก เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1 ได้ 8 ราย, ทัยป์ 2 2 ราย และ ทัยป์ 3 ได้ 1 ราย โดย 9 ราย มาจากผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกบ่งว่าเป็นผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกจริง 1 ราย มาจากผู้ป่วยที่แพทย์วินิจฉัยจากอาการว่าเป็นโรคไข้สมองอักเสบ และอีก 1 ราย มาจากผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบ

Copyright by Mahidol University

ปี พ.ศ. 2523-2526 Suharyono W. และ Lubis I. (61) ทำการศึกษาการเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่าจากการแยกทัยป์ ของไวรัสในผู้ป่วย 162 ราย แยกได้ทัยป์ 3 มากที่สุด ถึง 73 ราย หรือร้อยละ 45.06 รองลงมาคือ ทัยป์ 2 จำนวน 57 ราย หรือร้อยละ 35.19 ทัยป์ 3 ได้ 28 ราย หรือร้อยละ 17.28 และพบ ทัยป์ 4 น้อยที่สุด เพียง 4 ราย หรือร้อยละ 2.47 และสรุปผลการศึกษาได้ว่า เชื้อไวรัสทั้ง 4 ทัยป์ มีการระบาดอยู่ในประเทศอินโดนีเซียโดยเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 3 และ 2 มีการระบาดมากกว่าทัยป์ อื่น ๆ และทัยป์ 3 ก่อให้เกิดอาการรุนแรงมากที่สุด

ปี พ.ศ. 2523-2527 มีการศึกษาในประเทศไทยอีก ที่จังหวัดระยอง โดย นาทีรัตน์ สังขวิภา สุนทรี โรจนสุพจน์ และคณะ (62,63) ทำการศึกษาในเขตอำเภอเมืองระยอง และตำบลรอบนอก โดยการแยกเชื้อจากซีรั่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก/เด็งกี่ช็อกซินโครมตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก และแยกเชื้อจากยุง **Aedes aegypti** ซึ่งเป็นยุงนำโรค ผลการศึกษาพบว่าจากจำนวนซีรั่มผู้ป่วย 360 ราย แยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ 50 ราย เป็น ทัยป์ 2 จำนวน 23 ราย ทัยป์ 1 จำนวน 16 ราย ที่เหลืออีก 11 ราย พิสูจน์ได้ว่าเป็น ทัยป์ 3 จำนวน 5 ราย และ ทัยป์ 4 จำนวน 6 ราย ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีไวรัสเด็งกี่ทุก ทัยป์ แพร่กระจายในพื้นที่จังหวัดระยอง โดยในปี พ.ศ. 2523 ซึ่งเป็นปีแรกของการศึกษานั้น พบว่า ทำการแยกเชื้อไวรัส ทัยป์ 2 ได้มากที่สุด ปีต่อมาพบทัยป์ 1 มากที่สุด ส่วนในปีหลังแยกได้ทัยป์ 3 และ ทัยป์ 4 ซึ่งเมื่อดูทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้กับระดับความรุนแรงของอาการของโรค พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการช็อก (เกรด 3 - เกรด 4) แยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 2 มากที่สุด รองลงมาเป็น ทัยป์ 4 และ 3 ตามลำดับ ไม่พบอาการรุนแรงในผู้ป่วยที่แยกได้เชื้อไวรัส ทัยป์ 1 แต่กลับพบอาการไม่รุนแรง เพียงเกรด 1 หรือ 2 เท่านั้น อัตราการแยกเชื้อไวรัสได้เฉลี่ยตลอดระยะเวลา 5 ปี ที่ทำการศึกษาคิดเป็นร้อยละ 18.7 อัตราการแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ในช่วงเวลา 1-4 วัน แรกของการมีไข้มีสูงถึงร้อยละ 76 พบว่า ยิ่งเจาะเลือดหลังวันมีไข้ช้าไปเท่าใดโอกาสที่จะตรวจแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ก็จะลดลงยิ่งขึ้น ส่วนการแยกเชื้อไวรัสจากยุง **Aedes aegypti** เพศเมีย ในปี พ.ศ. 2527 ทั้งหมด 762 พูล ๆ ละ 20 ตัว พบว่าแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 1 ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ซึ่งต่างทัยป์ กับที่พบเชื้อไวรัสซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในปีเดียวกัน อาจเป็นไปได้ว่ามีเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 1

Copyright by Mahidol University

แพร่อยู่มากกว่าชนิดอื่น ๆ ก็ได้ แต่ไม่รุนแรงพอที่จะก่อให้เกิดพยาธิสภาพในคน จึงแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 1 นี้ไม่พบในคน เมื่อ ปี พ.ศ. 2527 ดังกล่าว

นาทีรัตน์ สังขวิภา และคณะ (63) สรุปผลการศึกษาที่จังหวัดระยองว่าการติดเชื้อเด็งกี่ ทัยป์ 1,3,4 ตามด้วยทัยป์ 2 นั้น มีกว้างขวางในหมู่ประชากรของประเทศ และรุนแรงที่สุด เช่นดังตัวอย่าง เมื่อ ปี พ.ศ. 2524 (63) พบว่ามีระบาดก่อนและอีก 4 ปีถัดมา มีการระบาดของทัยป์ 2 ซึ่งทำให้มีผู้ป่วยมาก ผู้ป่วยที่มีอิมมูนจากการติดเชื้อครั้งแรก เป็นทัยป์ 1 จะเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงในการติดเชื้อซ้ำมากกว่าการมีอิมมูนต่อทัยป์ อื่น

ผลการศึกษาที่ระยองนี้คล้ายกับการศึกษาของ อนันต์ นิสาลักษณ์ และคณะ (64) ซึ่งศึกษาที่โรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2505-2526 โดยพบทัยป์ 2 ในปี พ.ศ. 2523 ถึงร้อยละ 62.1 และพบ ทัยป์ 1 รองลงมาคือ ร้อยละ 19.2 และลดน้อยลงจนไม่พบเลยในปี พ.ศ. 2526 แต่กลับพบ ทัยป์ 3 และ 4 แทน

การศึกษาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าทัยป์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งจำแนกตามระดับความรุนแรงของโรค และปฏิกริยาอิมมูนนั้นจะแยกได้เชื้อเด็งกี่ ทัยป์ 2 มากที่สุด ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการช็อก (เกรด 3 หรือ 4) รองลงมาเป็นทัยป์ 4 หรือ 3 ตามลำดับ แต่จะไม่พบ ทัยป์ 1 เลยในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง กลับพบในผู้ป่วยอาการไม่รุนแรง (เกรด 1 หรือ 2) แทน ซึ่งสนับสนุนการศึกษาของ Halstead และคณะ เมื่อ ปี พ.ศ. 2513 (10) ว่าการติดเชื้อซ้ำด้วย ทัยป์ 2 ก่อให้เกิดอาการรุนแรงที่สุด แต่ในปัจจุบันนี้กลับพบว่าไม่จำเป็นต้องติดเชื้อด้วยทัยป์ 2 เท่านั้น ทุกทัยป์ที่ติดเชื้อซ้ำสามารถทำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงได้ (21)

นอกจากนี้โอกาสการแยกเชื้อไวรัสในผู้ป่วยที่ติดเชื้อครั้งแรกจะสูงกว่าผู้ที่ติดเชื้อซ้ำ และสามารถแยกเชื้อไวรัสได้มาก ในระหว่างวันที่ 2-5 ของการป่วย โดยเฉพาะในวันที่ 3 พบถึงร้อยละ 34 (64)

Copyright by Mahidol University

Donald S. Burke และคณะ (11) ศึกษาการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเด็กนักเรียน อายุ 4-16 ปี ของกรุงเทพมหานคร ระหว่าง ปี พ.ศ. 2523-2524 เพื่อดูระดับของแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ ด้วยวิธี HI และ NT พบว่าร้อยละ 50 ของเด็กดังกล่าวมีการติดเชื้อ และมีอิมมูนต่อเชื้อเด็งกี่มาก่อนอย่างน้อย 1 ทัยป์ ตั้งแต่อายุ 7 ปี เป็นต้นมา และเชื่อว่ายิ่งอายุน้อย ยิ่งเสี่ยงต่อการติดเชื้อเด็งกี่ ทัยป์ ใหม่ยิ่งขึ้น โดยพบว่าอายุที่เสี่ยงที่สุด คือ 4-6 ปี พบถึงร้อยละ 100 รองลงมาคือ อายุ 7-9 ปี พบร้อยละ 48 ทัยป์ 2 ร้อยละ 41 และ ทัยป์ 4 ร้อยละ 11 แต่ไม่มี ทัยป์ 3 เลย ซึ่งผลการตรวจดังกล่าวสอดคล้องกับการแยกเชื้อจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลเด็กในปีเดียวกัน คือ พบ ทัยป์ 1 ร้อยละ 58 ทัยป์ 2 ร้อยละ 35 ทัยป์ 3 ร้อยละ 5 และ ทัยป์ 4 ร้อยละ 1 จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่า เชื้อไวรัสเด็งกี่ที่เป็นปัญหาในกรุงเทพมหานครในปีนั้น คือ ทัยป์ 1 และ 2 ซึ่งมีถึงร้อยละ 90

Igarashi A. และคณะ (65) ทำการศึกษาที่เมืองจาการ์ตา ประเทศอินโดนีเซีย เมื่อ ปี พ.ศ. 2524-2525 โดยแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ และผู้ป่วยด้วยไข้ไม่ทราบสาเหตุ ผลการศึกษาพบว่า ในปี พ.ศ. 2524 นั้นสามารถแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยด้วยไข้ไม่ทราบสาเหตุ 20 ราย จาก ทั้งหมด 99 ราย พิสูจน์ได้ว่าเป็น ทัยป์ 1 จำนวน 2 ราย ทัยป์ 2 จำนวน 7 ราย ทัยป์ 3 จำนวน 3 ราย และพิสูจน์ ทัยป์ ไม่ได้อีก 8 ราย และพบว่าในผู้ป่วยที่ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ ระบุว่าเป็นผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจริง 10 ราย ไม่สามารถทำการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ ส่วนในปี พ.ศ. 2525 พบว่าแยก ทัยป์ 3 ได้ 2 รายจากผู้ป่วยด้วยไข้ไม่ทราบสาเหตุ 57 ราย สรุปผลการศึกษาได้ว่าในผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง เพียงเกรด 1 คือมีไข้ไม่ทราบสาเหตุก็สามารถแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสได้ ดังนั้น ในการเฝ้าระวังโรคในแหล่งที่มีการระบาดของโรคไข้เลือดออกมาก ควรให้ความสนใจต่อผู้ป่วยที่มีไข้ไม่ทราบสาเหตุด้วย เพราะส่วนหนึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ดังกล่าว

Tissa Vitarana และคณะ (66) ทำการศึกษาในเขตที่มีการระบาดของโรคไข้เลือดออกต่ำ ในประเทศศรีลังกา เมื่อ ปี พ.ศ. 2524 - 2526 พบว่าแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 ได้มากที่สุด 16 ราย รองลงมาคือ ทัยป์ 3 จำนวน 6 ราย และ

Copyright by Mahidol University

ทัยป์ 1 จำนวน 5 ราย แต่ไม่พบ ทัยป์ 4 เลย และพบว่าเป็นการติดเชื้อชนิดปฐมภูมิ 8 ราย จากจำนวนทั้งหมด 27 ราย

ในปี พ.ศ. 2525 Narazizah Mohd Taib และคณะ (67) ทำการศึกษาในโรงพยาบาลของมหาวิทยาลัยในประเทศมาเลเซีย สรุปผลจากการศึกษาได้ว่าทำการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยทั้งหมด 511 ราย ได้ผลบวก 30 ราย คิดเป็นอัตราการแยกทัยป์ได้ร้อยละ 5.9 โดยแยก ทัยป์ 1 ได้ 7 ราย ทัยป์ 2 ได้ 5 ราย และ ทัยป์ 3 ได้ 9 ราย ไม่พบ ทัยป์ 4 เลย และมีอีก 9 ราย ที่สรุปไม่ได้ว่าเป็นเด็งกี่ ทัยป์ ใด ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการทางคลินิคที่พบบ่อยคือ มีไข้ มีจุดเลือดออก ตามร่างกาย และตรวจเลือดมีภาวะเพลตเลตต่ำทดสอบทูนิเกต์ในเด็กได้ผลบวกมากกว่าในผู้ใหญ่ ประมาณ 4 เท่า อายุของผู้ป่วยที่พบมากที่สุด คือ 10-24 ปี ซึ่งพบถึง ร้อยละ 50

ใน พ.ศ. 2528 - 2529 Thelma E. Tupasi และคณะ (68) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคกับทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้ในฟิลิปินส์ พบว่าจากการตรวจยืนยันทั้งโดยวิธีทางซีโรโลยี่ โดยการทำ HI Test และวิธีพิสูจน์แยกเชื้อไวรัสได้ผลบวก 125 รายจากจำนวนทั้งหมด 203 ราย คิดเป็นร้อยละ 62.0 ซึ่งในจำนวน 125 รายนี้ เป็นโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ (DHF) 77 ราย ที่เหลืออีก 48 รายเป็นไข้เด็งกี่ (DF) สรุปผลการศึกษาได้ว่า พบเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 มากที่สุด 17 ราย รองลงมาคือ ทัยป์ 3 จำนวน 13 ราย ทัยป์ 1 จำนวน 6 ราย และ ทัยป์ 4 จำนวน 3 ราย ส่วนอีก 32 ราย ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสได้ โดยคิดจากจำนวนซีรัมผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ (DHF) ทั้งหมด 71 ราย และผู้ป่วยส่วนใหญ่ถึงร้อยละ 69 มีอายุระหว่าง 1-9 ปี ไม่มีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงถึงเกรด 4 เลย พบอาการอยู่ในเกรด 1-2 มากที่สุดถึงร้อยละ 91.30 อาการส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ มีไข้ ทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก ค่าฮีมาโตคริตเพิ่ม และเพลตเลตต่ำกว่า 100,000/มิลลิลิตร ทุกรายที่มาตรวจ

ปี พ.ศ. 2530 Do Quang Ha และคณะ (69) ศึกษาการระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศเวียตนาม พบว่าทำการแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 ได้มากที่สุด และพบผู้ป่วยมากที่สุดในช่วงอายุ 5-9 ปี เพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยมีอัตราส่วน 1.32:1 และอาการที่ตรวจพบมากที่สุดคือ มีไข้ ทดสอบทูนิเกต์ให้ผลบวก พบถึง ร้อยละ

Copyright by Mahidol University

90 รองลงมาคืออาการคลื่นไส้อาเจียนพบร้อยละ 70 มี จุดเลือดออก ตามผิวหนังร้อยละ 60 และตรวจพบตับโตถึงร้อยละ 58 ผู้ป่วย 7 ราย ใน 24 ราย มีอาการรุนแรง เกรด 3-4 และเสียชีวิตภายหลังการรักษา 2 ราย ซึ่งจากทั้ง 24 รายนี้ แยกเชื้อไวรัสได้ ทัยป์ 2 ทั้งหมด จึงสรุปผลการศึกษาว่า เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 มีความรุนแรงและระบาดมากที่สุดในเวียตนาม ในปี พ.ศ. 2530

ปี พ.ศ. 2530 - 2532 สุชี ยกส้าน และคณะ (70) ทำการศึกษาการแยกทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามาธิบดี พบว่าใน ปี พ.ศ. 2530 แยกได้ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ 36 ราย จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 333 ราย และพบว่ามีปริมาณไวรัสอยู่จริงแต่สรุปไม่ได้ว่าเป็น ทัยป์ ใดอีก 6 ราย คิดเป็นอัตราการแยกทัยป์ ได้ร้อยละ 10.81 โดยแยกได้ ทัยป์ 3 ถึง 31 ราย หรือร้อยละ 86.11 และทัยป์ 2 จำนวน 5 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 13.89 ส่วนในปีถัดมา คือ ปี พ.ศ. 2531 แยก ทัยป์ ได้ทั้งหมด 12 ราย จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 88 ราย และสรุปแยก ทัยป์ ไม่ได้อีก 1 ราย คิดเป็นอัตราการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ร้อยละ 13.63 โดยแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 ได้ 6 ราย หรือร้อยละ 50.0 ทัยป์ 3 ได้ 5 ราย หรือร้อยละ 41.67 และ ทัยป์ 1 ได้ 1 ราย หรือร้อยละ 8.33 ซึ่งอัตราการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ จะเพิ่มขึ้นกว่าในปีแรกร้อยละ 2.82 เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ ที่ 3 มีบทบาทมากในการระบาดเมื่อปี พ.ศ. 2530 และในปี พ.ศ. 2531 ก็ยังคงพบว่ามี ทัยป์ 3 อยู่จำนวนไล่เลี่ยกับ ทัยป์ 2

สำหรับผลในปี พ.ศ. 2532 นั้น พบว่า แยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยโรงพยาบาลรามาธิบดีได้ 7 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 70 ราย สรุปแยก ทัยป์ ไม่ได้ว่าเป็น ทัยป์ ใดอีก 7 ราย คิดเป็นอัตราการแยก ทัยป์ ของไวรัสได้ร้อยละ 7.14 โดยแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 ได้ 4 ราย หรือร้อยละ 57.14 และ ทัยป์ 3 ได้ 2 ราย หรือร้อยละ 28.57 และ ทัยป์ ที่ 1 ได้ 1 ราย หรือร้อยละ 14.29

ผู้ป่วยในช่วง 2 ปีแรกที่ทำการศึกษา มีร้อยละ 80 ได้รับการเจาะเลือดตรวจไม่เกินวันที่ 4 ของโรค

Copyright by Mahidol University

จากผลการศึกษาและงานวิจัยต่าง ๆ เหล่านี้ แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ทัยป์ แตกต่างกันไป ตามแต่ละเวลาและสถานที่ การตรวจแยกเชื้อไวรัสจากผู้ป่วย ด้วยวิธีการทำปฏิกริยาทางซีรั่ม หรือการเพาะเชื้อจากยุง ตลอดจนการจำแนกชนิดของไวรัสว่าเป็น ทัยป์ ใดนั้น (62) เป็นวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญที่จะช่วยตัดสินว่าในแต่ละพื้นที่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ ใดระบาดอยู่บ้าง จังหวัดลำพูนเป็นจังหวัดหนึ่งที่ควรได้มีการศึกษาถึง ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ว่ามีกี่ ทัยป์ ที่อำเภอใดบ้าง และเกิดในกลุ่มคนอายุเท่าใด เพศไหนมากน้อยกว่ากัน และ ทัยป์ ไหนทำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงที่สุด ทั้งนี้ก็เพื่อเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของจังหวัดลำพูน เพื่อจะได้ทราบสถานการณ์และความเป็นไปของโรคได้ก่อนหน้าการระบาด และจะได้หามาตรการต่าง ๆ มาใช้เพื่อการควบคุมและป้องกันไม่ให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น รวมทั้งจะได้มีการเตรียมการทางด้านบุคลากรทางการแพทย์ตลอดจนอุปกรณ์ที่จะเป็นในการรักษาพยาบาลไว้ให้พร้อมและเพียงพอต่อจำนวนผู้ป่วยที่คาดว่าจะเกิดขึ้นตามการเปลี่ยนแปลง ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดในจังหวัดลำพูนต่อไป

Copyright by Mahidol University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีในการวิจัย

การวิจัยนี้ เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Research) โดยการเจาะเลือดสำรวจ (Seroepidemiological Survey) เก็บข้อมูลจากประวัติของผู้ป่วยร่วมกับข้อมูลจากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

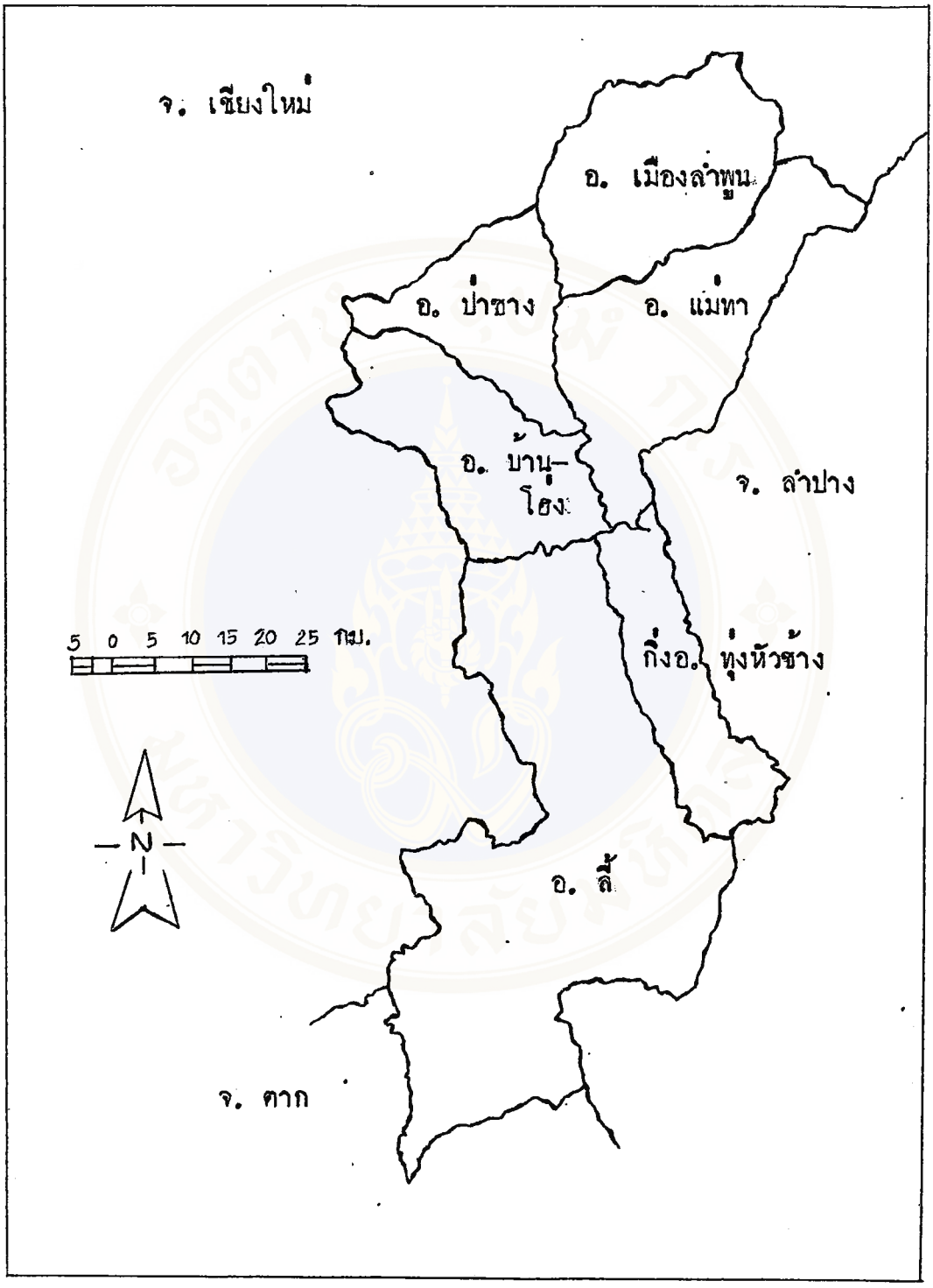
พื้นที่ที่ทำการศึกษา

โรงพยาบาลชุมชนประจำอำเภอต่าง ๆ ของจังหวัดลำพูน และโรงพยาบาลประจำจังหวัดลำพูน รวมทั้งสิ้น 6 โรงพยาบาล ซึ่งให้บริการรับการรักษาแก่ประชาชนทั้งจังหวัด

จังหวัดลำพูนตั้งอยู่ในภาคเหนือของประเทศไทย มีอาณาเขตติดต่อกับจังหวัดเชียงใหม่ทางด้านเหนือ และด้านตะวันตก จังหวัดลำปางทางด้านตะวันออก และจังหวัดตากทางด้านใต้ มีพื้นที่ทั้งหมด 4,506 ตารางกิโลเมตร (71) มีจำนวนประชากรทั้งหมดเมื่อกลางปี พ.ศ. 2531 (วันที่ 1 กรกฎาคม 2531) 409,357 คน (72)

จังหวัดลำพูน มีทั้งหมด 5 อำเภอ และอีก 1 กิ่งอำเภอ ได้แก่ อำเภอเมืองลำพูน อำเภอป่าซาง อำเภอบ้านโฮ่ง อำเภอลี้ อำเภอแม่ทา และกิ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง (71) ดังแสดงในภาพที่ 3

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 3 แสดงจังหวัดลำพูน และอาณาเขตติดต่อ

Copyright by Mahidol University

ประชากร*

กลุ่มประชากรทั้งหมดที่อาศัยอยู่ในจังหวัดลำพูน เมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2531 มีจำนวน 409,357 คน จำแนกตามอายุและเพศดังนี้

อายุ (ปี)	เพศ		รวม
	ชาย	หญิง	
0–4	24302	23313	47615
5–9	24150	23496	47646
10–14	23758	22709	46467
15–19	23600	22411	46011
20^{+}	129123	112495	221618
รวม	204933	204424	409357

และจำแนกตามอำเภอที่อยู่ดังนี้

อำเภอ	จำนวนประชากร
เมืองลำพูน	146,414
แม่ทา	40,923
ป่าซาง	85,231
บ้านโฮ่ง	45,923
ลี้	59,278
กี่งทุ่งหัวช้าง	16,861
รวม	409,357

*ที่มา: งานเดินสะพัด สำนักงานสถิติแห่งชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี

Copyright by Mahidol University

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดที่แพทย์ได้ทำการตรวจวินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มารับการตรวจและรักษา ณ แผนกผู้ป่วยนอก และผู้ป่วยในที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลชุมชนทุกอำเภอ กับในโรงพยาบาลประจำจังหวัดลำพูน ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา คือ ตั้งแต่ 1 เมษายน 2532 - 31 มีนาคม 2533

วิธีการเลือกกลุ่มตัวอย่าง

เป็นการเลือกแบบเฉพาะเจาะจงเอาแต่ผู้ป่วยที่แพทย์ตรวจวินิจฉัยจากอาการและอาการแสดงว่าเป็นโรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งมารับการตรวจและรักษา ณ โรงพยาบาลทุกโรง ทั้งแผนกผู้ป่วยนอก และแผนกผู้ป่วยใน

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ ภูมิลำเนาที่อยู่ได้จาก OPD Card ระเบียนประวัติผู้ป่วยเปรียบเทียบกับใบส่งเลือดตรวจทางไวรัสวิทยา (ภาคผนวก ก)

2. ข้อมูลการตรวจร่างกายผู้ป่วย ตลอดจนผลทางห้องปฏิบัติการที่ตรวจเพื่อสนับสนุนการวินิจฉัยโรคของแพทย์ ได้จากการกรอกผลของแพทย์ผู้ทำการตรวจและรักษาในใบส่งเลือดตรวจทางไวรัสวิทยา

3. การเจาะเลือดจากผู้ป่วยส่งตรวจหาเชื้อไวรัส ให้เจ้าหน้าที่ประจำแต่ละโรงพยาบาลทำการเจาะ

กรณีผู้ป่วยนอก เจาะครั้งแรกเมื่อผู้ป่วยมารับการตรวจที่แผนกผู้ป่วยนอกและเจาะซ้ำอีก ถ้าหากผู้ป่วยมาติดตามผลการตรวจและรักษาตามนัด

กรณีผู้ป่วยใน เจาะเลือดครั้งแรก เมื่อวันที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล หรืออย่างช้าที่สุดไม่เกินวันที่ 3 ของการรักษา และเจาะซ้ำเป็นครั้งที่สองในวันที่จำหน่ายจากโรงพยาบาล หรือวันที่มาตรวจตามนัด

Copyright by Mahidol University

การเจาะเลือดให้เจาะทางเส้นโลหิตดำของผู้ป่วย ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) บรรจุในหลอดเก็บเลือด นำไปปั่นที่ 1000-1500 รอบ/นาที นานประมาณ 5 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน เก็บเอาเฉพาะซีรั่ม แยกใส่หลอดแก้วปราศจากเชื้อ ขนาดยาวประมาณ 3 เซนติเมตร (1 dram) ที่ทางศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีนจัดเตรียมไว้ให้ แล้วเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็นประจำแต่ละโรงพยาบาล เพื่อรอให้ผู้วิจัยไปทำการเก็บรวบรวมใส่กระติกแช่น้ำแข็ง นำไปยังศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน มหาวิทยาลัยมหิดล ณ ศาลายา เพื่อทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่อไป

การเก็บเลือด เพื่อตรวจหาแอนติบอดีย์ทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาให้เก็บ 2 ครั้ง ครั้งแรกเมื่อเริ่มป่วย และครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 7-14 วัน หรือในวันที่จำหน่ายจากโรงพยาบาล (73)

4. ข้อมูลการตรวจแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ ที่ทำให้เกิดการป่วยในแต่ละรายตลอดจนข้อมูลการตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ ได้มาจากวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีนฯ

วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีดังนี้

I. **การตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ในซีรั่ม** (serological test)

การตอบสนองของแอนติบอดีย์ ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่นั้น มีอยู่ 2 แบบ คือ (21,25,43)

1. การตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีย์แบบปฐมภูมิ หรือการติดเชื้อครั้งแรก (primary antibody response)

ซึ่งจะพบในกลุ่มคนที่ไม่เคยมีการติดเชื้อในกลุ่ม Flavivirus ได้แก่ ไข้เหลือง ไข้เลือดออก หรือไข้สมองอักเสบมาก่อนเลย

2. การตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีย์แบบทุติยภูมิ หรือการติดเชื้อครั้งหลัง (secondary antibody response)

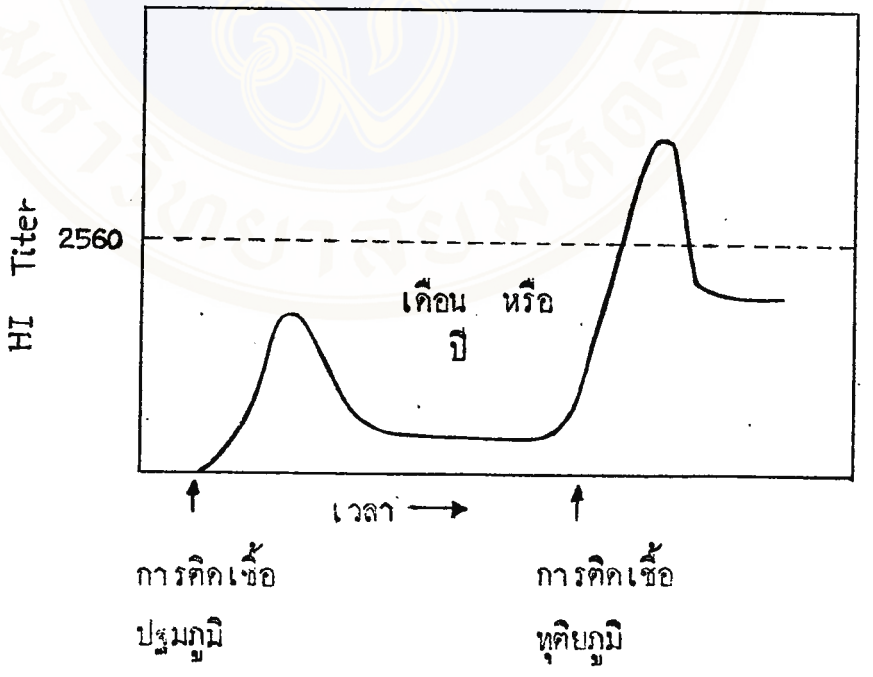
ซึ่งจะพบในกลุ่มคนที่เคยมีประวัติของการติดเชื้อในกลุ่ม Flavivirus มาก่อนแล้ว โดยอาจเกิดแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสไข้เหลือง เชื้อไข้สมองอักเสบ หรือต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ต่าง ทัยป์ กันกับการติดเชื้อครั้งที่หลัง (ตัวอย่างเช่น มีการติดเชื้อครั้ง

Copyright by Mahidol University

หลังด้วยไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 ในขณะที่มีอิมมูนต่อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1 เป็นต้น) แต่จะพบว่าในการติดเชื้อครั้งหลังนั้น จะไม่มีการซ้ำ ทัยป์ เดิมกับที่ติดเชื้อครั้งแรกเลย (21)

ในการติดเชื้อครั้งแรก ระดับของแอนติบอดีย์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงระดับหนึ่ง โดยระดับของแอนติบอดีย์ดังกล่าวนั้น เมื่อเก็บในระยะพักฟื้น (1-4 สัปดาห์หลังเริ่มป่วย) จนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 4 เท่า หรือมากกว่านี้ของค่าระดับแอนติบอดีย์ที่เก็บในระยะเริ่มป่วย (ก่อนวันที่ 4 ของโรค) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ระดับแอนติบอดีย์ที่เพิ่มขึ้นจะไม่เพิ่มเกิน 1: 1,280 และถ้าใช้แอนติเจนที่เตรียมจากไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ทัยป์ แล้วจะพบว่าระดับแอนติบอดีย์ที่สูงขึ้น 4 เท่าหรือมากกว่านั้น พบได้ต่อแอนติเจน ทัยป์ เดียวเท่านั้น คือ ทัยป์ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อโดยตรง

ในการติดเชื้อครั้งหลังระดับแอนติบอดีย์ จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและมีระดับสูงเกิน 1: 1,280 ซึ่งอาจมีค่ามากกว่า หรือเท่ากับ 1: 2,560 ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 4 การตอบสนองทางอิมมูน ต่อการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่แบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ

Copyright by Mahidol University

การตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ในซีรั่ม ด้วยวิธี Haemagglutination Inhibition (HI Test)

ใช้เครื่องมือและหลักการทดลองตามวิธีการของ Clarke & Casals (37)

หลักการ: HI Test เป็นวิธีการทดสอบปฏิกริยาระหว่างไวรัสแอนติเจนกับแอนติบอดีย์ โดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่จะไปทำให้เม็ดเลือดแดงของห่าน (Goose red blood cell) หรือเม็ดเลือดแดงกรุ๊พ O ของคนมีการจับกลุ่มกัน

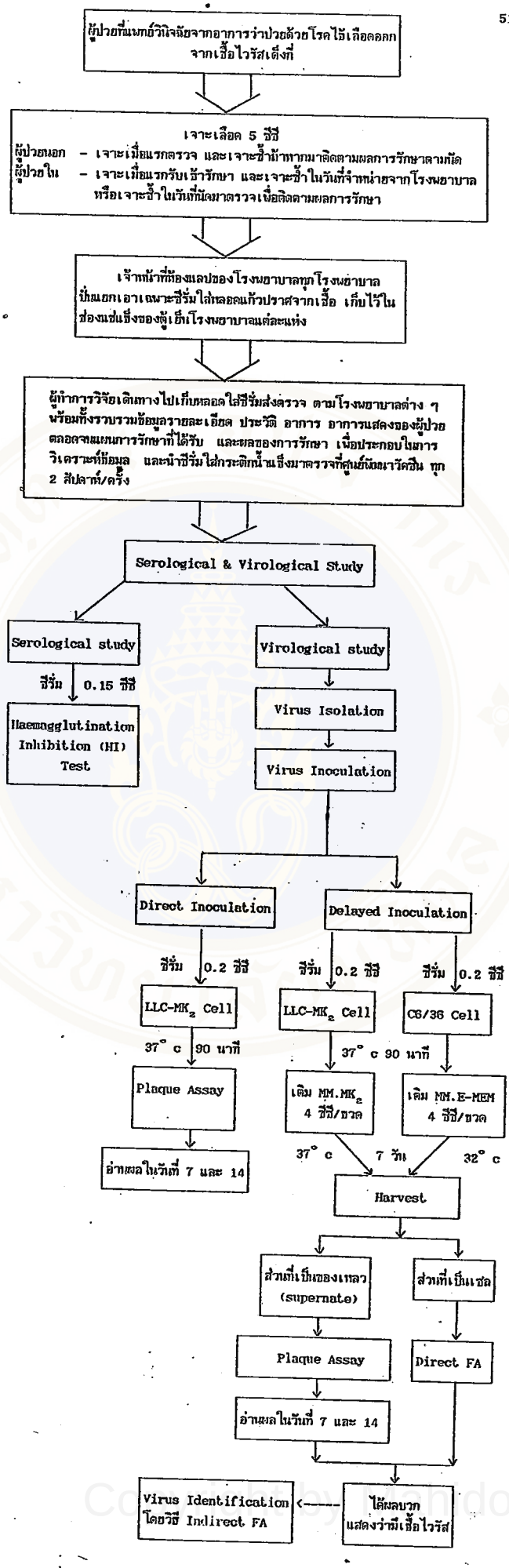
การเกิดปฏิกริยาในกรณีที่ไม่มีแอนติบอดีย์ในซีรั่มที่นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งเป็นแอนติเจน จะไปทำให้เม็ดเลือดแดงของห่านหรือเม็ดเลือดแดงกรุ๊พ O ของคนจับกลุ่มกัน แยกตัวออกจากบัฟเฟอร์

แต่ในกรณีที่มีแอนติบอดีย์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่อยู่ในซีรั่ม แอนติเจน จะเข้าไปทำปฏิกริยากับแอนติบอดีย์นั้น เมื่อเติมเม็ดเลือดแดงของห่านหรือเม็ดเลือดแดงกรุ๊พ O ของคนลงไป จะไม่มีตัวแอนติเจนที่ไปทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มแยกตัวออกจากบัฟเฟอร์ ดังนั้นถ้าหากทำการเจือจางปริมาณของแอนติบอดีย์ในซีรั่มที่จะเข้าจับกับไวรัสแอนติเจน จนไม่มีแอนติเจนเหลืออยู่พอที่จะไปทำให้เม็ดเลือดแดงของห่านหรือเม็ดเลือดแดงกรุ๊พ O ของคนมีการจับกลุ่มแยกตัวจากบัฟเฟอร์ แล้วเม็ดเลือดแดงดังกล่าวจะรวมกลุ่มกันตกลงมาสู่ก้นหลุมถาดทดลองในลักษณะเม็ดกระดุมตามแรงดึงดูดของโลก ทำให้สามารถทราบถึงปริมาณของแอนติบอดีย์ที่เจือจางนั้นได้ ซึ่งถือเป็นระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ตรวจได้จากคนคนนั้น

วิธีการ (ดูในภาคผนวก ข)

II. **การแยกเชื้อของไวรัสและการพิสูจน์ ทัยป์ ของไวรัส** (virus isolation & virus identification) (ดูในภาคผนวก ข)

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 5 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนต่าง ๆ ของการเก็บรวบรวมข้อมูล

Chulalongkorn University

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่

1. **สถิติพรรณนา (Descriptive Statistics)** ได้แก่ค่าร้อยละ อัตราอุบัติการณ์ (Incidence Rate) ค่าเฉลี่ยโดยใช้มัชฌิมเลขคณิต และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการพรรณนาข้อมูล ที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัสเด็งกี่ จำแนกผลตามการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับผลการตรวจวินิจฉัยโดยแพทย์ ตลอดจนการพรรณนาถึง อายุ เพศ ที่อยู่ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บป่วย อาการและอาการแสดงทางคลินิก เพื่อประกอบในการพิจารณาระดับความรุนแรงของโรคของผู้ป่วย

2. **สถิติวิเคราะห์ (Analytic Statistics)** เพื่อใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร โดยใช้ Chi-square หรือ Fisher's Exact Test แล้วแต่กรณี

การนำเสนอข้อมูล

นำผลจากการวิเคราะห์ข้อมูล มานำเสนอในรูปตารางความถี่ร้อยละ ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร กราฟเชิงเส้น แผนภูมิแท่ง และแผนภาพแสดงอัตราอุบัติการณ์ตามสถานที่

Copyright by Mahidol University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาเพื่อพิสูจน์หา ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจและวินิจฉัยจากแพทย์ว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก ของทุกโรงพยาบาลในจังหวัดลำพูน ได้ทำการศึกษาตั้งแต่เดือน มกราคม 2532 ถึงเดือนธันวาคม 2532 พบว่าเริ่มได้รับซีรั่มของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลครั้งแรก เมื่อ 24 พฤษภาคม 2532 และได้รับครั้งสุดท้าย เมื่อ 28 กันยายน 2532 โดยหลังจากเดือนกันยายน เป็นต้นมา ผู้ทำการวิจัยได้กลับไปตามผลซ้ำอีกในต้นเดือนและปลายเดือนพฤศจิกายน พบว่าไม่มีการเจาะซีรัมของผู้ป่วยเพิ่มเติม เนื่องจาก ไม่พบผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกในเขตจังหวัดลำพูนอีก ซึ่งก็เป็นไปตามธรรมชาติของโรคที่จะพบผู้ป่วยมากในช่วงฤดูฝน คือ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน-กันยายน และภายหลังฤดูฝนไปแล้วจะไม่พบว่ามีผู้ป่วยอีก

จากซีรั่มที่เก็บได้ทั้งหมด มาจาก 5 โรงพยาบาลด้วยกัน คือ 1. โรงพยาบาลจังหวัดลำพูน 2. โรงพยาบาลอำเภอป่าซาง 3. โรงพยาบาลอำเภอบ้านโฮ่ง 4. โรงพยาบาลอำเภอลี้ และ 5. โรงพยาบาลกึ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง

ไม่มีผู้ป่วยด้วยโรคนี้มารับการตรวจและรักษา ณ โรงพยาบาลอำเภอแม่ทาเลย

ซีรั่มผู้ป่วยที่ได้รับ รวมทั้งสิ้น 203 ตัวอย่าง แยกเป็น

Acute serum 131 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 64.53

และ Convalescent serum 72 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 35.47

ทั้งนี้ จากจำนวนผู้ป่วยที่แพทย์ทำการตรวจและวินิจฉัยอาการและอาการแสดงว่าป่วยโรคด้วยไข้เลือดออก จำนวน 81 ราย และสงสัยเป็นโรคอื่นที่ไม่ใช่ไข้เลือดออกอีก 50 ราย ดังตารางที่ 5

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 5 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ส่งซีรั่มตรวจ จำแนกตามผลการวินิจฉัยของแพทย์ว่า ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก และไม่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก

การวินิจฉัยของแพทย์	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก	81	61.83
ไม่เป็นไข้เลือดออก	50	38.17
รวม	131	100.00

จากผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธี HI Test แยกผู้ป่วยได้เป็น 6 ประเภท ดังนี้

1. เป็นผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกจริง คือ มีการเจาะเลือดตรวจทั้งระยะ Acute และ Convalescent โดยที่ระดับแอนติบอดีย์จากการเจาะเลือดในระยะ Convalescent จะเพิ่มสูงขึ้น มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าของระดับแอนติบอดีย์ในระยะ Acute มีจำนวนทั้งหมด 29 ราย ในจำนวนทั้งหมด 29 รายนี้ จากระยะเวลาในการเจาะเลือดห่างกันระหว่าง Acute stage และ Convalescent stage และระดับแอนติบอดีย์ที่เกิดขึ้นในการเจาะเลือดครั้งที่ 2 แบ่งได้เป็น

1.1 การติดเชื้อแบบปฐมภูมิ 1 ราย
1.2 การติดเชื้อแบบทุติยภูมิ 25 ราย
1.3 บอกไม่ได้ว่าเป็นการติดเชื้อชนิดปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ 3 ราย

2. เป็นผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกจริง แต่มีการเจาะเลือดตรวจเพียงครั้งเดียวคือ ในระยะ Acute แต่จากผลการแยกเชื้อไวรัส ปรากฏว่าสามารถแยก ทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ มีทั้งหมด 2 ราย

Copyright by Mahidol University

3. เป็นผู้ป่วยที่สันนิษฐานว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก คือ มีการเจาะเลือดตรวจเพียงครั้งเดียว เฉพาะในระยะ Acute และระดับแอนติบอดีย์ มีค่า ≥ 1:2560 ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นการติดเชื้อแบบทุติยภูมิ มีจำนวนทั้งหมด 8 ราย

4. ไม่เป็นผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก คือ มีการเจาะเลือดตรวจ 2 ครั้ง ห่างกันมากกว่า หรือเท่ากับ 7 วัน ระดับแอนติบอดีย์ 2 ครั้ง เท่ากัน ไม่มีการเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า หรือมากกว่าในการเจาะเลือดครั้งที่สอง มีจำนวนทั้งหมด 17 ราย

5. ไม่สามารถแปลผลได้ เนื่องจากมีการเจาะเลือดตรวจเพียงครั้งเดียว และระดับแอนติบอดีย์ ≤ 1:1280 มีจำนวนทั้งหมด 52 ราย

6. ไม่สามารถแปลผลได้ เนื่องจากระดับแอนติบอดีย์ในการเจาะเลือดทั้ง 2 ครั้ง เท่ากัน และระยะห่างในการเจาะครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งที่ 1 น้อยกว่า 7 วัน โดยระดับแอนติบอดีย์ มีค่า ≤ 1:1280 มีจำนวนทั้งหมด 23 ราย

สรุปผลได้ดังตารางที่ 6 และ 7

ตารางที่ 6 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ส่งซีรั่มตรวจ จำแนกประเภทตามผล HI Test

ประเภท	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1. ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจริง	31	23.66
2. ผู้ป่วยที่สันนิษฐานว่าเป็นโรคไข้เลือดออกที่เป็นการติดเชื้อแบบทุติยภูมิ	8	6.11
3. ไม่เป็นผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก	17	12.98
4. ไม่สามารถแปลผลได้	75	57.25
รวม	131	100.00

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 7 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกตามผล HI Test ที่จำแนกตามลำดับที่ของการติดเชื้อ (ผู้ป่วยจริงและผู้ป่วยที่สันนิษฐานว่าเป็นการติดเชื้อทุติยภูมิ)

ลำดับที่ของการติดเชื้อ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
การติดเชื้อแบบปฐมภูมิ (Primary Infection)	1	2.56
การติดเชื้อแบบทุติยภูมิ (Secondary Infection)	33	84.62
บอกไม่ได้ว่าเป็นการติดเชื้อแบบปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ	5	12.82
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

จากจำนวนผู้ป่วยที่เป็นไข้เลือดออกจริง และสันนิษฐานว่าเป็นไข้เลือดออกที่มีการติดเชื้อแบบทุติยภูมิ ทั้งหมด 39 ราย ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ ดังนี้

วินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออก (DHF) 23 ราย เป็นโรคไข้เลือดออกและมีอาการช็อกร่วมด้วย (DSS) 1 ราย เป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุ 13 ราย เป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract infection) 1 ราย และเป็นโรคไข้ไทฟอยด์ (enteric fever) 1 ราย ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ตามผล HI Test จำแนกตามผลการตรวจและวินิจฉัยของแพทย์

การวินิจฉัยโรคโดยแพทย์	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1. ไข้เลือดออก	23	58.98
2. ไข้เลือดออกที่มีอาการช็อกร่วมด้วย	1	2.56
3. ไข้ไม่ทราบสาเหตุ	13	33.34
4. โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน	1	2.56
5. ไข้ไทฟอยด์	1	2.56
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

จากจำนวนที่ไม่เป็นผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกโดยดูจากผล HI Test ทั้งหมด 17 ราย มีการวินิจฉัยของแพทย์ว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก 12 ราย ไข้ไม่ทราบสาเหตุ 3 ราย โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน 1 ราย และเลือดออกในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น 1 ราย ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนและร้อยละของผู้ไม่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกตามผล HI Test ที่จำแนกตามผลการตรวจและวินิจฉัยของแพทย์

การวินิจฉัยโรคโดยแพทย์	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1. ไข้เลือดออก	12	70.59
2. ไข้ไม่ทราบสาเหตุ	3	17.65
3. โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน	1	5.88
4. เลือดออกในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น	1	5.88
รวม	17	100.00

Copyright by Mahidol University

จากจำนวนที่ไม่สามารถแปลผลการตรวจเลือดโดยวิธี HI Test ทั้งหมด 75 ราย มีการวินิจฉัยของแพทย์ว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก 45 ราย ไข้ไม่ทราบสาเหตุ 18 ราย โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน 6 ราย ไข้ไทฟอยด์ 3 ราย และไม่ทราบการวินิจฉัย เนื่องจากค้นหาประวัติไม่ได้ 3 ราย ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ไม่สามารถสรุปผลการป่วยจากการตรวจเลือดโดยวิธี HI Test ได้ จำแนกตามผลการตรวจและวินิจฉัยของแพทย์

การวินิจฉัยโรคโดยแพทย์	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1. ไข้เลือดออก	45	60.00
2. ไข้ไม่ทราบสาเหตุ	18	24.00
3. โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน	6	8.00
4. ไข้ไทฟอยด์	3	4.00
5. ไม่ทราบการวินิจฉัย	3	4.00
รวม	75	100.00

Copyright by Mahidol University

ผู้ป่วยที่ทั้งแพทย์ตรวจวินิจฉัย และผล HI Test บ่งว่าเป็นโรคไข้เลือดออกมีทั้งหมด 24 ราย

ผู้ป่วยที่ทั้งแพทย์ตรวจวินิจฉัย และผล HI Test ไม่บ่งว่าเป็นโรคไข้เลือดออกมีทั้งหมด 5 ราย

ผู้ป่วยที่แพทย์ตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออก แต่ผล HI Test ไม่บ่งว่าเป็นโรคไข้เลือดออกมีทั้งหมด 12 ราย

ผู้ป่วยที่แพทย์ตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคอื่นที่ไม่ใช่โรคไข้เลือดออก แต่ผล HI Test กลับระบุเป็นโรคไข้เลือดมีทั้งหมด 15 ราย

ผู้ป่วยที่แพทย์ตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออก แต่แปรผล HI Test ไม่ได้มีทั้งหมด 45 ราย

ผู้ป่วยที่แพทย์ตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคอื่นที่ไม่ใช่โรคไข้เลือดออก แต่แปลผล HI Test ไม่ได้ มีทั้งหมด 30 ราย ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจและวินิจฉัยจากแพทย์ว่าป่วยและไม่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก จำแนกตามผล HI Test

การตรวจและวินิจฉัยโดยแพทย์	การตรวจโดยวิธี HI Test			รวม
	เป็นไข้เลือดออก	ไม่เป็นไข้เลือดออก	สรุปผลไม่ได้	จำนวน (ร้อยละ)
	จำนวน (ร้อยละ)	จำนวน (ร้อยละ)	จำนวน (ร้อยละ)	
เป็นไข้เลือดออก	24 (18.32)	12 (9.16)	36 (27.48)	81 (61.83)
ไม่เป็นไข้เลือดออก	15 (11.45)	5 (3.82)	30 (15.27)	50 (38.17)
รวม	39 (29.77)	17 (12.98)	56 (57.25)	131 (100.00)

Copyright by Mahidol University

1. หา Validity ของการตรวจโดยแพทย์ และ HI Test

การตรวจและวินิจฉัยโดยแพทย์	การตรวจโดย HI test		รวม
	เป็นโรค	ไม่เป็นโรค	
เป็นโรค	24	12	36
ไม่เป็นโรค	15	5	20
รวม	39	17	56

ความสามารถในการตรวจของแพทย์ที่จะแยกจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้เลือดออกจริงออกจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยมี HI Test เป็นหลัก (sensitivity ของการตรวจโดยแพทย์)

$$= \frac{24}{39} \times 100 \quad \text{หรือร้อยละ } 61.54$$

ความสามารถในการตรวจของแพทย์ที่จะแยกจำนวนผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคไข้เลือดออก ออกจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยมี HI Test เป็นหลัก (specificity ของการตรวจโดยแพทย์)

$$= \frac{5}{17} \times 100 \quad \text{หรือร้อยละ } 29.41$$

Predictive value of positive ของการตรวจโดยแพทย์

$$= \frac{24}{36} \times 100 \quad \text{หรือร้อยละ } 66.67$$

Predictive value of negative ของการตรวจโดยแพทย์

$$= \frac{5}{20} \times 100 \quad \text{หรือร้อยละ } 25.00$$

Copyright by Mahidol University

ประสิทธิภาพของการตรวจโดยแพทย์ (Effeciency) = $\frac{24 + 5}{39} \times 100$

หรือร้อยละ 74.36

หมายเหตุ ความไวของการทดสอบหาระดับแอนติบอดีย์ในซีรั่ม โดยวิธี HI test เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร

คนปกติมีค่าเฉลี่ยระดับแอนติบอดีย์ (IgG) ในร่างกาย 1701 $\pm$ 441 mg% ดังนั้นถึงถือว่าความไวในการทดสอบของ HI test เป็น 100%

2. หาค่าความแตกต่างของ Validity ของการทั้งสองวิธี โดยใช้ t-test

โดย $t = \frac{|(\frac{b}{n} - \frac{c}{n})| - \frac{1}{n}}{\sqrt{(b + c)/n^2}}$; $b = 12$; $c = 15$; $n = 56$

แทนค่าในสูตรจะได้ $t = \frac{|\frac{12}{56} - \frac{15}{56}| - \frac{1}{56}}{\sqrt{(12 + 15)/56^2}}$

$= 0.385$, $df = 54$

ได้ p-value = 0.67

เพราะฉะนั้นที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Validity ของการตรวจโดยแพทย์และโดย HI Test ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ถึงแม้ว่าการตรวจโดยแพทย์และโดย HI test จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าการที่แพทย์วินิจฉัยได้ต่ำกว่า HI test เพราะวินิจฉัยพลาดไป เช่น ในบางรายที่มีเพียงไข้ไม่ทราบสาเหตุ หรืออาการไม่เด่นชัด ดังนั้นถ้าไม่แน่ใจควรรับเจาะเลือดตรวจก่อน

ส่วนในกรณีที่แพทย์มีความจำเพาะในการวินิจฉัยได้ต่ำ เพราะในผู้ป่วยบางโรคอาจมีอาการคล้ายคลึงกับไข้เลือดออกได้ เช่น โรคไทฟอยด์ จึงทำให้แพทย์วินิจฉัยพลาดได้ง่าย

Copyright by Mahidol University

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

จากจำนวนซีรั่มของผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกจริง 39 ราย เมื่อนำมาทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อพิสูจน์ ทัปย์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ได้ผลดังนี้

พบว่ามีเชื้อไวรัสอยู่ในซีรั่ม จากการทำ Plaque Assay 6 ราย ซึ่งมาจากการ inoculation ในเซล LLC- MK_2 3 รายหรือร้อยละ 50.00 ในเซล C6/36 2 ราย หรือร้อยละ 33.33 และทั้งเซล LLC-MK_2 และเซล C6/36 1 ราย หรือร้อยละ 16.67 ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 จำนวนและร้อยละของซีรั่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ที่ตรวจพบว่ามีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่จริง โดยการทำ plaque assay

Plaque Assay ให้ผลบวก	จำนวน	ร้อยละ
ในเซล LLC-MK_2	3	50.00
ในเซล C6/36	2	33.33
ทั้งในเซล LLC-MK_2 และเซล C6/36	1	16.67
รวม	6	100.00

Copyright by Mahidol University

ปริมาณของเชื้อไวรัส (titer ranges) เป็น PFU/ml. ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณของเชื้อไวรัสเด็งกี่ (PFU/ml.) ที่ได้จากการทำ Plaque Assay

เซล	ปริมาณของเชื้อไวรัส (PFU/ml.)	ค่าเฉลี่ย (PFU/ml.)
$LLC\text{-}MK_2$	$1.3x10^1 - 6.2x10^2$	$1.67x10^2$
C6/36	$2.0x10^1 - 3.8x10^2$	$1.09x10^2$

จากซีรั่มที่ตรวจพบว่ามีปริมาณไวรัสอยู่จริงทั้ง 6 ราย นั้น เมื่อนำมาทำการพิสูจน์แยก ทัยป์ ได้ 3 ราย หรือร้อยละ 50.00 ไม่สามารถพิสูจน์ได้ 3 ราย หรือร้อยละ 50.00 ผลการพิสูจน์ ทัยป์ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้จากซีรัมที่ตรวจพบว่ามีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่

การพิสูจน์ ทัยป์	จำนวน	ร้อยละ
DEN-1	1	16.67
DEN-2	2	33.33
ไม่สามารถพิสูจน์ได้	3	50.00
รวม	6	100.00

Copyright by Mahidol University

เมื่อคิดหาอัตราการพิสูจน์แยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัส โดยวิธี virus isolation จากจำนวนผู้ป่วย 39 ราย แยกได้ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ 3 ราย คิดเป็นอัตราการแยก ทัยป์ ได้ร้อยละ 7.70 ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้มาจากผู้ป่วยอาศัยในเขตอำเภอเมืองลำพูน 1 ราย และในเขตอำเภอบ้านโฮ่ง 2 ราย ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 การแพร่กระจาย ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่พิสูจน์ได้จากซีรั่มของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ในรอบ 1 ปี

ท้องที่	ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่	
	DEN-1	DEN-2
อำเภอเมืองลำพูน	1	-
อำเภอบ้านโฮ่ง	-	2

ผู้ป่วยทั้ง 39 ราย มีเพียง 1 ราย ที่ไม่สามารถหารายละเอียดเกี่ยวกับประวัติการเจ็บป่วย ผลการตรวจและวินิจฉัยโดยแพทย์ ตลอดจนผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นข้อมูลต่าง ๆ ของผู้ป่วยจึงมีเพียง 38 ราย ดังนี้

ลักษณะทางระบาดวิทยาของผู้ป่วย

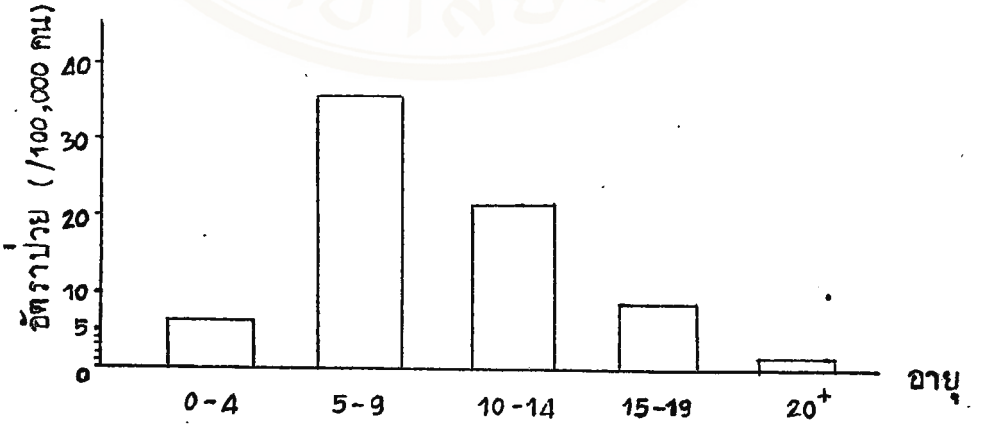
1. อายุ ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ที่กลุ่มอายุ 5-9 ปี มีจำนวน 17 ราย หรือร้อยละ 43.59 คิดเป็นอัตราป่วย 35.7 ต่อ 100,000 ประชากร รองลงมาคือ กลุ่มอายุ 10-14 ปี มีจำนวน 10 ราย หรือร้อยละ 25.64 คิดเป็นอัตราป่วย 21.5 ต่อแสนประชากร กลุ่มอายุ 15-19 ปี และ 20 ปีขึ้นไป มีจำนวนเท่ากัน คือกลุ่มละ 4 ราย หรือร้อยละ 10.26 เท่ากัน คิดเป็นอัตราป่วย 8.7 และ 1.8 ต่อ 100,000 ประชากร ตามลำดับ และกลุ่มสุดท้าย คืออายุ 0-4 ปี มี 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 คิดเป็นอัตราป่วย

Copyright by Mahidol University

ร้อยละ 10.26 เท่ากัน คิดเป็นอัตราป่วย 8.7 และ 1.8 ต่อ 100,000 ประชากร ตามลำดับ และกลุ่มสุดท้าย คืออายุ 0-4 ปี มี 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 คิดเป็นอัตราป่วย 6.3 ต่อ 100,000 ประชากร ไม่ทราบอายุ 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.56 (ตารางที่ 16 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 16 จำนวนร้อยละและอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากรผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามกลุ่มอายุ

อายุ (ปี)	จำนวน (ร้อยละ)	อัตราป่วย (/100,000 ประชากร)
0-4	3 (7.69)	6.3
5-9	17 (43.59)	35.7
10-14	10 (25.64)	21.5
15-19	4 (10.26)	8.7
20^{+}	4 (10.26)	1.8
ไม่ทราบอายุ	1 (2.56)	-
รวม	39 (100.00)	9.5



ภาพที่ 6 อัตราป่วย 100,000 ประชากรโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532 จำแนกตามอายุ

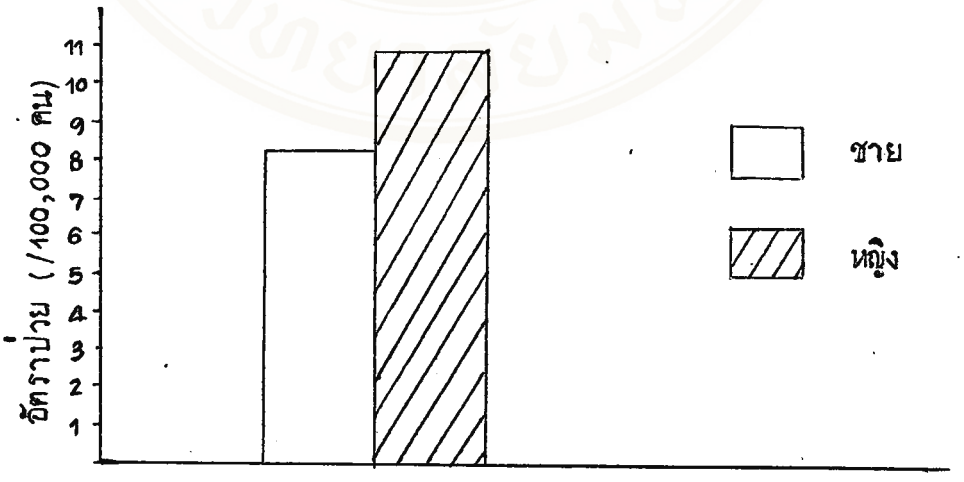
Copyright by Mahidol University

2. **เพศ** ผู้ป่วยเพศชาย มี 17 ราย หรือร้อยละ 43.59 คิดเป็นอัตราป่วย 8.3 ต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยเพศหญิงมี 22 ราย หรือร้อยละ 56.41 คิดเป็นอัตราป่วย 10.8 ต่อ 100,000 ประชากร

อัตราป่วยเพศชาย : เพศหญิง คิดเป็น 1:1.3 ซึ่งก็ยังคงใกล้เคียงกับอัตราป่วยทั่วประเทศ คือ ประมาณ 1:1 แสดงให้เห็นว่า เพศชาย และเพศหญิงมีอัตราเสี่ยงต่อการป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกเท่า ๆ กัน (ตารางที่ 17 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 17 จำนวนร้อยละและอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ของจังหวัดลำพูน จำแนกตามเพศ

เพศ	จำนวน (ร้อยละ)	อัตราป่วย (/100,000 ประชากร)
ชาย	17 (43.59)	8.3
หญิง	22 (56.41)	10.8
รวม	39 (100.00)	9.5



ภาพที่ 7 อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532 จำแนกตามเพศ

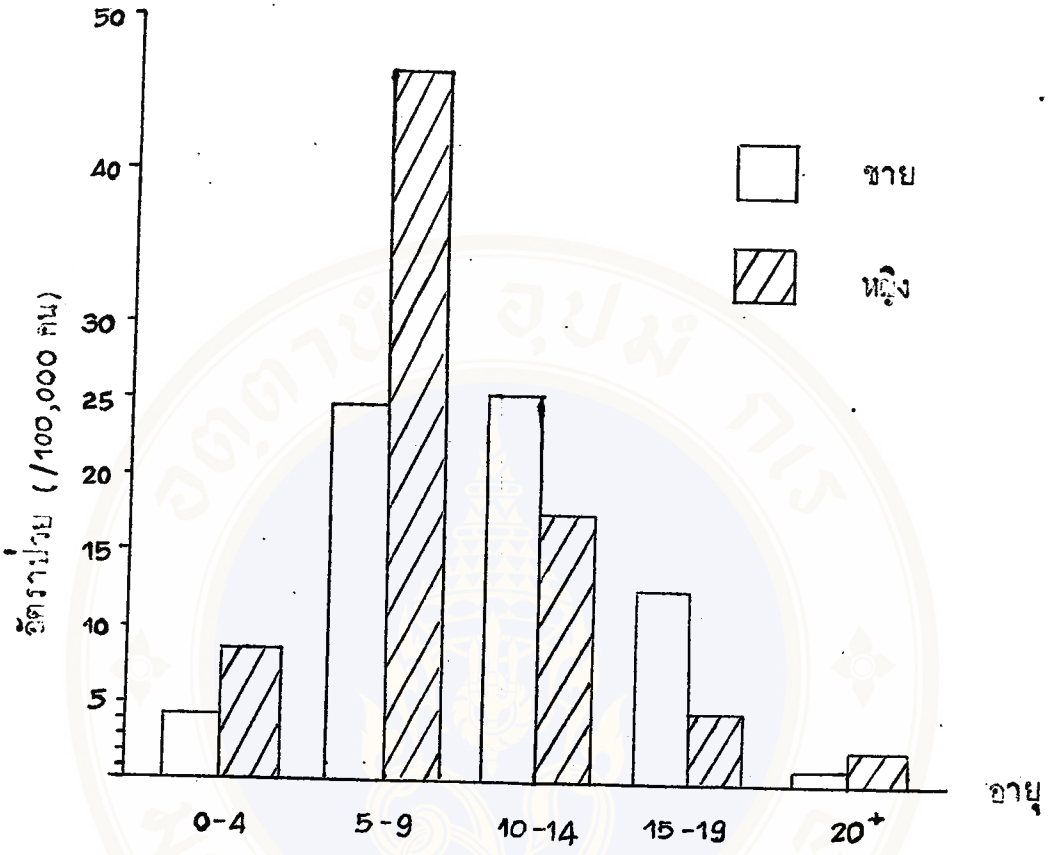
Copyright by Mahidol University

3. **อายุและเพศ** ผู้ป่วยอายุ 5-9 ปี และเป็นเพศหญิง มีจำนวนสูงสุดคือ มีทั้งหมด 11 ราย หรือร้อยละ 50.00 คิดเป็นอัตราป่วย 46.8 ต่อ 100,000 ประชากร รองลงมาคือ ผู้ป่วยเพศชายอายุ 10-14 ปี มี 6 ราย หรือร้อยละ 35.29 คิดเป็นอัตราป่วย 25.2 ต่อ 100,000 ประชากร และในเพศชาย อายุ 5-9 ปี มี 6 ราย หรือร้อยละ 35.29 คิดเป็นอัตราป่วย 24.8 ต่อ 100,000 ประชากร ตามลำดับ ส่วนในอายุ 20 ปี ขึ้นไป อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ทั้งในเพศชายและหญิงมีต่ำกว่ากลุ่มอายุอื่น คือ คิดเป็น 0.9 และ 2.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 18 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 18 จำนวนร้อยละและอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามกลุ่มอายุและเพศ

อายุ	ชาย		หญิง	
	จำนวน (ร้อยละ)	อัตราป่วย (/100,000 ประชากร)	จำนวน (ร้อยละ)	อัตราป่วย (/100,000 ประชากร)
0-4	1(5.89)	4.1	2(9.09)	8.6
5-9	6(35.29)	24.8	11(50.00)	46.8
10-14	6(35.29)	25.2	4(18.18)	17.6
15-19	3(17.64)	12.7	1(4.55)	4.5
20^{+}	1(5.89)	0.9	3(13.63)	2.7
ไม่ทราบอายุ	-	-	1(4.55)	-
รวม	17(100.00)	8.2	22(100.00)	10.8

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 8 อัตราป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532 จำแนกตามกลุ่มอายุและเพศ

Copyright by Mahidol University

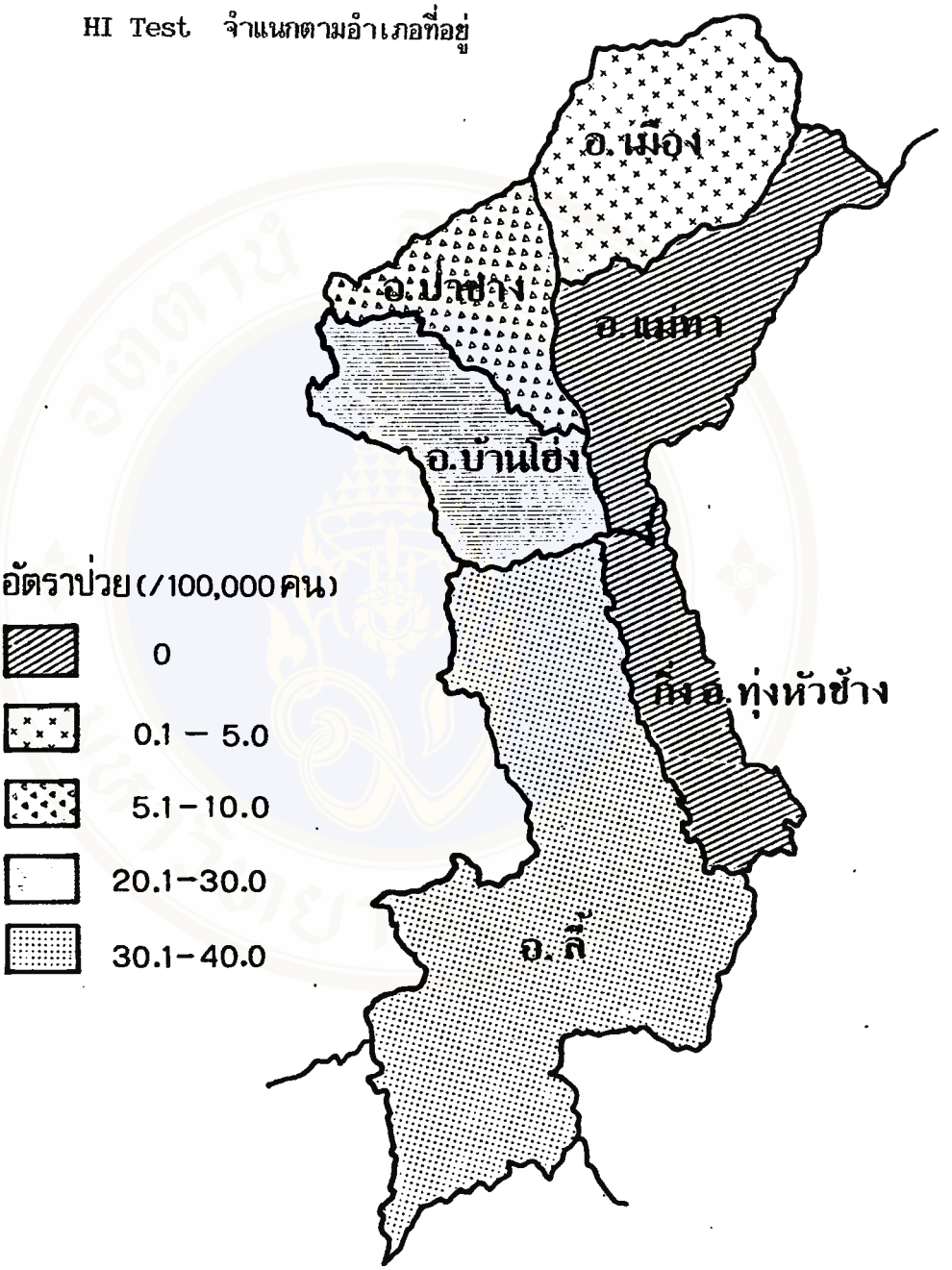
4. **ที่อยู่อาศัย** ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีที่อยู่อาศัยในเขตอำเภอลี้ จำนวน 20 ราย หรือร้อยละ 51.28 คิดเป็นอัตราป่วย 33.74 ต่อ 100,000 ประชากร รองลงมาคือ อำเภอบ้านโฮ่ง 10 ราย หรือร้อยละ 25.64 คิดเป็นอัตราป่วย 21.78 ต่อ 100,000 ประชากร อำเภอป่าซาง 6 ราย หรือร้อยละ 15.39 คิดเป็นอัตราป่วย 7.03 ต่อ 100,000 ประชากร และอำเภอเมืองลำพูน 3 ราย หรือ ร้อยละ 7.69 คิดเป็นอัตราป่วย 2.04 ต่อ 100,000 ประชากร ไม่พบว่ามีผู้ป่วยที่มาจากอำเภอแม่ทา และกิ่งอำเภอทุ่งหัวช้างเลย (ตารางที่ 19 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 19 จำนวนร้อยละและอัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามอำเภอที่อยู่

อำเภอที่อยู่	จำนวน (ร้อยละ)	อัตราป่วย (/100,000 ประชากร)
อำเภอลี้	20 (51.28)	33.74
อำเภอบ้านโฮ่ง	10 (25.64)	21.78
อำเภอป่าซาง	6 (15.39)	7.03
อำเภอเมืองลำพูน	3 (7.69)	2.04
อำเภอแม่ทา	-	-
กิ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง	-	-
รวม	39 (100.00)	9.50

Copyright by Mahidol University

ภาพที่ 9 อัตราอุบัติการณ์ (incidence rate)* ด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน พ.ศ. 2532 ที่ยืนยันผลการป่วยด้วยการตรวจเลือด โดยวิธี HI Test จำแนกตามอำเภอที่อยู่



หมายเหตุ *อัตราอุบัติการณ์ (incidence rate) คิดต่อประชากร 100,000 คน/ปี
อัตราอุบัติการณ์เฉลี่ยของจังหวัดลำพูนคิดเป็น 9.5/100,000 ประชากร /ปี

Copyright by Mahidol University

ข้อมูลที่เกี่ยวกับการเจ็บป่วย

1. **ระยะเวลาที่มีไข้ก่อนมารับการรักษา ณ โรงพยาบาล**

ผู้ป่วย 17 ราย มีไข้ก่อนมาโรงพยาบาล 3 วัน คิดเป็นร้อยละ 43.59 ผู้ป่วย 8 ราย มีไข้ก่อนมาโรงพยาบาล 5 วัน คิดเป็นร้อยละ 20.51 ผู้ป่วย 4 ราย มีไข้ก่อนมาโรงพยาบาล 2 วัน คิดเป็นร้อยละ 10.26 ซึ่งเท่ากับผู้ป่วยที่มีไข้ก่อนมาโรงพยาบาล 4 วัน มีผู้ป่วย 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 ที่มีไข้ก่อนมาโรงพยาบาลเพียง 1 วัน มีเพียงอย่างละรายที่มีไข้ 6 หรือ 7 วันก่อนมาโรงพยาบาล คิดเป็นร้อยละ 2.56, 2.56 ตามลำดับ และไม่ระบุวันมีไข้ก่อนมาโรงพยาบาล 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.56 (ตารางที่ 20)

ระยะเวลาเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) ที่ผู้ป่วยเป็นไข้ก่อนมารับการรักษา ณ โรงพยาบาล คิดเป็น 3.45 ± 1.35 วัน (ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

ตารางที่ 20 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลาที่มีไข้ก่อนมารับการรักษา ณ โรงพยาบาล

ระยะเวลาที่มีไข้ก่อนมารับการรักษา ณ โรงพยาบาล (วัน)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1	3	7.69
2	4	10.26
3	17	43.59
4	4	10.26
5	8	20.51
6	1	2.56
7	1	2.56
ไม่ระบุ	1	2.56
รวม	39	100.00

$\bar{x} \pm SD = 3.45 \pm 1.35$ วัน (ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

Copyright by Mahidol University

2. ระยะเวลาที่ทำการเจาะเลือดภายหลังจากวันเริ่มมีไข้ (Viremia)

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระยะเวลาในการเจาะเลือดตรวจครั้งแรก ภายหลังจากวันเริ่มมีไข้อยู่ในช่วง 5-6 วัน จำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.03 รองลงมาคือ 3-4 วัน มี 13 รายคิดเป็นร้อยละ 33.33 มีผู้ป่วย 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 ที่เจาะเลือดในวันที่ 1-2 หลังมีไข้ และมี 6 ราย หรือร้อยละ 15.38 ที่เจาะเลือดหลังวันมีไข้ตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป (ตารางที่ 21)

ค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่ทำการเจาะเลือดตรวจหลังวันเริ่มมีไข้ ($\bar{x} \pm SD$) = 4.82 ± 1.67 วัน

(ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

ตารางที่ 21 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลาที่ทำการเจาะเลือดภายหลังจากวันเริ่มมีไข้ (Viremia)

ระยะเวลาที่ทำการเจาะเลือดจากวันเริ่มมีไข้ (วัน)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1-2	3	7.69
3-4	13	33.33
5-6	16	41.03
7-8	6	15.38
ไม่ระบุ	1	2.56
รวม	39	100.00

$\bar{x} \pm SD = 4.82 \pm 1.67$ วัน

(ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

Copyright by Mahidol University

3. ระยะเวลารวมทั้งหมดของการมีไข้

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระยะเวลาในการเป็นไข้อยู่ในช่วง 5-6 วัน จำนวน 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 51.28 รองลงมาคือ 7-8 วัน มีจำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 20.51 ระยะเวลาที่น้อยที่สุดของการมีไข้ คือ 2 วัน มีจำนวนผู้ป่วยเพียง 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.56 (ตารางที่ 22)

ค่าเฉลี่ยระยะเวลาทั้งหมดที่มีไข้ ($\bar{x} \pm SD$) = 5.74 ± 1.60 วัน

(ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

ตารางที่ 22 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลารวมทั้งหมดที่มีไข้

ระยะเวลาทั้งหมดที่มีไข้ (วัน)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
≤ 2	1	2.56
3-4	6	15.38
5-6	20	51.28
7-8	8	20.51
> 8	3	7.69
ไม่ระบุ	1	2.56
รวม	39	100.00

$\bar{x}$ = 5.74 ± 1.60 วัน

(ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

Copyright by Mahidol University

4.. ระยะเวลารวมทั้งหมดที่รับการรักษาตัวในโรงพยาบาล

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ใช้ระยะเวลาในการพักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล นาน 3-4 วัน มีจำนวน 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 56.41 รองลงมาคือใช้ระยะเวลานานประมาณ 5-6 วัน มีจำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.08 มีผู้ป่วยเพียง 3 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 7.69 ที่ต้องอาศัยระยะเวลาในการรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลนาน 1 สัปดาห์ ขึ้นไปและมีเพียง 1 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 2.56 ที่ไม่ต้องพักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล (ตารางที่ 23)

ค่าเฉลี่ยระยะเวลาทั้งหมดที่รักษาตัวในโรงพยาบาล $\bar{x}$ = 4.05 ± 1.57 วัน (ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

ตารางที่ 23 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลารวมทั้งหมดที่รับการรักษาตัวในโรงพยาบาล

ระยะเวลารวมทั้งหมดของการรักษาตัวในโรงพยาบาล (วัน)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
ไม่ได้พักรักษาตัวในโรงพยาบาล	1	2.56
1-2	3	7.69
3-4	22	56.41
5-6	9	23.08
⩾ 7	3	7.69
ไม่ระบุ	1	2.56
รวม	39	100.00

$\bar{x}$ ± SD = 4.05 ± 1.57 วัน
(ไม่นับผู้ป่วยที่ไม่ระบุประวัติ)

Copyright by Mahidol University

5. ระยะเวลาระหว่างการเจาะเลือดครั้งที่ 1 (Acute stage) กับครั้งที่ 2 (Convalescent stage)

มีผู้ป่วย 13 ราย หรือร้อยละ 33.34 มีการเจาะเลือดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ห่างกันน้อยกว่า 7 วัน ผู้ป่วย 16 ราย หรือร้อยละ 41.03 ที่มีการเจาะเลือดระหว่างครั้งที่ 1 และ 2 ห่างกันตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป และผู้ป่วยอีก 10 ราย หรือร้อยละ 25.64 ที่มีการเจาะเลือดตรวจเพียงครั้งแรกครั้งเดียว (ตารางที่ 24)

ค่าเฉลี่ยระยะเวลาห่างของการเจาะเลือดครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2

$\bar{x} \pm SD = 5.57 \pm 2.32$ วัน

(ไม่นับ 10 ราย ที่มีการเจาะเลือดตรวจเพียงครั้งเดียว)

ตารางที่ 24 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามระยะเวลาระหว่างการเจาะเลือดครั้งที่ 1 (Acute stage) กับครั้งที่ 2 (Convalescent state)

ระยะเวลาห่างของการเจาะเลือดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 (วัน)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
1-2	4	10.26
3-4	7	17.95
5-6	2	5.13
≥7	16	41.03
เจาะเพียงครั้งเดียว	10	25.64
รวม	39	100.00

$\bar{x} \pm SD = 5.57 \pm 2.32$ วัน

(ไม่นับ 10 ราย ที่มีการเจาะเลือดตรวจเพียงครั้งเดียว)

Copyright by Mahidol University

ข้อมูลอาการทางคลินิกของผู้ป่วย

1. **อุณหภูมิของร่างกายขณะมารับการตรวจครั้งแรก**

ผู้ป่วยที่มารับการตรวจและรักษาส่วนใหญ่มีไข้สูง คือ มีไข้ตั้งแต่ 39.0° c ขึ้นไป มีถึง 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 51.28 มีส่วนน้อยที่ไม่มีไข้เลยหรือมีไข้ต่ำ ๆ ไม่เกินอุณหภูมิ 37.9° c มีเพียง 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 12.82 แต่กลับไม่พบว่ามีผู้ป่วยที่มีไข้สูงมากจนอุณหภูมิสูงถึง 41.0° c ขึ้นไปเลย (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอุณหภูมิของร่างกายขณะมารับการตรวจครั้งแรก

อุณหภูมิร่างกาย (° c) ขณะตรวจครั้งแรก	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
< 37.0	-	-
37.0-37.9	5	12.82
38.0-38.9	13	33.33
39.0-39.9	14	35.90
40.0-40.9	6	15.38
≥ 41.0	-	-
ไม่ระบุ	1	2.56
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

2. **อาการและอาการแสดงถึงการมีเลือดออกเองในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย**

จากอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยที่แพทย์ตรวจพบ ส่วนใหญ่มักมีการทดสอบทูนิเกต์ ได้ผลบวก มีจำนวนถึง 28 ราย จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 73.68 รองลงมาก็คือ มีเลือดกำเดาไหล (epitaxis) มี 14 รายคิดเป็นร้อยละ 36.84 ของผู้ป่วยทั้งหมด อาเจียนเป็นเลือด/ถ่ายเป็นเลือด 12 ราย หรือร้อยละ 31.58 (ตารางที่ 26)

ตารางที่ 26 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการและอาการแสดงถึงการมีเลือดออกเองในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย

อาการและอาการแสดงถึงการมีเลือดออกเอง	จำนวน (ราย)	ร้อยละ*
ทดสอบทูนิเกต์ ได้ผลบวก (positive tourniquet test)	28	73.68
มีจุดเลือดออก หรือผื่นจ้ำเลือดตามแขนขา (petechiae, purpura, echymosis)	8	21.05
เลือดกำเดาไหล (epitaxis)	14	36.84
อาเจียนเป็นเลือด/ถ่ายเป็นเลือด (hematemesis /melena)	12	31.58
อื่น ๆ (other bleedings)**	5	13.16

หมายเหตุ *คิดเฉพาะผู้ป่วย 38 ราย ที่ระบุประวัติเท่านั้น ไม่นับอีก 1 ราย ที่ไม่ระบุประวัติ

**other bleedings ในที่นี้เป็นเลือดออกตามไรฟัน (bleeding per gum) ทั้งหมด ไม่มีเลือดออกในระบบอื่น

Copyright by Mahidol University

3. ภาวะตับโตและกดเจ็บ

3.1 ตับโต มีผู้ป่วยเพียง 14 ราย หรือร้อยละ 35.90 ที่คลำตับพบ แต่อีก 24 ราย หรือร้อยละ 61.53 คลำไม่พบตับ และไม่ระบุประวัติอีก 1 รายหรือร้อยละ 2.56 (ตารางที่ 27)

ตารางที่ 27 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามภาวะตับโตตามที่แพทย์ตรวจพบครั้งแรก

ขนาดของตับที่คลำได้ต่ำกว่าระดับชายโครงข้างขวา (ซม.)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
พอดีขอบชายโครง (Just palpable)	2	5.13
1	2	5.13
2	6	15.38
3	3	7.69
>3	1	2.56
คลำไม่พบ	24	61.54
ไม่ระบุประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

3.2 การกดเจ็บของตับ (Liver Tenderness)

ผู้ป่วย 14 ราย ที่ตับโต มีอาการกดเจ็บบริเวณตำแหน่งของตับร่วมด้วย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 35.90 มี 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 ที่คลำตับไม่พบ แต่มีอาการกดเจ็บตรงตำแหน่งของตับ อีก 21 ราย หรือร้อยละ 53.85 ที่ไม่มีอาการตับโตหรือกดเจ็บบริเวณตับ และมี 1 ราย หรือร้อยละ 2.56 ที่ไม่ทราบประวัติ (ตารางที่ 28)

ตารางที่ 28 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการกดเจ็บตรงตำแหน่งของตับ

อาการ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
ตับโตและมีอาการกดเจ็บบริเวณตำแหน่งของตับ	14	35.90
ตับไม่โตแต่มีอาการกดเจ็บบริเวณตำแหน่งของตับ	3	7.69
ไม่มีอาการตับโตหรือกดเจ็บบริเวณตับ	21	53.85
ไม่ระบุประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

4. อาการช็อกขณะเมื่อมารับการรักษา

ผู้ป่วย 3 รายที่มีอาการช็อก หรือคิดเป็นร้อยละ 7.69 ไม่ระบุประวัติ 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.57 จากจำนวนของผู้ป่วยทั้งหมด 39 ราย (ตารางที่ 29)

ตารางที่ 29 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย ที่มีอาการช็อกจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด

อาการช็อก	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
มีอาการช็อก	3	7.69
ไม่มีอาการช็อก	35	89.74
ไม่ระบุประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

5. **ความดันโลหิตขณะแรกรับการรักษา**

5.1 ความดันโลหิตซิสโตลิค (systolic blood pressure)

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ถึง 24 ราย คิดเป็นร้อยละ 61.54 มีค่าความดันโลหิตซิสโตลิคเท่ากับหรือมากกว่า 100 มิลลิเมตรปรอท และส่วนที่เหลืออีก 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 28.20 มีความดันโลหิตซิสโตลิคต่ำกว่า 100 มิลลิเมตรปรอท อีก 4 ราย หรือร้อยละ 10.26 ไม่ทราบประวัติและไม่ได้วัดความดันโลหิตขณะแรกรับการรักษา (ตารางที่ 30)

ตารางที่ 30 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามความดันโลหิตซิสโตลิคขณะแรกรับการรักษา

ความดันโลหิตซิสโตลิค (มิลลิเมตรปรอท)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
< 80	3	7.69
80-89	3	7.69
90-99	5	12.82
100-109	8	20.51
110-119	12	30.77
⩾ 120	4	10.26
ไม่ทราบประวัติ + ไม่ได้วัด	4	10.26
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

5.2 ความดันโลหิตไดแอสโตลิต (diastolic blood pressure)

มีผู้ป่วย 1 ราย หรือร้อยละ 2.57 ที่ไม่สามารถวัดความดันโลหิตไดแอสโตลิคได้ ผู้ป่วย 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 ที่ความดันโลหิตไดแอสโตลิควัดได้ต่ำกว่า 60 มิลลิเมตรปรอท ส่วนที่เหลืออีก 31 ราย หรือร้อยละ 79.48 มีความดันโลหิตไดแอสโตลิคเท่ากับหรือมากกว่า 60 มิลลิเมตรปรอท และ 4 ราย หรือร้อยละ 10.26 ไม่ทราบประวัติและไม่ได้วัดความดันโลหิตขณะแรกรับการรักษา (ตารางที่ 31)

ตารางที่ 31 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามความดันโลหิตไดแอสโตลิคขณะแรกรับการรักษา

ความดันโลหิตไดแอสโตลิค (มิลลิเมตรปรอท)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
วัดไม่ได้	1	2.56
< 60	3	7.69
60-69	12	30.77
70-79	13	33.33
≤ 80	6	15.38
ไม่ทราบประวัติ + ไม่ได้วัด	4	10.26
รวม	39	100.00

ค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตซิสโตลิค ($\bar{x} \pm SD$) = 105 ± 14.34 มิลลิเมตรปรอท

ค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตไดแอสโตลิค ($\bar{x} \pm SD$) = 70.14 ± 10.79 มิลลิเมตรปรอท

(ไม่นับ 4 ราย ที่ไม่ทราบประวัติ และไม่ได้วัดความดันโลหิต)

หมายเหตุ WHO; 2529 (23) ให้คำจำกัดความของภาวะช็อกไว้ว่า "เป็นภาวะที่มีค่าความดันโลหิตต่ำกว่า 90/60 มิลลิเมตรปรอท มี pulse pressure แคบ (≤ 20 มิลลิเมตรปรอท) ชีพจรเต้นเบาเร็ว ร่วมกับอาการแสดงอื่น ๆ เช่น ผิวหนังเย็นชืด ซีด กระสับกระส่าย และหมดสติ

Copyright by Mahidol University

5.3 ค่า pulse pressure มีผู้ป่วย 3 ราย หรือร้อยละ 7.69 ที่มีค่า Pulse Pressure ≤ 20 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับผู้ป่วยที่มีอาการช็อก (ตารางที่ 32)

ตารางที่ 32 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามค่า pulse pressure ขณะแรกรับการรักษา

Pulse Pressure (มิลลิเมตรปรอท)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
≤ 20	3	7.69
> 20	36	92.31
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

6. **อัตราการเต้นของชีพจร (pulse rate) ขณะแรกรับการรักษา**

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ 24 ราย หรือร้อยละ 61.54 นับชีพจรขณะแรกรับการรักษาได้มากกว่า หรือเท่ากับ 100 ครั้ง/นาที มี 9 ราย หรือร้อยละ 23.08 ที่นับชีพจรได้ต่ำกว่า 100 ครั้ง/นาที และไม่ทราบประวัติ ตลอดจนไม่ได้นับชีพจรขณะแรกรับการรักษาอีก 6 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 15.38 (ตารางที่ 33)

ตารางที่ 33 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอัตราการเต้นของชีพจรที่วัดได้ขณะแรกรับการรักษา

การเต้นของชีพจร (ครั้ง/นาที)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
< 70	-	-
70-79	2	5.13
80-89	3	7.69
90-99	4	10.26
⩾ 100	24	61.54
ไม่ทราบประวัติ + ไม่ได้นับ	6	15.38
รวม	39	100.00

ค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของชีพจรขณะแรกรับการรักษา

$(\bar{x} \pm SD) = 100 \pm 8.92$ ครั้ง

(ไม่นับรวม 6 ราย ที่ไม่ทราบประวัติ และไม่ได้วัด)

3.6 **อาการกระสับกระส่าย/หมดสติ** (restlessness/lethargy)

มีผู้ป่วย 3 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 7.69 ที่มีอาการกระสับกระส่าย และหรืออาการหมดสติ ขณะรับการรักษา ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกันกับกลุ่มที่มีอาการช็อก ส่วนอีก 35 ราย หรือร้อยละ 89.74 ไม่มีอาการดังกล่าว และไม่ระบุประวัติ 1 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 2.57 (ตารางที่ 34)

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 34 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการกระสับกระส่าย/หมดสติ ขณะแรกรับการรักษา

อาการกระสับกระส่าย/หมดสติ (restlessness/lethargy)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
มีอาการ	3	7.69
ไม่มีอาการ	35	89.74
ไม่ระบุประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

8. **อาการมือเท้าเย็นและ/หรือลำตัวเย็น** (coldness of extremities/body)

มีผู้ป่วย 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.26 ที่มีอาการมือเท้าเย็น และ/หรือลำตัวเย็น ส่วนอีก 34 ราย หรือร้อยละ 87.18 เป็นปกติไม่ได้มีอาการดังกล่าว และมี 1 ราย หรือร้อยละ 2.56 ที่ไม่ระบุประวัติ (ตารางที่ 35)

ตารางที่ 35 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามอาการมือเท้าเย็น และ/หรือลำตัวเย็น

อาการมือเท้าเย็นและ/หรือลำตัวเย็น (coldness of extremities/body)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
มีอาการ	4	10.26
ไม่มีอาการ	34	87.18
ไม่ระบุประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

Copyright by Mahidol University

ข้อมูลผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ

1. **การตรวจนับเกล็ดเลือด** (platelets count)

ผู้ป่วย 29 ราย ที่ได้รับการตรวจนับเกล็ดเลือด มี 21 ราย หรือร้อยละ 53.85 มีภาวะเกล็ดเลือดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100,000/มิลลิลิตร และอีก 8 ราย หรือร้อยละ 20.51 มีภาวะเกล็ดเลือดมากกว่า 100,000/มิลลิลิตร มีผู้ป่วย 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.08 ที่ไม่ได้ตรวจนับเกล็ดเลือด และอีก 1 ราย หรือ ร้อยละ 2.56 ไม่ระบุประวัติ (ตารางที่ 36)

ตารางที่ 36 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วย จำแนกตามผลการตรวจนับภาวะเกล็ดเลือดในกระแสเลือด

ผลการตรวจนับเกล็ดเลือด (Platelets Count/ml)	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
≤ 100,000	21	53.85
100,001-200,000	5	12.82
200,001-300,000	2	5.13
> 300,000	1	2.56
ไม่ได้ตรวจนับ	9	23.08
ไม่ระบุประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

2. **ค่าฮีมาโตคริต** (Haematocrit)

จากการตรวจหาค่าฮีมาโตคริต ทั้งสูงสุดและต่ำสุด มีผู้ป่วย 35 ราย ที่ได้รับการตรวจ 3 ราย ไม่ได้ตรวจ และอีก 1 ราย ไม่ระบุประวัติ ซึ่งใน 35 ราย ที่ได้ตรวจหาค่าฮีมาโตคริตนั้น มี 7 ราย หรือร้อยละ 20.00 ที่มีค่าฮีมาโตคริตสูงสุด (maximum haematocrit) มากกว่าหรือเท่ากับ 50% และค่าฮีมาโตคริตต่ำสุด (minimum

Copyright by Mahidol University

haematocrit) อยู่ในช่วง 40-49%

ค่าเฉลี่ยของค่าฮีมาโตคริตสูงสุด ($\bar{x} \pm SD$) = 44.71 ± 6.54%

ค่าเฉลี่ยของค่าฮีมาโตคริตต่ำสุด ($\bar{x} \pm SD$) = 36.92 ± 5.56%

การจำแนกระดับความรุนแรงของโรค

จากข้อมูลอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยทั้ง 39 ราย ซึ่งใช้ประกอบการพิจารณา แบ่งผู้ป่วยออกตามระดับความรุนแรงของโรค โดยยึดหลักขององค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2529 จะแบ่งได้ ดังนี้

เกรด 1 มี 10 ราย หรือร้อยละ 25.64

เกรด 2 มี 25 ราย หรือร้อยละ 64.10

เกรด 3-4 มี 3 ราย หรือร้อยละ 7.69

ไม่ทราบประวัติ 1 ราย หรือร้อยละ 2.56 (ตารางที่ 37)

ตารางที่ 37 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก จำแนกตามระดับความรุนแรงของโรค ตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2529

ระดับความรุนแรงของโรค	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
เกรด 1	10	25.64
เกรด 2	25	64.10
เกรด 3-4	3	7.69
ไม่ทราบประวัติ	1	2.56
รวม	39	100.00

ความสัมพันธ์ระหว่าง อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรค กับ ทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

Copyright by Mahidol University

1. **อายุและเพศ** ผู้ป่วยที่ทำการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ทั้ง 3 ราย มีอายุ และ เพศ ดังนี้

ตารางที่ 38 อายุและเพศของผู้ป่วย กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

อายุ (ปี)	เพศ	ทัยป์ของเชื้อไวรัส
7	ชาย	DEN-1
9	หญิง	DEN-2
35	ชาย	DEN-2

2. **ระดับความรุนแรงของโรค** ผู้ป่วยที่สามารถแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ทั้ง 3 ราย มีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในเกรด 2 ทั้งหมด

ตารางที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	อายุ (ปี) < 10	อายุ (ปี) ⩾ 10	รวม	p-value*
DEN-1	1 (0.67)	0 (0.33)	1	0.67
DEN-2	1 (1.33)	1 (0.67)	2	
รวม	2	1	3	

* ใช้ Fisher's Exact Test (ภาคผนวก ง)

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 40 ความสัมพันธ์ระหว่าง เพศ กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	เพศ ชาย	เพศ หญิง	รวม	p-value*
DEN-1	1 (0.67)	0 (0.33)	1	0.67
DEN-2	1 (1.33)	1 (0.67)	2	
รวม	2	1	3	

* ใช้ Fisher's Exact Test (ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 41 ความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับความรุนแรงของโรค กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้

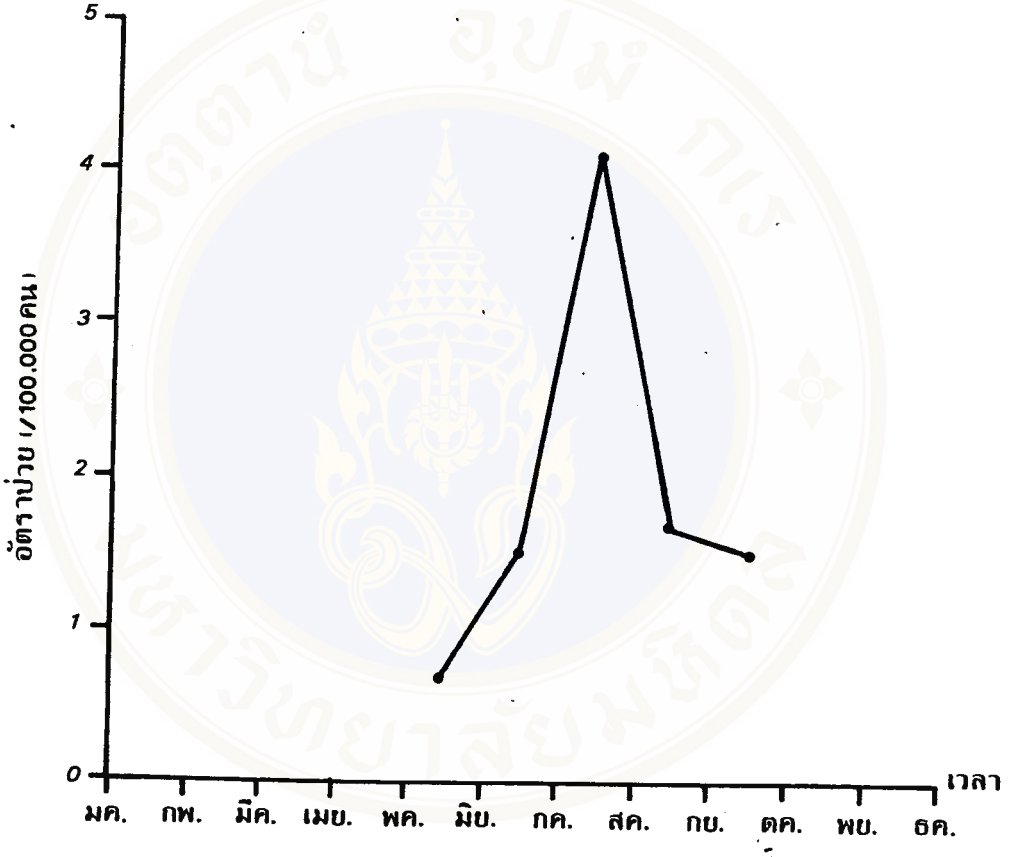
ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้	ความรุนแรงของโรค ไม่รุนแรง	ความรุนแรงของโรค รุนแรง	รวม	p-value*
DEN-1	1 (1.00)	0 (0.00)	1	1.00
DEN-2	2 (2.00)	0 (0.00)	2	
รวม	3	0	3	

หมายเหตุ เกรด 1-2 มีระดับความรุนแรงของโรค ไม่รุนแรง
เกรด 3-4 มีระดับความรุนแรงของโรค รุนแรง

* ใช้ Fisher's Exact Test (ภาคผนวก ง)

Copyright by Mahidol University

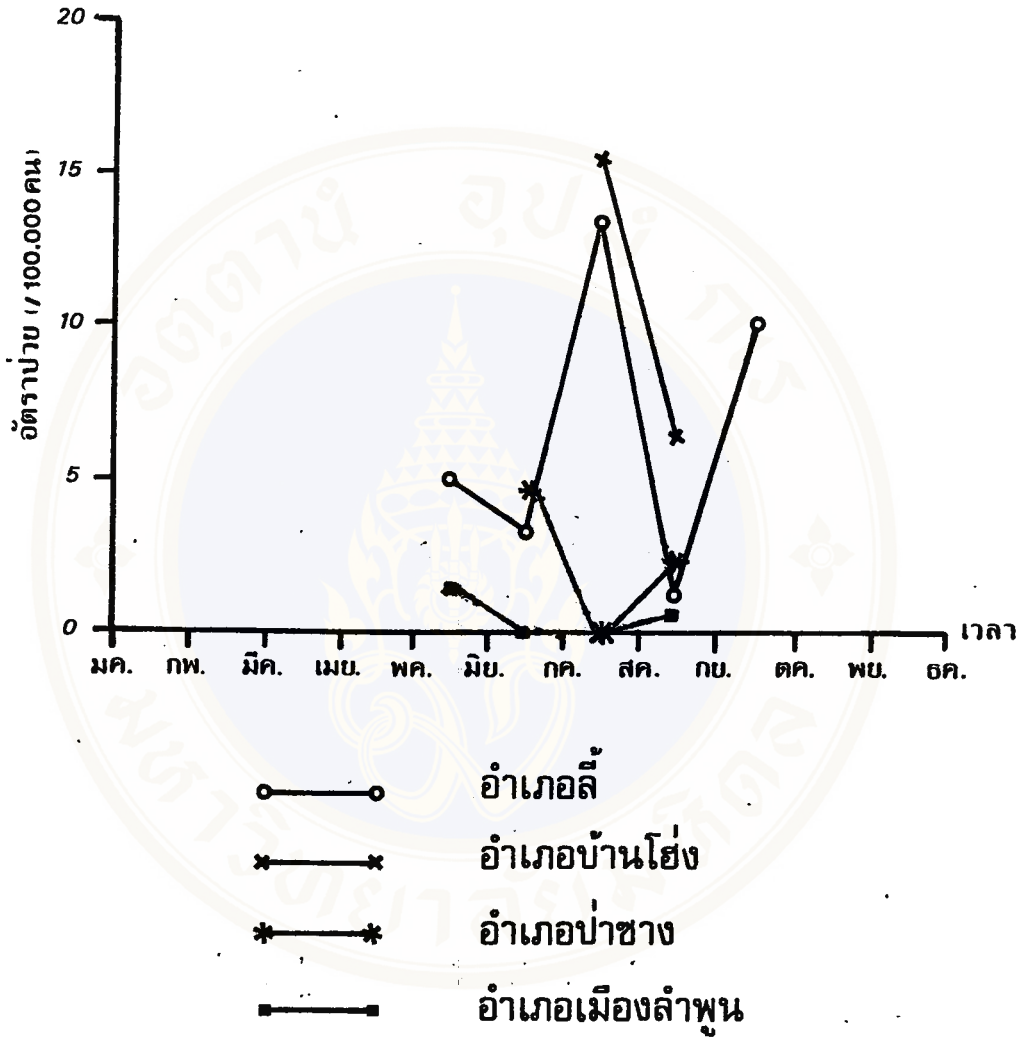
ระยะเวลาแต่ละเดือนที่พบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน พบว่าจะมีอัตราป่วยสูงสุดในเดือนกรกฎาคม คือ 4.1/100,000 ประชากร (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร โรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูน จำแนกตามระยะเวลาเป็นเดือน ตั้งแต่ มกราคม - ธันวาคม พ.ศ. 2532

Copyright by Mahidol University

อัตราป่วยโรคไข้เลือดออก ในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูน จำแนกรายเดือน ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 อัตราป่วยต่อ 100,000 ประชากร โรคไข้เลือดออกที่พบในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูน จำแนกตามระยะเวลาเป็นเดือน ตั้งแต่เดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ. 2532

หมายเหตุ ในช่วงเดือน มกราคม - มีนาคม และตั้งแต่เดือนตุลาคม - ธันวาคม จากรายงานฝ่ายระบาดวิทยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดลำพูน ไม่พบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกเลย

Copyright by Mahidol University

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะในการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการเฝ้าระวังโรคไวรัสเด็งกี่ ที่จังหวัดลำพูน ในรอบ 1 ปี คือ ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2532 - เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2532 นั้น ซึ่งนอกจากจะเป็นการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา โดยดูปัจจัยทางระบาดวิทยา ได้แก่ อายุ เพศ ระดับความรุนแรงของโรค ที่เกี่ยวข้องกับทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งแยกได้จากห้องปฏิบัติการและความสัมพันธ์ของระยะเวลา สถานที่ กับอัตราการเกิดโรคแล้ว ผลการศึกษายังได้รวมไปถึงการศึกษาอาการทางคลินิกของผู้ป่วยด้วย โดยจากผล HI Test พบว่าเริ่มมีผู้ป่วยตั้งแต่ปลายเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2532 ซึ่งเป็นช่วงที่ฝนเริ่มตก ไปจนถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2532 มีจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 39 ราย จากจำนวนผู้ป่วยที่แพทย์วินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออก 81 ราย และไม่เป็นไข้เลือดออกแต่มีอาการไข้ ซึ่งแพทย์ไม่แน่ใจว่าอาจจะเป็นไข้เลือดออกก็ได้อีก 50 ราย รวม 131 ราย ซึ่งเมื่อเทียบหาค่าความสามารถในการแยกผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจากผู้ป่วยทั้งหมด (Sensitivity) ของแพทย์คิดเป็นร้อยละ 61.54 และความสามารถในการแยกผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคไข้เลือดออก จากผู้ป่วยทั้งหมด (Specificity) ของแพทย์คิดเป็นร้อยละ 29.41 ประสิทธิภาพการตรวจโดยแพทย์คิดเป็นร้อยละ 74.36 สาเหตุที่ sensitivity ของแพทย์ต่ำกว่า HI test ก็เนื่องจากคนไข้บางรายมีอาการไม่เด่นชัด เช่น มีเพียงไข้ไม่ทราบสาเหตุ ก็อาจตรวจพบระดับแอนติบอดีย์โดยวิธี HI test และระบุว่าเป็นโรคไข้เลือดออกได้ ส่วน specificity ของแพทย์ต่ำก็เพราะมีโรคหลายโรคที่มีอาการคล้ายคลึงกับโรคไข้เลือดออก เช่น ไข้ไทฟอยด์ ไข้หวัด เลือดออกในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น และอื่น ๆ จึงยากที่แพทย์จะจำแนกว่า ผู้ป่วยใดไม่เป็นโรคไข้เลือกออกจริงได้อย่างถูกต้อง

ซีรั่มทั้ง 131 ราย มาจากโรงพยาบาลอำเภอลี้ 54 ราย โรงพยาบาลอำเภอบ้านโฮ่ง 46 ราย โรงพยาบาลอำเภอป่าซาง 20 ราย โรงพยาบาลจังหวัดลำพูน 7 ราย และโรงพยาบาลกึ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง 4 ราย ไม่พบซีรั่มที่มาจากโรงพยาบาลแม่ทาเลย จากผล HI test

Copyright by Mahidol University

โรงพยาบาลอำเภอลี้ พบผู้ป่วยจริง 20 ราย หรือร้อยละ 37.04
โรงพยาบาลอำเภอบ้านโฮ่ง พบผู้ป่วยจริง 10 ราย หรือร้อยละ 21.74
โรงพยาบาลอำเภอป่าซาง พบผู้ป่วยจริง 6 ราย หรือร้อยละ 30.00
โรงพยาบาลจังหวัดลำพูน พบผู้ป่วยจริง 3 ราย หรือร้อยละ 42.86
โรงพยาบาลกิ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง ไม่พบผู้ป่วยจริงเลย หรือร้อยละ 0

ในเขตอำเภอเมืองลำพูน พบผู้ป่วยเพียง 3 ราย ทั้งที่ควรจะพบมากกว่านี้ เนื่องจากเป็นเขตเทศบาลมีประชาชนอาศัยกันหนาแน่น ก็อาจเป็นเพราะจำนวนผู้ป่วยบางส่วนไม่ได้มารับการรักษาที่โรงพยาบาล แต่กลับไปรักษาตามคลินิกเอกชนจึงได้จำนวนผู้ป่วยน้อยกว่าความเป็นจริง

จากซีรั่มผู้ป่วยจริงตามผล HI test ทั้ง 39 ราย เป็นผู้ป่วยที่ผลการตรวจซีรั่มทั้ง acute และ convalescent serum ระบุว่าป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกจริง 29 ราย มีเฉพาะ acute serum แต่แยก ทัยป์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ 2 ราย และมีเฉพาะ acute serum ที่ผล HI สันนิษฐานว่าเป็นการติดเชื้อแบบทุติยภูมิ 8 ราย (ตารางที่ 8) และพบว่ามีอัตราป่วยสูงสุดในเดือนภรกฎาคม (ภาพที่ 16) ซึ่งคล้ายคลึงกับลักษณะทางระบาดวิทยาที่กองระบาดวิทยาได้รายงานในภาพรวมทั้งประเทศ ในปี พ.ศ. 2531 ที่ผ่านมา (16)

ภายหลังจากเดือนกันยายน พ.ศ. 2532 ไปแล้วปริมาณน้ำฝนลดลง และเริ่มต้นเข้าสู่ฤดูหนาว จากการติดตามการรายงานจำนวนผู้ป่วยในแต่ละโรงพยาบาลของจังหวัดลำพูน ไม่พบว่ามีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกอีกเลย ซึ่งลักษณะการพบจำนวนผู้ป่วยของจังหวัดลำพูน ในรอบ ปี พ.ศ. 2532 ก็ยังคงมีความคล้ายคลึงกับรายงานลักษณะการระบาดในรอบ 5 ปี ของจังหวัดลำพูน คือ พบจำนวนผู้ป่วยในช่วงฤดูฝน (เดือนเมษายน - เดือนกันยายน) เท่านั้น และลักษณะการระบาดของจังหวัดลำพูนจะเป็นแบบปีเว้นปี ซึ่งในปี พ.ศ. 2532 ก็พบว่ามีอัตราป่วยมากกว่าในปี พ.ศ. 2531 ประมาณ 5 เท่า (ปี พ.ศ. 2531 พบอัตราป่วย 1.7 ต่อ 100,000 ประชากร) แต่ไม่สูงเท่ากับปี พ.ศ. 2530 ซึ่งพบว่ามีอัตราป่วยสูงถึง 143.02 ต่อ 100,000 ประชากร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมและป้องกันโรคในปี พ.ศ. 2532 ของจังหวัดลำพูน บรรลุผลตามเป้าหมายของกรมควบคุมโรคติดต่อที่ตั้งเป้าเอาไว้ว่า ไม่ให้มีอัตราป่วยด้วยโรคนี้เกิน 85 ต่อ 100,000 ประชากร (18)

Copyright by Mahidol University

ในจำนวนผู้ป่วยทั้ง 39 ราย นั้น เมื่อนำมาทำการพิสูจน์แยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ พบว่า แยก ทัยป์ ได้ 3 ราย คิดเป็นอัตราการแยก ทัยป์ ได้ร้อยละ 7.70 คือเป็น ทัยป์ 1 จำนวน 1 ราย และ ทัยป์ 2 จำนวน 2 ราย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่จังหวัดระยอง ในระยะเวลา 5 ปี (พ.ศ. 2523 - พ.ศ.2527) โดย นาทีรัตน์ สังขวิภา และคณะ (63) จะมีความสอดคล้องกันของข้อมูล คือ จากการศึกษาที่จังหวัดระยองดังกล่าว ก็พบว่ามีเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 มากที่สุดถึงร้อยละ 45.09 รองลงมาคือ ทัยป์ 1 พบร้อยละ 31.37 ส่วน ทัยป์ 3 และ ทัยป์ 4 นั้นพบได้น้อยกว่า โดยมีอัตราการพบเท่า ๆ กัน คือ ร้อยละ 11.77 นอกจากนี้ผลการศึกษาที่จังหวัดลำพูนที่ได้นี้ ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของอนันต์ นิสาลักษณ์ และคณะ (57,64) ซึ่งศึกษาที่โรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2505 - พ.ศ. 2526 ที่พบว่ามีเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 มากที่สุดถึงร้อยละ 62 รองลงมาคือ ทัยป์ 1 แต่หลังจากปี พ.ศ. 2525 เป็นต้นมา จนถึงปี พ.ศ. 2526 กลับพบว่ามีเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1 ลดลง จนไม่พบเลยในปี พ.ศ. 2526 กลับพบ ทัยป์ 3 และ 4 ขึ้นมาแทน

จากผลการศึกษาการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยโรงพยาบาลรามาธิบดี ที่ สุธี ยกส้าน และคณะ (70) ได้ทำการศึกษา เมื่อปี พ.ศ. 2530 - พ.ศ. 2532 นั้น พบว่า ในปี พ.ศ. 2530 แยกได้ ทัยป์ 3 มากที่สุดถึงร้อยละ 86.11 รองลงมาคือ ทัยป์ 2 ร้อยละ 13.88 ส่วน ทัยป์ 1 และ 4 นั้น ไม่พบเลยในปีดังกล่าว ปี พ.ศ. 2531 แยกได้ ทัยป์ 2 มากที่สุดถึงร้อยละ 50.0 แยกได้ ทัยป์ 3 ร้อยละ 41.67 และพบ ทัยป์ 1 เพียง ร้อยละ 8.33 แต่กลับไม่พบ ทัยป์ 4 เลย และในปี พ.ศ. 2532 นั้น พบว่าแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 2 มากที่สุดถึงร้อยละ 57.14 และ ทัยป์ 3 พบร้อยละ 28.57 และ ทัยป์ 1 พบร้อยละ 14.29 แต่ไม่พบ ทัยป์ 4 เลยเช่นกัน

ถ้ามองจากภาพรวมทั้งประเทศแล้ว ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้จากผู้ป่วยในจังหวัดลำพูน ที่อยู่ในภาคเหนือก็ไม่ได้แตกต่างไปจากที่แยกได้ในแถบภาคกลางคือ กรุงเทพมหานคร และภาคตะวันออกคือ จังหวัดระยองเท่าใดนัก นั่นคือพบว่าเชื้อไวรัสทุกทัยป์ระบาดในประเทศไทยโดยเด็งกี่ ทัยป์ 2 ยังคงมีการระบาดอยู่มากในทุกภาคของประเทศไทย แต่ ทัยป์ 3 ซึ่งพบในแถบภาคกลางและภาคตะวันออก และมีบทบาทของ

Copyright by Mahidol University

การระบาดมากในช่วง ปี พ.ศ.2530-2531 ในเขตกรุงเทพมหานคร กลับไม่พบในจังหวัดลำพูน ทั้งนี้ก็อาจจะเป็นเพราะว่าจำนวนผู้ป่วยที่แยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ของจังหวัดลำพูนมีน้อยเกินไป ถ้าสามารถทำการพิสูจน์แยก ทัยป์ ได้มากกว่า 3 รายดังกล่าวแล้ว ก็อาจพบว่ามี ทัยป์ 3 ปะปนมาบ้างก็ได้

จากผลการศึกษาทั้งในเขตกรุงเทพมหานคร และที่จังหวัดลำพูนนั้น พบว่ามีการระบาดของเชื้อไวรัสเด็งกี่ทุกทัยป์ในประเทศไทย คล้ายคลึงกับในประเทศพม่า ซึ่งพบทุกทัยป์เช่นกัน โดยพบทัยป์ 2 ได้ในทุกภาคของประเทศ รองลงมาคือ ทัยป์ 3 ดังนั้นเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่กำลังเป็นปัญหาก่อให้เกิดการระบาดอยู่ทั่วไปในขณะนี้ คือ ทัยป์ ที่ 2 และ 3 ซึ่งในการพัฒนาด้านวัคซีนจึงต้องมุ่งในการปรับปรุงในทั้ง 2 ทัยป์นี้ให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น เพื่อส่งผลให้เกิดภูมิต้านทานภายหลังการฉีดวัคซีนต่อเชื้อไวรัส ทั้ง 2 ทัยป์ ที่กำลังเป็นปัญหาอยู่ในขณะนี้

อัตราการแยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ที่จังหวัดลำพูนมีผลต่ำกว่าที่อื่น ๆ น่าจะมีสาเหตุเนื่องมาจาก

1. ระยะเวลาในการเจาะเลือดช่วง acute stage จากผู้ป่วย พบว่า ในผู้ป่วยจากโรงพยาบาลรามาธิบดีนั้น มักจะทำการเจาะเลือดในช่วงเวลาไม่เกิน 1-3 วัน หลังวันเริ่มมีไข้ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยังมีเชื้อไวรัสเด็งกี่อยู่ในกระแสเลือด (Viremia) โดยไวรัสยังไม่ถูกลบล้าง (neutralize) ด้วยแอนติบอดีย์ที่ร่างกายสร้างขึ้นอย่างมากในวันที่ 4 ของโรค ถ้าเก็บตัวอย่างตรวจได้ใน 1-3 วันแรก โอกาสที่จะแยกเชื้อไวรัสได้จะมีมาก ถ้าตั้งแต่ 5 วันไปแล้วมักแยกเชื้อไม่ได้ (43) ผู้ป่วยทั้ง 3 ราย ที่แยกทัยป์ของไวรัสได้ มีระดับแอนติบอดีย์ต่อ Dengue และ JE ดังนี้

ระดับแอนติบอดีย์จาก HI Test

ผู้ป่วย	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	JE
คนที่ 1	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10
คนที่ 2	1:40	1:40	1:40	1:80	1:40
คนที่ 3	1:80	1:80	1:80	1:160	1:160

Copyright by Mahidol University

ซึ่งระดับแอนติบอดีย์ดังกล่าวมีค่าไม่เกิน 1:1,280 ดังนั้นจึงสามารถแยกทัยป์ของไวรัสได้ ส่วนมากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลต่าง ๆ ของจังหวัดลำพูน มีช่วงระยะเวลาเฉลี่ยของการเจาะเลือดหลังวันเริ่มมีไข้เป็น 4.82 ± 1.67 วัน (ตารางที่ 23) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5-6 วัน คิดร้อยละ 41.02 ดังนั้น ยิ่งมีการเจาะเลือดภายหลังวันเริ่มมีไข้ล่าช้าขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อไวรัสในซีรั่มก็จะลดลงเท่านั้น

2. วิธีการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำมาปั่นแยกซีรั่ม จะต้องทำการปั่นแยกเอาซีรั่มออกภายหลังเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 30 นาที หรือแช่เลือดไว้ในตู้เย็น 4° c ก่อนไม่เกิน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั่นแยกเอาซีรั่ม และดูดเอาเฉพาะซีรั่มใส่หลอดปิดฝาเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง (Freezer) ของตู้เย็นทันที แต่จากการติดตามสังเกตการณ์โดยการเข้าไปมีส่วนร่วมด้วยของผู้วิจัย พบว่าเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำโรงพยาบาลมักทิ้งตัวอย่างเลือดที่เจาะมาไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานานหลายชั่วโมงกว่าจะนำมาปั่นแยกเอาเฉพาะซีรั่ม ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณของเชื้อไวรัสเด็งกี่ลดลงและตรวจไม่พบได้

จากผลการวัดอุณหภูมิช่องแช่แข็ง ในแต่ละโรงพยาบาลและที่พักผู้ทำการวิจัย โดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ Liquid Crystral Digital Thermometer (LCD Thermometer) ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 42 อุณหภูมิเฉลี่ยของช่องแช่แข็งตู้เย็นที่ใช้เก็บซีรั่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ก่อนนำมาทำการแยก ทัยป์ เชื้อไวรัสเด็งกี่

สถานที่	อุณหภูมิ (° c)
โรงพยาบาลอำเภอลี้	-18.0
โรงพยาบาลอำเภอบ้านโฮ่ง	-23.7
โรงพยาบาลอำเภอป่าซาง	-13.2
โรงพยาบาลจังหวัดลำพูน	-11.2
ที่พักผู้ทำการวิจัย	-18.0

ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิช่องแช่แข็ง = -16.8° c

Copyright by Mahidol University

ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิดังกล่าวสูงกว่า -20° c ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บซีรั่มไว้ในช่องแช่แข็งตู้เย็น และสูงกว่า -70° c ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บซีรั่มที่มีเชื้อไวรัสเด็งกี่ก่อนนำมาพิสูจน์แยก ทัยป์ โดยการเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid N_2) หรือตู้ Deep Freezer

3. วิธีการส่งเอาซีรั่มจากช่องแช่แข็งตู้เย็นตามโรงพยาบาลต่าง ๆ มาเก็บในช่องแช่แข็งตู้เย็น ณ ที่พักผู้ทำการวิจัย ตลอดจนการนำซีรั่มจากที่พักผู้ทำการวิจัยส่งตรวจที่โครงการศูนย์พัฒนาวัคซีนฯ โดยใช้กระติกน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย -8 ถึง -10° c เมื่อมีน้ำแข็งอยู่เต็มตลอด มีผลทำให้ปริมาณของเชื้อไวรัสลดต่ำลงได้ เนื่องจากต้องอาศัยระยะเวลาในการขนส่งประมาณ 10 ชั่วโมง เพราะอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมจะยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส หรือทำให้ไวรัสตาย ดังนั้นอัตราการแยก ทัยป์ เชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลเพาะเลี้ยงจึงอาจลดลงได้เพราะสาเหตุนี้ร่วมด้วย

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรค กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้นั้น จะเห็นได้ว่า อายุและเพศ ไม่มีความสัมพันธ์กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนที่แยกได้มีน้อยเกินไป ไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ แต่จากผล HI Test นั้น ช่วงอายุ 5-9 ปี ยังคงมีอัตราป่วยสูงสุดถึง 35.7 ต่อ 100,000 ประชากร (ภาพที่ 12) ตรงตามลักษณะการระบาด ที่กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุขได้รายงานไว้ในรอบปี พ.ศ. 2528-2531 (16) และอัตราการป่วยของชายต่อหญิงก็ไม่แตกต่างไปจากภาพรวมทั้งประชากร คือ เฉลี่ยมีอัตราเท่า ๆ กัน สำหรับของจังหวัดลำพูนอัตราป่วยเพศชาย ต่อเพศหญิง เท่ากับ 1:1.30 (ตารางที่ 19) ซึ่งก็ใกล้เคียงกับ 1:1

ส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่มาโรงพยาบาล มีระดับความรุนแรงของโรคที่ไม่รุนแรงนัก คือ เกรด 1-2 มีถึง 25 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 89.74 ของทั้งหมด (ตารางที่ 39) ซึ่งในผู้ป่วยทั้ง 3 รายที่แยก ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ มีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในเกรด 2 ทั้งหมด ในผู้ป่วยที่มีอาการช็อก หรืออยู่ในระดับความรุนแรงของโรคเกรด 3-4 นั้น ไม่สามารถแยก ทัยป์ ของไวรัสเด็งกี่ได้เนื่องจากกว่าที่ผู้ป่วยจะเดินทางมารักษาตัวที่โรงพยาบาล ก็เป็นเวลาเฉลี่ย 3-4 วัน หลังมีไข้แล้ว และทั้ง 3 ราย ที่มีอาการช็อกได้รับการเจาะเลือดส่งตรวจครั้งแรกในวันที่ 5 ของการมีไข้ ซึ่งถือว่าเป็นระยะที่เชื้อ

Copyright by Mahidol University

ไวรัสที่ล่องลอยอยู่ในกระแสเลือดอย่างอิสระหมดไป เพราะจะถูกจับด้วยแอนติบอดีย์ที่ร่างกายสร้างขึ้นอย่างมาก ตั้งแต่วันที่ 4 ของโรค และจะลบล้างฤทธิ์ของไวรัสให้หมดไป ดังนั้นถ้ามีการเจาะเลือดผู้ป่วยที่มีอาการช็อกได้ในวันต้น ๆ ของการมีไข้ โอกาสที่จะแยกทัยป์ เชื้อไวรัสเด็งกี่ได้จะสูงยิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ สุธี ยกส้าน และคณะ (70) ที่โรงพยาบาลรามาธิบดี ในช่วงปี พ.ศ. 2530-2531 นั้น พบว่าแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ที่ 3 ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงถึง 4 ราย และในปี พ.ศ. 2532 แยกได้ ทัยป์ที่ 2 จำนวน 4 ราย โดยได้จากผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอยู่ในเกรด 3-4 2 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 50.0 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของนาทีรัตน์ สังขวิภา และคณะ (63) พบว่าในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง จะแยกได้เชื้อไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 2 มากที่สุด

อัตราป่วย แยกตามอำเภอในช่วงระยะเวลาเดียวกัน คือ ตั้งแต่เดือนเมษายน - เดือนกันยายน พ.ศ. 2532 นั้น พบว่า อัตราป่วยรายเดือนในแต่ละอำเภอมีความแตกต่างกัน และทุกอำเภอมีอัตราผู้ป่วยสูงสุดอยู่ในช่วงปลายเดือนมิถุนายน - เดือนกรกฎาคม ซึ่งก็เป็นเช่นเดียวกับภาพรวมการระบาดในทั่วประเทศ ในรอบ 5 ปีที่ผ่านมา และคล้ายคลึงกับรายงานย้อนหลัง 5 ปี (พ.ศ. 2527 - พ.ศ. 2531) ของจังหวัดลำพูนด้วย (18)

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งมีการระบาดในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูน พบว่า มีไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 1 ในอำเภอเมืองลำพูน และมีไวรัสเด็งกี่ทัยป์ 2 ในอำเภอบ้านโฮ่ง เมื่อเทียบกับการศึกษาในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดระยอง พบว่า เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2 มีบทบาทในจังหวัดลำพูนมาก ส่วนในเขตกรุงเทพมหานคร กลับพบว่ามี ทัยป์ 3 ในช่วงปี พ.ศ. 2530 มากกว่า คือ มีร้อยละ 86.11 แต่ในปี พ.ศ. 2531-2532 ในเขตกรุงเทพมหานครกลับพบ ทัยป์ 2 มากขึ้นถึงร้อยละ 50.0 และ 57.14 ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาที่จังหวัดลำพูน พอจะสนับสนุนภาพรวมการระบาดทั้งประเทศได้ว่า ในปี พ.ศ. 2532 นี้ เชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีการระบาดมากที่สุดคือ เชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 2

Copyright by Mahidol University

2. อายุ เพศ และระดับความรุนแรงของโรค ไม่มีความสัมพันธ์กับ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่แยกได้ ที่ p-value < 0.05

3. เดือนมกราคมเป็นเดือนที่พบว่ามีอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดลำพูนสูงสุด 4.1 ต่อ 100,000 ประชากร

4. อัตราป่วยรายเดือนด้วยโรคไข้เลือดออกในแต่ละอำเภอของจังหวัดลำพูนมีความแตกต่างกัน

จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า ยิ่งมีการเจาะเลือดตรวจ ในระยะมีไข้ (Viremia) รวดเร็วขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อไวรัสเด็งกี่และแยก ทัยป์ ได้ก็จะยิ่งมากขึ้นเท่านั้น โดยเฉพาะใน 1-3 วันแรก (43)

ข้อเสนอแนะจากการทำวิจัย

1. ควรมีการติดตามผลการศึกษาในปีต่อไปดูว่า มีการเปลี่ยนแปลง ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในจังหวัดลำพูนไปจากเดิมหรือไม่ อย่างไร เพื่อใช้ทำนายความรุนแรงของการระบาดของโรคในปีต่อไปได้

2. ควรมีการเจาะเลือดส่งตรวจ 2 ครั้ง ทั้งในระยะมีไข้ (Acute Stage) และในระยะพักฟื้นจากไข้ (Convalescent Stage) เพื่อสามารถสรุปผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี HI Test ได้ว่าเป็นผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจริง ทั้งนี้เพราะจากจำนวนที่มีเฉพาะครั้งแรกครั้งเดียว และมีระดับแอนติบอดีย์ ≤ 1:1280 มีจำนวนถึง 52 ราย หรือร้อยละ 39.69 ซึ่งไม่สามารถแปลผลการวิจัยได้

นอกจากนี้ระยะเวลาในการเจาะเลือดทั้ง 2 ครั้ง ควรห่างกันไม่น้อยกว่า 7 วัน ทั้งนี้ก็เพราะถ้าระยะเวลาการเจาะเลือดครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งที่ 1 น้อยกว่า 7 วัน และระดับแอนติบอดีย์ค่อนข้างต่ำคือ ไม่เกิน 1:1280 นั้น จะไม่สามารถแปลผลการวิจัยได้เช่นกัน ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่ามี 23 ราย หรือร้อยละ 17.56 เพื่อสามารถแปลผลการตรวจได้ว่าเป็นโรคไข้เลือดออกจริงมากน้อยเท่าใด ก็จะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ผู้วินิจฉัยว่า ได้วินิจฉัยถูกต้องมากน้อยเพียงใด และเพิ่มความมั่นใจในการตรวจและให้แผนการรักษาให้ถูกต้องขึ้น อันจะส่งผลประโยชน์ต่อเนื่องไปยังผู้ป่วยที่ได้รับการศึกษาอย่างถูกต้องต่อไป

Copyright by Mahidol University

3. ระยะเวลาที่เหมาะสมที่แพทย์จะสั่งแผนการรักษาให้เจาะเลือดตรวจครั้งแรกควรไม่เกินวันที่ 3 ของการมีไข้ เพราะเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือดได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ถ้ามีการเจาะเลือดภายหลังเริ่มมีไข้นานขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะแยก ทัยป์ ไวรัสได้ก็จะลดลงเท่านั้น

4. โรงพยาบาลในแต่ละเภอ ควรส่งผู้ที่มีหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการเข้าร่วมประชุมกับทางสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด เพื่อซักถามรายละเอียดในการเก็บตัวอย่างเลือดที่ถูกต้องและตรงกัน ก่อนลงมือปฏิบัติจริง ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการสูญเสียปริมาณของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในซีรั่มลง ซึ่งถ้าหากทำการวิจัยต่อไปก็อาจแยก ทัยป์ ของไวรัสเด็งกี่เพิ่มขึ้นกว่าเดิมได้

5. ควรมีการให้ความรู้แก่ประชาชน ก่อนฤดูกาลระบาดของโรค เพื่อให้ประชาชนตระหนักถึงความสำคัญและอันตรายของโรค และตื่นตัวที่จะมาตรวจรักษา ณ โรงพยาบาลใกล้บ้านเสียตั้งแต่แรก ๆ ที่เริ่มมีอาการ ซึ่งโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดก็จะมากขึ้นกว่าเดิม

6. ควรใช้ถังไนโตรเจนเหลว เพื่อทำการขนส่งเอาซีรั่มจากช่องแช่แข็งในแต่ละโรงพยาบาลส่งโครงการศูนย์พัฒนาวัคซีน เพื่อลดปัญหาการสูญเสียปริมาณของเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในซีรั่ม เนื่องจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง

7. ควรมีการศึกษาย้อนหลัง (Retrospective study) เก็บข้อมูลในระดับหมู่บ้าน ในกลุ่มผู้ป่วยว่าได้มีการป้องกันการเกิดโรคก่อนหน้าการระบาดหรือไม่อย่างไร โดยเจ้าหน้าที่สาธารณสุข เช่น การใส่ทรายอะเบท หรือการพ่นหมอกควัน เพื่อจะได้ช่วยประเมินประสิทธิภาพการควบคุมและป้องกันโรคของทางจังหวัดต่อไป

8. ผู้วิจัยควรไปรายงานผลการวิจัยให้ทางหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของจังหวัดลำพูนได้ทราบผล เพื่อเป็นการตื่นตัวในการทำงานทั้งในระดับจังหวัดและระดับอำเภอ รวมทั้งได้มีการวางแผนร่วมมือกันเพื่อการศึกษาต่อไปในอนาคต

Copyright by Mahidol University

บรรณานุกรม

1. ประเสริฐ ทองเจริญ. ไข้เลือดออก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์อักษรสมัย, 2520.
2. P.E.C. Manson-Bahr & DR.Bell editer. Manson's Tropical Diseases. 19th edition. England: English Language Book Society/Bailliere Tindall, 1987 : 133-134.
3. Adams & Maegraith. Clinical Tropical Diseases. Brain Maegraith 7th edition. Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1980 : 530-533.
4. Chan Kai Lok. Singapore's Dengue Haemorrhagic Fever Control Programme: A case study on the successful control of **Aedes aegypti** and **Aedes albopictus** using mainly environmental measures as a part of intergrated vector control. SEAMIC. Tokyo, 1985 : 1-2.
5. William T. Hubbert, William F. Meculloch and Paul R. Schunrrenberger. Disease Transmitted from Animal to Man, 6th edition. Illinois. U.S.A.: Charles C. Thomas Publisher, 1975 : 292-297.
6. Hunter/Swartzwelder/Clyde. Arbovirus Infection. Tropical Medicine, 5th edition. England: WB. Saunders Company. Philadelphia-London-Newyork, 1967. p.27-32.
7. Bernard N. Fields editer. Field Virlolgy. Newyork England: Raven Press, 1985 : 942-992.
8. สมศักดิ์ พันธุวัฒนา. ไวรัสวิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: โครงการตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, 2521 : 39-41.
9. Paul D. Hoeprich editor. Infections Diseases. 3rd edition. (Copyright 2). England: Harper & Rew Publishers, 1983. : 844-855.

Copyright by Mahidol University

10. Kenneth S. Warren and Adel A.F. Mahmoud. Tropical and geographical Medicine. (Copyright 2): chapter 69 Dengue Mc. Graw-Hill Book Company, 1984 : 652-659.

11. Donals S. Burke et al. A prespective study of dengue infections in Bangkok. American Journal of Tropical Medicine, 1988 : 172-180.

12. Halstead SB., Scanlon JE, Umpaivit P. et al. Dengue and Chikungunnya virus infection in man in Thailand. 1962-1964. (IV) Epidemiological studies in Bangkok. American Journal Tropical Medicine, 1969. (18) : 997-1021.

13. ฝ่ายประเมินผล กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข. Report cases of and deaths From fengue Haemorrhagic Fever in various Provinces of Thailand, 1958-1987 (เอกสารอัดสำเนา)

14. Jetanasen, S. Occurrence of Hermorrhagic Fever in Thailand, 1958-1964. Bull. WHO, 1966 : 79.

15. คำนวณ อึ้งชูศักดิ์. "ระบาดวิทยาของไข้เลือดออกในประเทศไทย." ใน นลินี อัศวโภคี และคณะ. การอภิปรายหมู่เรื่อง Dengue Haemorrhagic Fever: 1987. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เมดิคัลมีเดีย, 2530 : 10-18.

16. ฝ่ายประเมินผล กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข. รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์. 20(10), 2532 : 114-121.

17. บัญชีแยกโรคผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (E_1) ของจังหวัดลำพูน. ปี พ.ศ. 2510-2531. (เอกสารอัดสำเนา)

18. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดลำพูน. แผนปฏิบัติงานควบคุมโรคไข้เลือดออก/ไข้สมองอักเสบ จังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2532.

19. Sangkawibha N. A Prospective epidemiology study of Dengue Haemorrhagic Fever in Thailand, 1980-1984. A complete report of the WHO collaborative research project.

20. กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข. ทบทวนสถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทย พ.ศ. 2521-2530 : 1-29.

Copyright by Mahidol University

21. World Health Organization. Dengue Haemorrhagic Fever: diagnosis, treatment and Control. England: Macmallian/ Clays, 1986 : 1-58.

22. Y.H. Bang. Integrated disease vector control and community Participation. Principles lecture notes. (Copy) : 1-9.

23. Halstead S.B. Nimmannitya S. and Coheu SN. Observations related to pathogenesis of dengue haemorrhagic fever (IV) Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. Yale J. Biol. Med, 1970: 42 : 311-328.

24. Leon Rosen. "The Global importance and epidemiology of Dengue Infection and disease." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 1-6.

25. Halstead SB. "Pathogenesis of Dengue, new knowledge depends upon epidemilological and clinical studies." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983. : 34-39.

26. วินัย สุวัตถี "ความรู้ปัจจุบันเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคของโรคไข้เลือดออก." ใน นลินี อัศวโภคี และคณะ. การบรรยายหมู่เรื่อง Dengue Haemonhagic Fever:1987. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เมดิคัลมีเดีย, 2530 : 24-37.

27. World Health Organization. "Dengue Haemorrhagic Fever." In Viral Haemorrhagic Fevers. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1985 : 14-24.

28. Chaiyan Kampanartsanyakorn. "Epidemiology of Dengue Haemorrhagic Fever with reference to its pathogenesis." In Conference on Dengue Haemorrhagic Fever Current Knowledge, 1976. SEAMEO-TROPMED Project. Bangkok, 1977.

Copyright by Mahidol University

29. Halstead S.B. "Immunologica enhancement of Dengue infection." In conference on Dengue Haemorrhogic Fever current knowledge, 1976. SEAMEO-TROPMED Project. Bangkok, 1977 : 59.

30. Sumarmo. "Death due to blood loss in Dengue Haemorrhagic Fever (Report of 5 cases)." In conference on Dengue current knowledge, 1976. SEAMEO-TROPMED Project. Bangkok, 1977 : 12.

31. Nimmannitya S. "Dengue Haemorrhagic Fever: Clinical aspect." In conference on Dengue current knowledge, 1976. SEAMEO-TROPMED. Bangkok, 1977 : 23-26.

32. Suwanik R., Tuchinda P., Tuchinda S., et al. Plasma and other third space studies in Thai Haemorrhagic Fever. J. Med Assoc. Thai 1967: 50 : 48-66.

33. สุจิตรา นิมมานนิตย์. "Dengue Haemorrhagic Fever with unusual manifestations." ใน นลินี อัศวโภคี และคณะ. การอภิปรายหมู่เรื่อง Dengue Haemorrhagic Fever: 1987. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เมดิคัลมีเดีย, 2530 : 44.

34. Boonluan Phanthumachinda et al., Approaches for community participation in **Aedes Aegypti** control, Phanus Nikhom District, Chonburi Province, Thailand. Mosq. Born Dis. Bull, 1985 (2). p.1-16.

35. Edward R. Laws, et al. Field study of the safety of Abate for treating potable water and observations on the Effectiveness of a control programme involving both Abate and Malathion. Bull. Org. mond. Sante & Bull WHO, 1968: 38 : 439-445.

36. World Health Organization. Clinal diagnosis of Dengue Haemorrhagic Fever: Geneva, 1986 : 1-15. (เอกสารอัดสำเนา)

Copyright by Mahidol University

37. Clarke. D.H. and Casals J. Technique for Haemagglutination and Haemagglutination Inhibition with Arthropod borne viruses. Amer. J. of Trop. Med., 1958 (7) : 561-573.

38. Halstead S.B. Dengue Haemorrhagic Fever: A public health problem and a filed for research. Bull WHO (58), 1980 : 1-21.

39. Simmons J.S., St. John JH., and Reynold. PHLC. Experimental studies of dengue. Phillip Journal Science, 1931. (44): 1-251.

40. World Health Organization. General guidelines for community participation in the control and prevention of vectors of Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever in Tropical Asia, WHO. Project, 1984 : 1-21.

41. Y.H. Bang and N.K. Shah. "Review of DHF situation and control of **Aedes Aegypti** in South-east Asia." In Dengue Newsletter. WHO. Dec 1987, vol 13 : 1-3.

42. Sujarti Jatanesen. "DHF situation and DHF activities in the South-East Asia region in 1988." In Dengue Newsletter. WHO. Feb 1989. vol 14 : 1-2.

43. จันทะพงษ์ วะสี บรรณาธิการ. ไวรัสวิทยาการแพทย์ 2530. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์อักษรสมัย (คอมพิวกราฟฟิค), 2530 : 178-192.

44. Lewis Markoff. In vitro processing of Dengue viris structural protein: Cleavage of the pre-membrane protein. Journal of Virology, Aug 1989 : 3345-3352.

45. Pairatana Gunakasem. Plasma and serum as sources of Dengue Virus in Dengue Haemorrhagic Fever patient. Bull. AFRIMS : 8.

46. Sabin, A. A research on Dengue during World War II. Amer. J. Trop. Med Hyg (1) : 30-50.

Copyright by Mahidol University

47. Hammon, W.M., Rudnick, A. and Sather, G.E., Viruses associated with Haemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand Science (131) : 1102-1103.

48. Russel P.K. "Dengue Virus Antigen" In Conference on Dengue Haemorrhagic Fever current knowledge 1976, SEAMEO-TROPMED. Bangkok, 1977 : 70-71.

49. Donald S. Burk. "Rapid method in the laboratory diagnosis of Dengue virus infections." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, sep 1-3, 1983. : 72-73.

50. Hanchal E.A., et al. "Recent advances in the molecular biology of the dengue viruses." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, sep 1-3, 1983 : 47.

51: จันทะพงษ์ วะสี Dengue Haemorrhagic Fever: Virology and laboratory diagnosis, มปท. : 1-10. (เอกสารอัดสำเนา)

52. Bhamarapravati N. The spectrum of pathological changes in Thai Haemorrhagic Fever. SEATO Med. Res. Monograph No.2, Proc, Symp. Thai Haemorrhagic Fever : 76-84.

53. Russels et al. An insular outbreak of Dengue Haemorrhagic Fever (II) : Virologic and serologic studies. Amer. J. Trop. Med., 1968 (17) : 609.

54. สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ บรรณาธิการ. อิมมูโนวิทยา (พิมพ์ครั้งที่ 3) กรุงเทพ-มหานคร: โรงพิมพ์อักษรสมัย, 2529 : 101.

55. สุธี ยกส้าน. วัคซีนไข้เลือดออก. (ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

56. Halstead S.B., et al. Epidemiological studies of Thai Haemorrhagic Fever 1962=1964. Bull. WHO, 1966. (35) : 80.

Copyright by Mahidol University

57. C. Hoke, et al. "Dengue serotypes isolated from Hemorrhagic Fever patients at Bangkok Children's Hospital, 1962-1983." In Proceeding International Confercence on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 166-170.

58. Albert Rudnick. "The ecology of the Dengue virus complex in Peninsular Malasia." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 12-13.

59. Chatiyanonda Kamai and Ahandarik Sompop. "Dengue Haemorrhagic Fever surveillance in Thailand." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 159-164.

60. Igarashi et al. "Isolation of Dengue and Japanese Encephalitis Virus from patients in Chiang Mai area, Thailand, in the year of 1982." In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 179-190.

61. Suharyono W and Lubis I. "Virological surveillance of Dengue Haemarrhage Fever in Indonesia 1980-1983" In Proceeding International Conference on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever , Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 124-127.

62. สุนทรี โรจน์สุพจน์ และวัฒนาอู่วานิชย์. การศึกษาระบาดวิทยาของโรคไข้เลือดออก จังหวัดระยอง: การแยกเชื้อไวรัสจากผู้ป่วย และยุงพาหะ. (ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

63. Nadhirat Sangkawibha, et al. Risk factors in Dengue Shock Syndrome: A prospective epidemiological study in Rayong, Thailand. Amer. J of Epid. Vol 120 (5), 1984 : 653-669.

64. อนันต์ นิสาลักษณ์ และวัฒนา อู่วานิชย์. การแยกเชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยโรงพยาบาลเด็ก กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2505-2530. มปท. (เอกสารอัดสำเนา)

Copyright by Mahidol University

65. Igarashi. A., et al. "Isolation of Dengue Virus from patients of Dengue Haemorrhagic Fever and Fever of unknown origin in Jakarta, Indonesia, in the year of 1981 and 1982." In Proceeding International Conference on Dengue'Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983, : 133-140.

66. Tissa Vitavana and Nalini Jayasekera. "A Study Dengue In A low DHF Area-Sri Lanka." In Proceeding International Conference on Dengue'Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 103-107.

67. Norazizah Mohd Taib, et al. "The 1982 Outbreak in Malasia: The University Hospital Experiance." In Proceeding International Conference on Dengue'Dengue Haemorrhagic Fever. Kuala Lumpur, Malasia, Sep 1-3, 1983 : 88-98.

68. Thelma E. Tupasi, et al. "Virological and clinical studies in Dengue Infection in the PhiLippines." In Dengue NewSletter. WHO DEC 1987, vol 13 : 89.

69. Do Quang Ha, et al. "Epidemic Dengue Haemorrhagic Fever in South Viet Nam, 1987: Epidemiological and virological studies." In Dengue NewSletter. WHO. FEB 1989, vol 14 : 46-57.

70. สุธี ยกส้าน และคณะ. การแยก type เชื้อไวรัสเด็งกี่จากผู้ป่วยโรงพยาบาลรามาธิบดี ปี พ.ศ. 2530-2532. (ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

71. สำนักงานสถิติแห่งชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี. สมุดรายงานสถิติ จังหวัดลำพูน กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, 2526 : 1.

72. สำนักงานสถิติแห่งชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี. (ติดต่อเป็นการส่วนตัว)

73. Royle A. Hawkes. "General principles underlying laboratory diagnosis of Viral Infections in Viral, Rickettsial and Chamydial Infection : 22-25.

Copyright by Mahidol University

74. World Health Organization. "Laboratory etiological investigation in man, vectors and reseviors." In Viral Haemorrhagic Fever. Refort of A WHO Expert Committee. Geneva, 1985 : 14-24.

75. Thomas M. Yuill, et al. Dengue virus recovery by direct and delayed plaques in LLC-MK_2 cell. Am. J. Trop Med. Hyg, 1987, 17 : 441-448.

76. Robert B. Tesh. A Method for the isolation and identification of Dengue virus using mosquito cell culture. Am. J. Trop Med. Hyg. 28(6) 1979 : 1053-1059.

77. สรุปรวบรวมเทคนิควิธีการทำ LAB ทางไวรัสเด็งกี่ของโครงการศูนย์พัฒนาวัคซีน มปท. (เอกสารอัดสำเนา).

78. Rojanasuphot S. A manual of Plaque Reduction Neutralization Test For Dengue Virus by semi-micro method in LLC-MK_2 Cells. Bangkok Virus Research Institute, Department of Medical Science, 1982 : 1-40.

79. R.L.P. Adams. Cell culture for biochemists. Elsevier/North-Halland Biomedical Press Amsterdam, New York. 1980 : 1-254.

80. Nathalie J. Schmidt. "Cell culture technique for diagnostic Virology" in Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection, : 65-133.

81. Goldman, M. Fluorescent antibody methods. Academic Press New York, 1960 : 178-106.

82. T.P. Monath, et al. Indirect fluorescence antibody test for the diagnosis of Yellow Fever. Vector Borne Research Division, Bureau of Laboratory Center for Disease Control Public Health Survice U.S. (Copyright) : 1-11.

Copyright by Mahidol University

83. E.A. Henchal, M.K. Gentry, J.M. Mccawn., and W.E. Brandt. Dengue Virus-Specific and Flavivirus Group Determinants identified with Monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am. J. Trop. Med. Hyg 3(4), 1982 : 830-836.

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ก

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ก

I. แบบฟอร์มใบขอส่งเลือดตรวจทางไวรัสวิทยา (สำหรับผู้แพทย์ผู้ตรวจเป็นผู้กรอกเท่านั้น)

ARBOVIRUS LABORATORY REQUEST FORM

(สำหรับแพทย์ผู้ตรวจเป็นผู้กรอก)

Name of patient..... Age.....

Adress.....

Hospital..... Hospital No. .....

Date of admission.....Date of onset of fever.....

Clinical findings:

1. Fever.....C^{o} Duration.....days
2. Tourniquet test.....Petechiae.....Epistaxis.....
   Hematemesis/melena.....Other Bleedings (describe).....
3. Hepatomegaly.....(cm at RCM) Tenderness.....
4. Shock.....B.P..... mmHg. Pulse...../min
   Resstlessness/Lethargy.....Coldness of extremities/body....

Clinical laboratory findings:

Platelets ($x10^{3}$).....mm^{3} (on.....day of illness)

Hematocrit (%).....(max).....(min)

Blood specimens

Acute: Date.....

Convalescent: Date.....

Requested by.....Date.....

DVDP 42

Copyright by Mahidol University

II. แบบฟอร์มใบแจ้งผลการตรวจเลือดทางโลหิตวิทยาและทางไวรัสวิทยา
(สำหรับเจ้าหน้าที่โครงการศูนย์พัฒนาวัคซีนเป็นผู้กรอก)

ARBOVIRUS LABORATORY REPORTING FORM

Center for Vaccine Development

Mahidol University at Salaya

To: Physician..... Hospital.....

Patient..... Hospital No. .....

Address.....

.....

Specimen Code No..... Date received.....

Results

Date received specimens	HI titer				
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	JE

Virus isolation.....

Virus identification.....

Interpretation: .....

.....

.....

Reported by..... Date: .....

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ข

Copyright by Mahidol University

วิธีการทำ HI test

1. การเตรียม 20% Virus Seed (Dengue virus infected suckling mouse brain)

สารเคมีที่ใช้: 0.4% Bovine albumin borate saline (0.4% BABS)

อุปกรณ์ที่ใช้: 1 Homogenizer

2. Refrigerated centrifuge

Material: สมองหนูที่มีเชื้อไวรัส (infectious suckling mouse brain)

วิธีการ: ชั่งสมองหนูที่มีเชื้อไวรัส (infectious suckling mouse brain) 1 กรัมในตู้ เพื่อใส่ลงใน 0.4% Bovine albumin borate saline (BABS) 5 ซีซี คิดเป็น 20% นำไปปั่นให้เข้ากันโดยใช้ Homogenizer ที่ 3000 รอบ/นาที นาน 1 นาที x 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้พัก 1 นาที แล้วนำไปปั่นต่อที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4° c เพื่อให้ตกตะกอน ดูดเอาสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองไว้หลอดละ 0.5 ซีซี เก็บในตู้ -70° c เพื่อนำไปฉีดในหนูทดลองต่อไป

2. การเพิ่มจำนวนไวรัส (virus replication) ในสมองหนู

สารเคมีที่ใช้: Normal saline solution (NSS)

อุปกรณ์ที่ใช้: เข็มเบอร์ 26G และ syringe ขนาด 1 ซีซี

Material: suckling mice อายุ 1-2 วัน

วิธีการ: ฉีด 20% virus seed ที่เจือจางในน้ำเกลือ Normal saline solution 50 เท่า เข้าสมองของลูกหนูที่มีอายุ 1-2 วัน ด้วยเข็มเบอร์ 26G จำนวน 0.1 ซีซี แล้วสังเกตดูวันที่ลูกหนูมีอาการป่วย

จากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาที่ลูกหนูมีอาการป่วยขึ้นกับ ทัยป์ และปริมาณของไวรัส ดังนี้

DEN-1	ใช้เวลา	5-6	วัน
DEN-2	ใช้เวลา	4	วัน
DEN-3	ใช้เวลา	6-7	วัน
DEN-4	ใช้เวลา	4	วัน
JE	ใช้เวลา	2-3	วัน

Copyright by Mahidol University

เมื่อพบว่าลูกหนูมีอาการป่วย (ซึม ไม่ดูดนม) แล้ว นำลูกหนูที่ป่วยแช่ไว้ในตู้ -70° c หรือแยกเอาแต่สมองลูกหนูแช่ที่ -70° c ก็ได้

3. **การสกัดเอาไวรัสแอนติเจนจากสมองหนู โดยวิธี Sucrose acetone extraction (SAE)**

สารเคมีที่ใช้: 1. 8.5% Sucrose solution
2. อะซีโตนแช่เย็นที่ 4° c
3. Normal saline solution

อุปกรณ์ที่ใช้ 1. เข็มเบอร์ 21G และ syringe ขนาด 10 ซีซี
2. Refrigerated centrifugue
3. Tenbruck grinder ใช้สำหรับบดสมองหนู
4. Suction pump

Material: สมองหนู

วิธีการ: ชั่งสมองลูกหนูที่ได้ จดจำนวนน้ำหนักไว้ ใส่ลงในหลอดแก้วที่แช่ในกระบะใส่น้ำแข็ง เติม 8.5% Sucrose solution ลงไปเป็นจำนวน 4 เท่า ของน้ำหนักที่ชั่งได้ นำไปปั่นให้เข้ากันที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที หยุด 1 นาที 3 ครั้ง ใช้กระบอกฉีดยาและเข็มเบอร์ 21 ดูดส่วนผสมดังกล่าวฉีดพ่นลงในอะซีโตนแช่เย็นที่ 4° c (อะซีโตน 20 ซีซี/น้ำหนักสมองหนู 1 กรัม) แล้วเขย่าไปมาให้เข้ากัน และนำไปปั่นที่ 2,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 4° c โดยใช้ Refrigerated centrifuge เมื่อปั่นครบเวลาแล้ว เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมอะซีโตนแช่เย็นลงไปทิ้งไว้ในกระบะน้ำแข็งนาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงเทอะซีโตนทิ้ง เก็บส่วนของสมองที่สกัดได้จากก้นหลอดแก้วมาบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด เติมอะซีโตนแช่เย็นซ้ำ ปั่นต่อที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ใน Refrigerated centrifuge เทอะซีโตนทิ้งเติมน้ำเกลือ NSS เป็นจำนวน 2 เท่าน้ำหนักสมองหนู ทิ้งไว้ที่ 4° c นาน 1 คืน นำมาปั่นต่อที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเอาสารละลายส่วนบนเก็บไว้ที่ -70° c เพื่อใช้เป็นไวรัสแอนติเจนต่อไป

แต่ก่อนที่จะนำมาใช้ จะต้องมีการตรวจเช็คไตเตอร์ของไวรัสแอนติเจนเสียก่อน โดยวิธี Haemagglutination (HA) Test

Copyright by Mahidol University

4. การตรวจหาไตเตอร์ของไวรัสแอนติเจน โดยวิธี Haemagglutination (HA) test และทำ 16HA of antigen concentration

การเตรียม 8% Goose red blood cell (GRBC)

สารเคมีที่ใช้: 1. Alsever solution
2. Dextrose-gelation-veronal (DGV)
3. Normal saline solution

อุปกรณ์ที่ใช้: 1. เข็มเบอร์ 21G หรือเบอร์ 18G
2. Syringe 10 ซีซี
3. เครื่องปั่น (centrifuge)
4. หลอดแก้ว, ปิเปต

Material: ห่านตัวผู้

วิธีการ: เจาะเลือดห่านบริเวณเส้นเลือดดำใต้ปีก โดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีสารกันเลือดแข็งตัว ชื่อ Alsever solution และเข็มเบอร์ 21G จำนวน 10 ซีซี ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีสารกันเลือดแข็งตัวดังกล่าวอยู่ นำมาแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนหนึ่งทิ้งให้ตกตะกอน ล้างด้วย NSS เพื่อนำส่วนของเม็ดเลือดแดงไปใช้ในขั้นตอนที่ 5 ต่อไป อีกส่วนที่เหลือนำไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที 10 นาที เทส่วนที่เป็นซีรัมทิ้งไปใส่ Dextrose-gelatin-veronal (DGV) ลงไปประมาณ 3 เท่าของจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอด นำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อล้างและขจัดเอา Alsever solution ออกจากเม็ดเลือดแดงห่าน เติม DGV ลงในเซลเม็ดเลือดแดงห่าน เพื่อทำให้เป็น 8% GRBC โดยเซลเม็ดเลือดแดงห่าน 1 ซีซี ต้องใช้ DGV 11.5 ซีซี วัดค่า optical density (O.D.) ณ ช่วงคลื่น 490 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ 8% GRBC ที่เหมาะสมกับการใช้งานต่อไป (ก่อนวัดต้องเจือจาง 8% GRBC ด้วย NSS เพื่อให้ได้ค่า OD ใกล้เคียง 490 นาโนเมตร)

Copyright by Mahidol University

การหาไตเตอร์ของแอนติเจน

สารเคมีและ Material ที่ใช้:

1. Sucrose acetone extract virus antigen ที่ต้องการทราบค่าไตเตอร์ใน pH ต่าง ๆ
2. 0.4% BABS (diluent)
3. Virus adjust diluent (VAD) ที่ pH 6.2, pH 6.4, pH 6.6 และ pH 6.8
4. 8% GRBC

อุปกรณ์ที่ใช้

1. 96 wells plate (U-shape) ของ titer tek
2. dropper ขนาด 50 ไมโครลิตร
3. หลอดแก้ว, ปิเปต

วิธีการ:

ทำการเจือจางไวรัสแอนติเจนด้วยสารละลาย 0.4% BABS ในหลอดทดลองแบบ 2 fold dilution ตั้งแต่ 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, ... จนถึง 1:5120 ตามลำดับ แล้วหยดแอนติเจนที่เจือจางในระดับต่าง ๆ กันนี้ลงในถาด 96 หลุมรูปตัวยู (96 wells plate) หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยเริ่มจากหลุมที่มีความเจือจางมากสุดไปจนถึงน้อยสุด

เตรียม virus adjust diluent (VAD) ที่ pH 6.2, 6.4, 6.6 และ 6.8 และ ใส่หลอดทดลองไว้ 4 หลอด หยด 8% GRBC ผสมกับ VAD pH ต่าง ๆ กันในแต่ละหลอดจาก pH สูงไปต่ำ โดยให้ความเข้มข้นของ 8% GRBC : VAD เป็น 1:24 แล้วดูดส่วนผสมดังกล่าวเติมลงในหลุมที่มีแอนติเจนอยู่ จากหลุมที่มีไวรัสแอนติเจนเจือจางน้อยสุดไปจนถึงมากสุด เพื่อให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงของตะกอนได้ นำไปไว้ในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37° c นาน 45-60 นาที

Copyright by Mahidol University

การแปลผล

ผลบวก (+) = เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มกันอย่างสมบูรณ์เป็นวงกว้าง (complete agglutination)

ผลบวกบางส่วน (±) = เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มกันอย่างไม่สมบูรณ์ (incomplete agglutination)

ผลลบ (-) = เม็ดเลือดแดง เกิดการตกตะกอนเป็นรูปเม็ดกระดุม (no agglutination)

ค่าเจือจางสูงสุด ณ pH ใด ที่ยังคงอ่านได้ผลบวก ถือว่าเป็นค่าไตเตอร์ของแอนติเจน ณ pH นั้น

การทำ 16 HA of antigen concentration

หารค่าไตเตอร์ที่ได้ด้วย 16 จะได้ผลลัพธ์เป็น ค่าเจือจางของแอนติเจนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 16 ยูนิต

นำสารละลายแอนติเจนที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 16 ยูนิต ดังกล่าวมาเจือจางด้วย 0.4% BABS แบบ 2 fold dilution เป็น 1:2, 1:4, 1:8, ..., 1:64 แล้วหยดสารละลายแอนติเจนที่เจือจางต่าง ๆ กันดังกล่าวลงใน 96 wells plate ตามด้วย 8% GRBC ใน VAD ที่มีความเข้มข้น 1:24 ณ pH ต่าง ๆ ตามชนิดของแอนติเจนคือ

DEN-1	pH. 6.2
DEN-2	pH. 6.4
DEN-3	pH. 6.6
DEN-4	pH. 6.8
JE	pH. 6.6

โดยเริ่มหยดจาก pH. 6.8 --> pH. 6.2 แล้วนำไปไว้ในตู้ 37° c นาน 45-60 นาที แล้วอ่านผล

การแปลผล ถ้าอ่านได้ผลบวก 4 หลุม แสดงว่า แอนติเจนที่เตรียมไว้มีความเข้มข้นเป็น 16 ยูนิตจริง สามารถนำไปใช้ทดสอบ HI Test ได้

Copyright by Mahidol University

5. **การเตรียมซีรั่มโดยใช้อะซีโตน** ตามวิธีการของ Casal & Brown ปี พ.ศ. 2497 (37)

สารเคมีที่ใช้: 1. อะซีโตนแช่เย็นที่ 4° c
2. Borate saline (BS) pH. 9.0
3. Normal saline solution

อุปกรณ์ที่ใช้: 1. หลอดแก้วสำหรับปั่นที่มีก้นหลอดเป็นรูปตัววี (V-shape)
2. เครื่อง centrifuge
3. กระบะน้ำแข็ง (ice-bath)
4. water bath
5. automatic pipette ขนาด 100 ไมโครลิตร

Materials: 1. GRBC ใน Alsever solution
2. ซีรั่มผู้ป่วย

วิธีการ: อุ่นซีรั่ม 0.15 ซีซี ที่จะทดสอบที่อุณหภูมิ 56° c นาน 30 นาที เพื่อทำลายสาร nonspecific interference แล้วเติมอะซีโตนแช่เย็นที่ 4° c ลงไป 10 ซีซี ทำให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง Vortex mixer นำไปปั่น 2,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ดูดเอาอะซีโตนออกให้หมด เติม Borate saline.(BS) pH. 9.0 จำนวน 0.5 ซีซี ลงไปทำให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer แล้วหยด GRBC 0.02 ซีซี ทำให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในกระบะน้ำแข็ง นาน 20 นาที ปั่นต่ออีก 10 นาที ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนเพื่อนำไปทดสอบ HI

6. **การทำ Haemaggutination Inhibition (HI) Test** สำหรับเชื้อไวรัสเด็งกี่และเชื้อไข้สมองอักเสบ

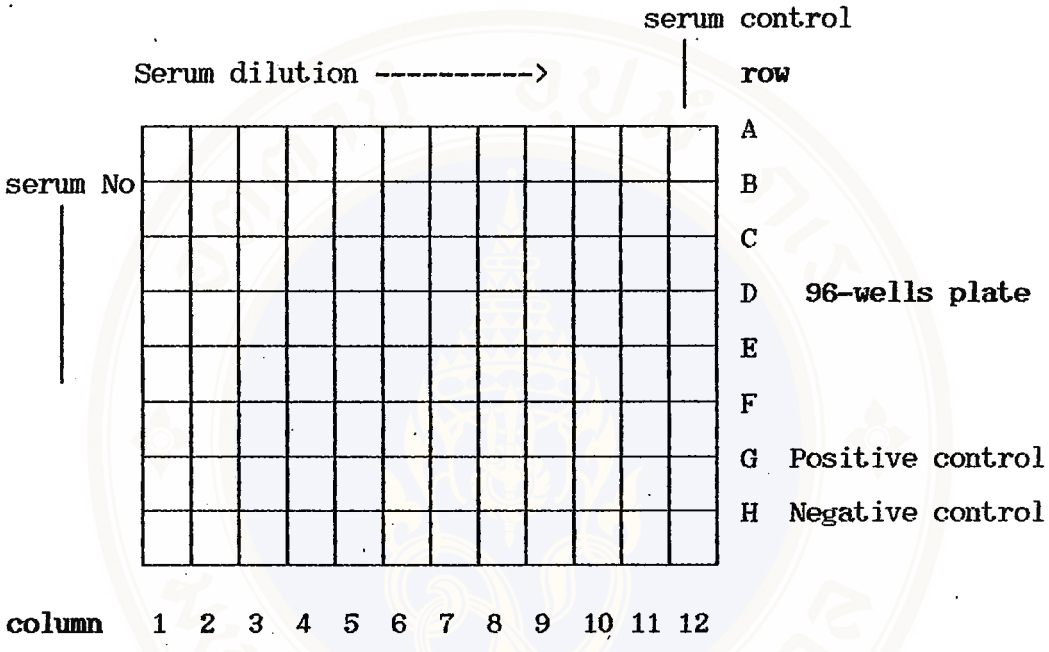
สารเคมีที่ใช้: 1. 0.4% BABS
2. 8% GRBC in VAD ที่ pH. 6.2, 6.4, 6.6 และ 6.8 ด้วยความเจือจาง 1/24
3. 16 HA antigen concentration

อุปกรณ์ที่ใช้: 1. dropper ขนาด 25 และ 50 ไมโครลิตร
2. automatic pipette ขนาด 25 และ 100 ไมโครลิตร
3. micro titer loop ขนาด 25 ไมโครลิตร

Copyright by Mahidol University

4. 96-wells plate (U-shape)
5. pipette ขนาด 1,5, และ 10 ซีซี

วิธีการ:



หมายเหตุ Positive control หมายถึง ซีรั่ม ที่มี high titer immune ต่อ DHF ทั้ง 4 ทัยป์ และ JE คือ มีระดับ HI titer ≥ 1:5120

Negative control หมายถึง ซีรั่ม ที่มี Neutralizing antibody titer ต่อ DHF ทุก ทัยป์ และ JE < 1:5

ในแต่ละหมายเลขของซีรั่มหยด 0.4% BABS ลงในหลุมที่ 2-->10 และหลุมที่ 12 (control) หลุมละ 25 ไมโครลิตร แล้วหยดซีรัมที่เตรียมไว้ลงในหลุมที่ 1, 2 และหลุมที่ 12 เจือจางซีรั่มในหลุมที่ 2-->10 ด้วย microtiter loop ขนาด 25 ไมโครลิตร แบบ 2-fold dilution จาก 1:10, 1:20, ..., 1:5120

Copyright by Mahidol University

หยดแอนติเจนที่มีความเข้มข้น 16 ยูนิต ซึ่งเตรียมไว้แล้ว จำนวน 25 ไมโครลิตร ตามแต่ละ ทัยป์ ของไวรัสแอนติเจน ลงทุกหลุม ตั้งแต่หลุมที่ 1-->10 เคาะข้าง plate อย่างสม่ำเสมอทั้ง 4 ด้าน เก็บค้างคืนไว้ในตู้เย็น หลังจากนั้นเติม 8% GRBC ใน VAD ณ pH. ที่เหมาะสมของแต่ละ ทัยป์ ของไวรัสแอนติเจนลงทุกหลุม (หลุม 1-->10 และหลุม 12) เคาะข้าง plate ทั้ง 4 ด้าน เก็บในที่ที่มีอุณหภูมิ 37° c นาน 45-60 นาที และอ่านผลการทดลองที่ได้

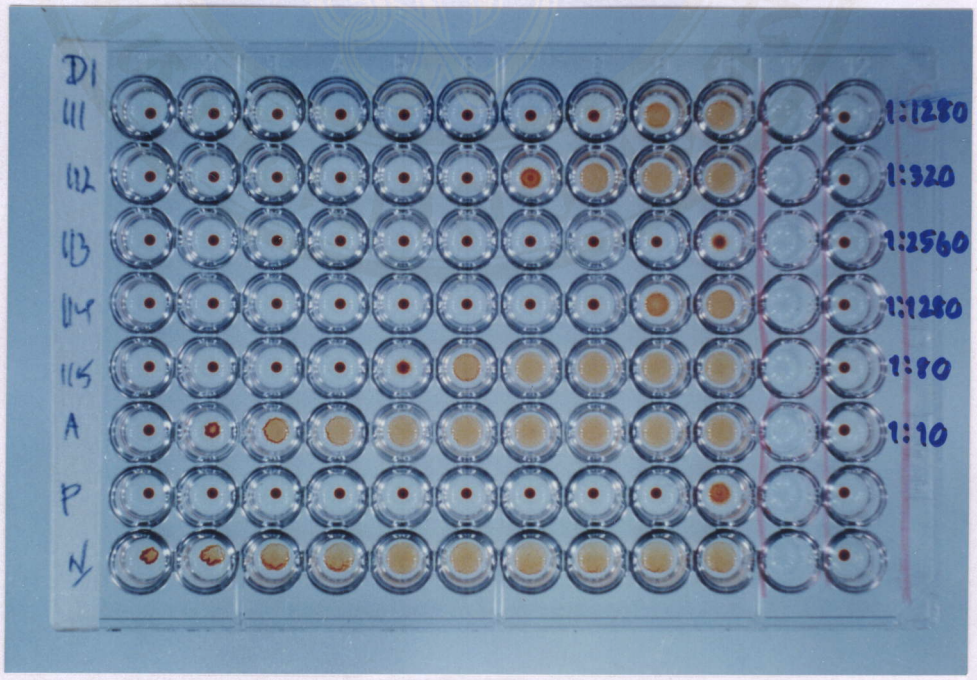
การแปลผล:

ผลบวก (+) = มีการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงห่านเป็นรูปเม็ดกระดุม

ผลบวกลบ (±) = มีการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงห่านบ้างเล็กน้อย หรือ มีการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงห่านบางส่วน แต่ยังไม่สมบูรณ์

ผลลบ (-) = มีการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงห่านอย่างสมบูรณ์เป็นวงกว้าง

ค่าเจือจางสูงสุดที่ยังทำให้เกิดผลบวก ถือเป็นไตเตอร์ของซีรั่มต่อแอนติเจนนั้น ๆ



ภาพที่ 12 การแปรผล HI Test ของเชื้อไวรัสเด็งกี่

Copyright by Mahidol University

ระดับของแอนติบอดีย์ที่ได้จากการทำ HI Test แปลผลได้ดังตารางที่ 43

ตารางที่ 43 การแปลผลระดับแอนติบอดีย์ ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่ตรวจโดยวิธี HI test(21,43)

การตอบสนองของระดับแอนติบอดีย์	ระยะของการเจาะเลือดตรวจ	ระดับแอนติบอดีย์ในระยะพักฟื้น	การแปรผลการตรวจ
≥ 4 เท่า	≥ 7 วัน	≤ 1:1,280	มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่แบบปฐมภูมิ
≥ 4 เท่า	เจาะตอนไหนก็ได้	≥ 1:2,560	มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่แบบทุติยภูมิ
≥ 4 เท่า	< 7 วัน	≤ 1:1,280	มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบบปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ
ไม่เปลี่ยนแปลง	เจาะตอนไหนก็ได้ หรืออาจมีการเจาะเลือดได้เพียงครั้งเดียว	≥ 1:2,560	สันนิษฐานได้ว่า อาจเป็นการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่แบบทุติยภูมิ
ไม่เปลี่ยนแปลง	≥ 7 วัน	≤ 1:1,280	ไม่ใช่การติดเชื้อจากไวรัสเด็งกี่
ไม่เปลี่ยนแปลง	< 7 วัน	≤ 1:1,280	ไม่สามารถแปรผลได้
-	เจาะเลือดได้เพียงครั้งเดียว	≤ 1:1,280	ไม่สามารถแปรผลได้

Copyright by Mahidol University

การแยกเชื้อของไวรัสและการพิสูจน์ทัยป์ของไวรัส

II.I การแยกเชื้อของไวรัส โดยใช้ cell LLC-MK_2 Lines และ cell C6/36 (74-76)

1. การเพาะเลี้ยงเซล LLC-MK_2 (Propagation of LLC-MK_2 Lines) (77-80) LLC-MK_2 เป็นเซลไตลิงรีซัส (Rhesus monkey kidney cell) ได้มาจากมหาวิทยาลัยฮาวาย สหรัฐอเมริกา มีอัตราส่วนในการเพาะเลี้ยงเป็น 1:3 ถึง 1:4

อุปกรณ์ที่ใช้

1. beaker, flask
2. Cornwall syringe
3. กระบอกฉีดยา ขนาด 20 ซีซี
4. Canular
5. ขวด 1 ออนซ์ และ 32 ออนซ์
6. magnetic stirror
7. Haemacytometer

สารเคมีที่ใช้

1. MK_2 growth media +10% FCS
2. Phosphate buffer saline (PBS) pH. 7.5
3. Trypsin Versene (TV)
4. 0.1% Trypan blue

Material: Cell LLC-MK_2 ที่มีอายุครบ 7 วัน

วิธีการ

ใช้หลักปราศจากเชื้อ และทำการทดลองในตู้ larminar flow โดยเทอาหารที่เลี้ยงเซลเก่าทิ้ง ล้างเซล 2 ครั้ง ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) pH. 7.5 ที่ 37° c เติมสารละลาย Trypsin-Versene (TV) 4 ซีซี ที่อุ่นไว้ที่ 37° c ให้คลุมทั่วผิวเซล พลิกขวดไปมา 15-20 รอบ เท TV ทิ้งให้หมด เคาะข้างขวดสัก 15 วินาที เพื่อให้เซลเริ่มหลุด นำขวดไปไว้ที่ตู้ 37° c นานประมาณ 2 นาที แล้วนำมาเคาะข้างขวดต่อ จนเซลหลุดจากผิวขวดจนหมด เติมอาหารเลี้ยงเซล (MK_2 growth media) 10 ซีซี เพื่อล้างข้างขวดให้เซลหลุดออกให้หมด โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 20 ซีซี และ Canular เพื่อดูดเอาส่วนผสมระหว่างเซลกับอาหารเลี้ยงเซลออก และเพื่อล้างเอาเซลที่หลงเหลือติดผิวขวดออกให้หมดและหลุดจากกันจนเป็นเซลเดียว โดย

Copyright by Mahidol University

การดูดและฉีดพ่นสลับกันในขวด ทำซ้ำ ๆ กัน 10-15 ครั้ง แล้วเทส่วนผสมระหว่างเซลกับอาหารดังกล่าวลงใน flask จดปริมาตรไว้ แล้วทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีก ปริมาตรของส่วนผสมดังกล่าวจะแตกต่างกันตามขนาดของขวดที่ใช้เพาะเลี้ยงเซล ดังนี้

ขวด	32	ออนซ์	ควรมีปริมาตรส่วนผสม	24-48 ml.
ขวด	4	ออนซ์	ควรมีปริมาตรส่วนผสม	10 ml.
ขวด	2	ออนซ์	ควรมีปริมาตรส่วนผสม	6 ml.
ขวด	1	ออนซ์	ควรมีปริมาตรส่วนผสม	1 ml.

เจือจางเซล 1:10 ใน trypan blue (0.12% ใน PBS) โดยดูดส่วนผสมของเซลกับอาหารเลี้ยงเซลมา 0.1 ซีซี ผสมกับ trypan blue 0.9 ซีซี นับจำนวนเซลด้วย Haemacytometer เพื่อดูว่าจำนวนของเซลมีเพียงพอหรือไม่ต่อการนำไปใช้และดูจำนวนเซลทั้งหมดที่จะนำมาคำนวณค่าปริมาตรของเซลที่ seeding concentration

โดย $\frac{\text{Total count}}{\text{Seeding conc}}$ = Volume of cell at the seeding concentration

Sceding conc มีค่าเป็น 1.2×10^5 cells/ml.

ซึ่งปริมาณของเซลอาจแตกต่างไปบ้างในกรณีของขวดเพาะเลี้ยงขนาด 32 ออนซ์ แต่อย่างน้อยที่สุด ในขวด 1 ออนซ์ จะต้องมีจำนวนเซล 1.2×10^5 cells/ml. x 4 ml. เติม MK_2 growth media เพื่อผสมกับส่วนผสมใน flask ในปริมาณที่พอเหมาะเพื่อให้ได้ปริมาณของเซลสุดท้ายเป็น 6.0×10^4 cells/ml. (เติมลงไปอีกประมาณ 50-60 ซีซี สำหรับขวด 32 ออนซ์) วาง flask บน magnetic stirror เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน

ใช้ cornwall syringe ดูดเอาส่วนผสมของเซลกับ media จำนวน 4 ซีซี ใส่ลงไปในแต่ละขวด 1 ออนซ์ จำนวน 32 ขวด และเก็บไว้เป็น passage ต่อไปในขวด 32 ออนซ์ อีก 2 ขวด เติม 5% CO_2 นำไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยง 37° c นาน 7 วัน แล้วจึงนำไปใช้ได้

2. **การเพาะเลี้ยงเซล C6/36 (Aedes albopictus cells)**(78-80) เซล C6/36 เป็นเซลที่ได้รับมาจากสถาบันวิจัยทางการแพทย์ทหาร (AFRIMS) มีอัตราส่วนในการเพาะลี้ยง (split) เป็น 1:3 ถึง 1:5 สามารถนำไปใช้ได้หลังจากที่เลี้ยงไว้ได้ครบ 2-5 วันแล้ว

Copyright by Mahidol University

อุปกรณ์ที่ใช้ คล้ายคลึงกับการเลี้ยง cell LLC-MK_2

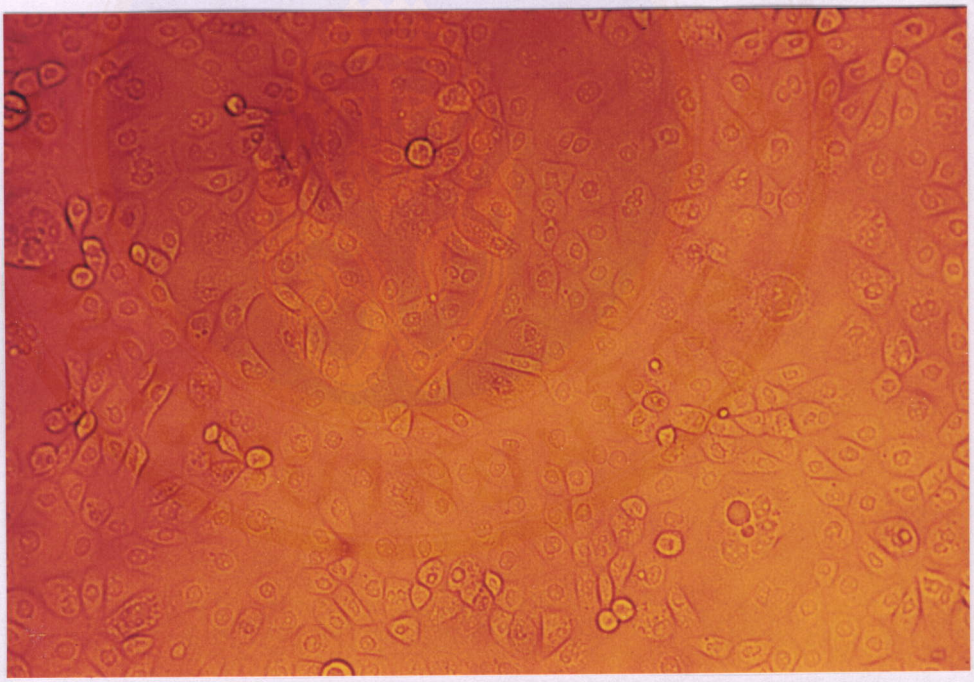
สารเคมีที่ใช้ 1. E-MEM growth media

2. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.5

3. Trypsin Versene

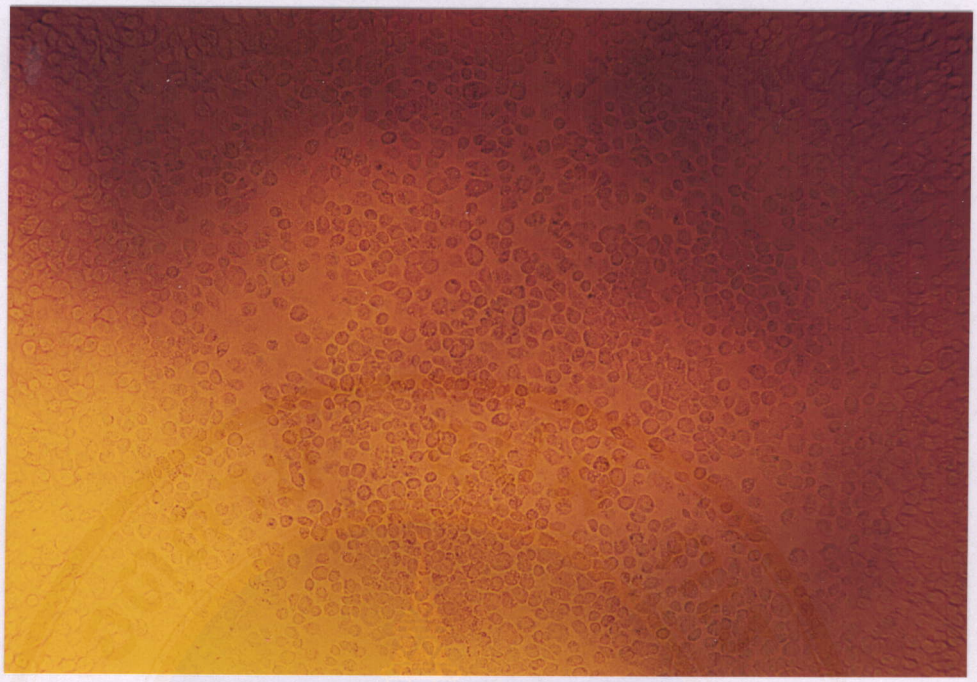
Material Cell C6/36 ที่มีอายุ 2-5 วัน

วิธีการ ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเซล C6/36 เหมือนกับเซล LLC-MK_2 ใช้วิธี trypsinization ให้เซลหลุดเป็นเซลเดี่ยว แล้วเติม E-MEM growth media ซึ่งอุ่นที่ 37° c ลงไปในขวดเพาะเลี้ยง ทำการนับจำนวนเซลเช่นเดียวกับ LLC-MK_2 แต่ไม่ต้องเติม 5% CO_2 และนำไปเก็บในตู้ 32° c นาน 2-5 วัน ก็สามารถนำไปใช้ได้



ภาพที่ 13 เซล LLC-MK_2 ที่เลี้ยงบน cover slip ใน Leighton tube (ถ่ายด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 250 เท่า)

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 14 เซล C6/36 ที่เลี้ยงบน cover slip ใน Leighton tube (ถ่ายด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 400 เท่า)

II.II **การหาปริมาณของเชื้อไวรัสโดยการทำ LLC-MK_2 Plaque Assay:** 1 x 1 Agar Overlay Method (75-78)

3.1 Direct inoculation โดยการทำ Plaque Assay ในเซล LLC-MK_2 โดยใช้ซีรั่มของผู้ป่วยโดยตรง เป็นการวัดหาปริมาณของไวรัสที่หมุนเวียนในกระแสเลือดตามความเป็นจริง (in vivo measurement)

3.2 Delayed inoculation โดยการใช้ supernate ที่ได้จากการ inoculate ลงในเซล LLC-MK_2 และ C6/36 ครบ 7 วัน ไปทำ Plaque Assay เพื่อเป็นการค้นหาเชื้อไวรัส โดยการให้ไวรัสโดยการให้ไวรัสที่มีจำนวนน้อย ได้มีโอกาสเพิ่มจำนวนมากขึ้นในเซล เมื่อปล่อยทิ้งไว้นาน 7 วัน จนสามารถหาปริมาณไวรัสได้ โดยการทำ Plaque Assay

Inoculation of LLC-MK_2 Cell และ C6/36 Cell

อุปกรณ์ที่ใช้

1. Pipette ขนาด 1 ซีซี
2. Pipette aid
3. Beaker
4. Inverted rotator

Copyright by Mahidol University

สารเคมีที่ใช้ 1. Maintainance media for MK_2 Cell (MM-MK_2)

2. Maintainance media for C6/36 Cell (MM. E-MEM.)

Materials 1. ซีรั่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก

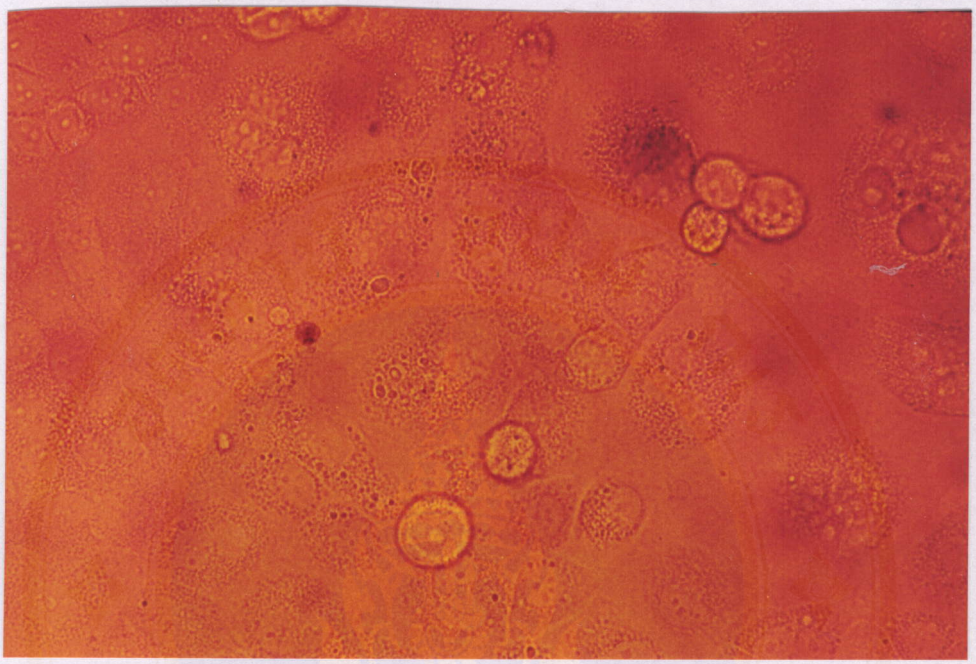
2. เซล LLC-MK_2

3. เซล C6/36

วิธีการ เทอาหารเลี้ยงเซลทิ้ง ดูดซีรั่มผู้ป่วยจำนวน 0.2 ซีซี เพื่อ inoculate ลงไปในขวด 1 ออนซ์ ที่เลี้ยงเซลดังกล่าวอยู่แต่ละขวด นำไปไว้ที่ตู้ 37° c บน shaking rotator นาน 90 นาที เพื่อให้ไวรัสเข้าไปในเซลได้ดีขึ้น

ในกรณีของ direct inoculation เมื่อครบเวลา 90 นาที ก็นำมาทำ Plaque Assay ได้ ส่วนกรณีของ delayed inoculation นั้น ภายหลังจากครบเวลา 90 นาที ของการ inoculate แล้ว เติม MM MK_2 ขวดละ 4 ซีซี สำหรับ LLC-MK_2 Cell และเติม MM E-MEM ขวดละ 4 ซีซี สำหรับ C6/36 Cell นำไปไว้ในตู้อบ 37° c สำหรับ LLC-MK_2 ส่วน C6/36 เก็บที่ตู้ 32° c เช็คดูว่าเซลมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากปกติ เช่น เหี่ยวเล็กลง เกาะกันเป็นกลุ่ม มีนิวเคลียสผิดปกติจากการมีเชื้อไวรัสเข้าไปอยู่ในเซลหรือไม่ โดยการส่องดูด้วยกล้อง inverted microscope เรียกปรากฏการณ์ที่เซลมีรูปร่างผิดไปจากปกตินี้ว่า "Cytopathic Effect (CPE)" (43) เมื่อครบ 7 วัน ถ้าไม่มีการปนเปื้อน ก็ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว (supernate) ไปทำ plaque assay ต่อไป

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 15 การเกิด CPE ของเซล LLC-MK_2 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ (กำลังขยาย 400 เท่า)

การ harvest supernate จาก Delayed inoculation เพื่อทำ plaque assay

วิธีการ นำขวดเซล LLC-MK_2 และ C6/36 ที่ inoculate ด้วยซีรั่มผู้ป่วยจนครบ 7 วันแล้วออกจากตู้อบ ใส่ลงในตู้ deep freezer -70° c นาน 15 นาที นำมาอุ่น (Thawing) อย่างรวดเร็วที่ water bath อุณหภูมิ 37° c เพื่อให้ละลาย ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อนำมาทำ plaque assay ต่อไป supernate ที่เหลือใช้จะเก็บไว้ที่ -70° c เพื่อเป็น stock ในการทดลองต่อถ้าต้องการทำใหม่

Copyright by Mahidol University

การเตรียม Agar overlayer medium for LLC-MK_2 Plaque Assay

วิธีการ คำนวณหาค่า over layer media ทั้งหมดที่จะต้องใช้ เตรียม 2% Noble agar ที่มีปริมาตรเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาตรที่จะใช้ทั้งหมด ใช้ขวดปราศจากเชื้อผสมน้ำกลั่น นำไปเข้าตู้อบที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° c นาน 15 นาที แล้วค่อยนำมาไว้ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 56° c จนกว่าจะถึงเวลาใช้ ขณะที่รอ Noble agar ออกจากตู้อบนั้น เตรียม overlayer media ให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ Noble agar ที่ได้เตรียมไว้ โดยมีส่วนผสมใน 100% เป็นดังนี้

1. BME Hanks' ที่ปราศจาก Phenol red (10X) 20%
2. Heat inactivated calf serum (ที่ 56° c นาน 30 นาที) 20%
3. Penicillin-Streptomycin (10,000 ยูนิต หรือไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 4%
4. Glutamine (200 มิลลิโมล) 2%

ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีกจำนวนหนึ่งเพื่อให้ได้ปริมาตรคิดเป็น 94.5% แล้วนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37° c นำ Neutral red (1:500) ที่คิดปริมาตรเป็น 2.5% เติมลงในส่วนผสมดังกล่าว และตามด้วย $NaHCO_3$ (7.5%) อีก 3% ก็จะได้ส่วนผสมครบถ้วนของ overlayer media

นำ overlayer media ที่อุ่นไว้ที่ 37° c มาผสมกับ Noble agar ที่อุ่นไว้ที่ 56° c ในสัดส่วน 1:1 อุณหภูมิของส่วนผสมจะกลายเป็นประมาณ 42° c ซึ่งเหมาะสมต่อการใส่ลงในขวดที่ Inoculate ไวรัสในเซล LLC-MK_2 ที่ได้เตรียมไว้แล้ว

Copyright by Mahidol University

ส่วนผสมของ overlayer medium สรุปได้ดังตารางที่ 44

ตารางที่ 44 ส่วนผสมของ overlayer medium

Ingradient	Final Quantity (mls)						
	50	100	200	300	400	500	600
BME Hank's w/o phenol red (10X)	10	20	40	60	80	100	120
Fetal calf serum	10	20	40	60	80	100	120
Pen-Strep	2	4	8	12	16	20	24
Glutamine	1	2	4	6	8	10	12
Strile distilled water	25	50	100	150	200	250	300
$NaHCO_3$ (7.5%)	1.5	3	6	9	12	15	18
Neutral red (1:500)	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	15

ขั้นตอนการทำ Plaque Assay (77)

วิธีการ เตรียมเซล LLC-MK_2 ที่เลี้ยงไว้จนมีอายุครบ 7 วัน หรืออาจใช้เซลที่มีอายุครบ 6 วัน หรือ 8 วัน แต่ไม่ควรน้อยกว่าหรือมากกว่านี้ เพราะเซลอายุอ่อนไปหรือแก่ไปจะไม่เหมาะสมที่ไวรัสจะเข้าไปแบ่งตัวในเซล เตรียมเซลมาให้ครบเท่าจำนวนของ supernate ที่ harvest เอาไว้ ทั้งจากการ inoculate ในเซล LLC-MK_2 และเซล C6/36

เขียนหมายเลขของขวดให้ตรงกับชนิดของ supernate ที่ harvest ได้ เทอาหารที่เลี้ยงเซลออก แล้วใช้ปิเปต 1 ซีซี หยด supernate จำนวน 0.2 ซีซี ลงให้ครอบคลุมทั่วผิวหน้าของเซล นำไปไว้ในตู้อบ 37° c บน shaking rotator นาน 90 นาที เพื่อให้เชื้อไวรัสดูดซึมเข้าเซล เมื่อครบเวลาเทส่วนที่ inoculate ออกให้

Copyright by Mahidol University

หมดแล้วใช้ปิเปต หรือ Cornwall syringe ดูดเอา agar overlayer media ที่เตรียมไว้ใส่ลงด้านตรงข้ามเซล แล้วจึงค่อยผลิกขวดให้ agar overlayer media คลุมทั่วผิวหน้าของเซล ขณะที่เติม agar ดังกล่าวนั้น ต้องกระทำในห้องมืด ปิดไฟให้หมด เพราะ Neutral red จะทำปฏิกริยากับแสงมีผลไปทำลายเซล LLC-MK_2 ได้ เก็บขวดที่ใส่ agar overlayer media แล้วไว้ในกล่องที่ปิดมิดชิด ตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้ agar แข็งตัวดีแล้ว จึงค่อยผลิกขวดในที่มืดให้ด้านที่มี agar อยู่ข้างบน และให้ส่วนของเหลวที่ยังหลงเหลือบ้างไม่เยิ้มอยู่บนผิวหน้าของ agar นำเก็บใส่กล่องตามเดิม แล้วนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 35° c นาน 7 วัน นำมานับ plaque ณ วันที่ 7 และวันที่ 14 ของการทดลอง

การนับจำนวนและขนาดของ Plaque

1 Plaque forming unit (1PFU) หมายถึง ปริมาณของไวรัสที่มีผลไปทำให้เซลมีการตายและหลุดจากการเกาะผิวขวด มองเห็นเป็นจุด ๆ ซึ่งจุด 1 จุด ถือเป็น 1 plaque ถ้ามีจำนวนของ plaque มากมาย จนมองแทบไม่เห็น agar เลย ให้ถือว่ามีการตายของเซลหมด (whipout cell) และถ้ามีมากจนนับได้ยาก ก็ให้ถือเป็น TNTC (too numerous to count)

ขนาดของ plaque แบ่งตามขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางได้ดังนี้

1-2 มิลลิเมตร เรียกว่า ขนาดเล็ก (pin point หรือ small point)

3-4 มิลลิเมตร เรียกว่า ขนาดกลาง (medium point)

มากกว่า 4 มิลลิเมตร เรียกว่า ขนาดใหญ่ (large point)

Copyright by Mahidol University

ภาพที่ 16 ลักษณะการเกิด plaque บน agar

วิธีการคำนวณหาปริมาณของไวรัสจากจำนวน plaque ที่นับได้

จากปริมาตรของ supernate ที่ใส่ไปขวดละ 0.2 ซีซีนั้น เมื่อคิดค่าปริมาณของไวรัสจะต้องเทียบหาเป็นค่า PFU/ซีซี โดยสมมติว่า

ถ้านับค่า plaque ได้ X ตัว จะเทียบหาค่าได้ดังนี้

supernate จำนวน 0.2 ซีซี นับจำนวน plaque ได้ X

supernate จำนวน 1 ซีซี นับจำนวน plaque ได้ $\frac{X}{0.2} \times 1$

$= 5X$ PFU./ซีซี

ดังนั้นปริมาณของไวรัส (titer) คิดเป็น 5X PFU./ซีซี

การ pick plaque

ในกรณีที่ไม่มีซีรั่มเหลืออยู่ พอที่จะทำ delayed inoculation ได้ หรือทำ delayed inoculation แล้วไม่พบไตเตอร์ของเชื้อไวรัส พบแต่เพียงใน direct inoculation ถ้าจะทำการพิสูจน์ ทัยป์ ของเชื้อไวรัส ก็ใช้วิธีการขูดเอาไวรัสตรงบริเวณที่เกิด plaque บน agar ไป inoculation ในเซลใหม่เพื่อส่งพิสูจน์ทัยป์ต่อไป วิธีการนี้เรียกว่า "การ pick plaque"

Copyright by Mahidol University

อุปกรณ์ที่ใช้ 1. loop เผาไฟให้ปราศจากเชื้อ
2. หลอด 1 dram
3. pipette และ pipette aid

สารเคมีที่ใช้ diluent

วิธีการ หยด diluent ลงในขวด plaque ที่เช็คปริมาณไตเตอร์ของไวรัสว่ามีอยู่จริง ประมาณ 2 ซีซี ใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟ เกลี่ยให้บริเวณที่มี plaque อยู่ค่อย ๆ หลุดจากเซล แล้วใช้ pipette ดูด diluent ในขวดดังกล่าวฉีดพ่นสลับกับดูด เพื่อให้เชื้อไวรัสกระจายลงใน diluent ได้ดีขึ้น แล้วดูดเอาเฉพาะ diluent ที่มีเชื้อไวรัสอยู่ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียว ปิกฉลากให้เรียบร้อย เก็บที่ -70° c เพื่อรอพิสูจน์ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสต่อไป

การทำ Direct Fluorescent Antibody Straining Technique จากเซล LLC-MK_2 และเซล C6/36 (81)

อุปกรณ์ที่ใช้ 1. แผ่นสไลด์ 2 แผ่น พร้อม cover slip
2. moist chamber
3. magnetic stirror
4. automatic pipette 100 ไมโครลิตร และ tip สวมปลาย
5. กล้องฟลูออเรสเซนต์

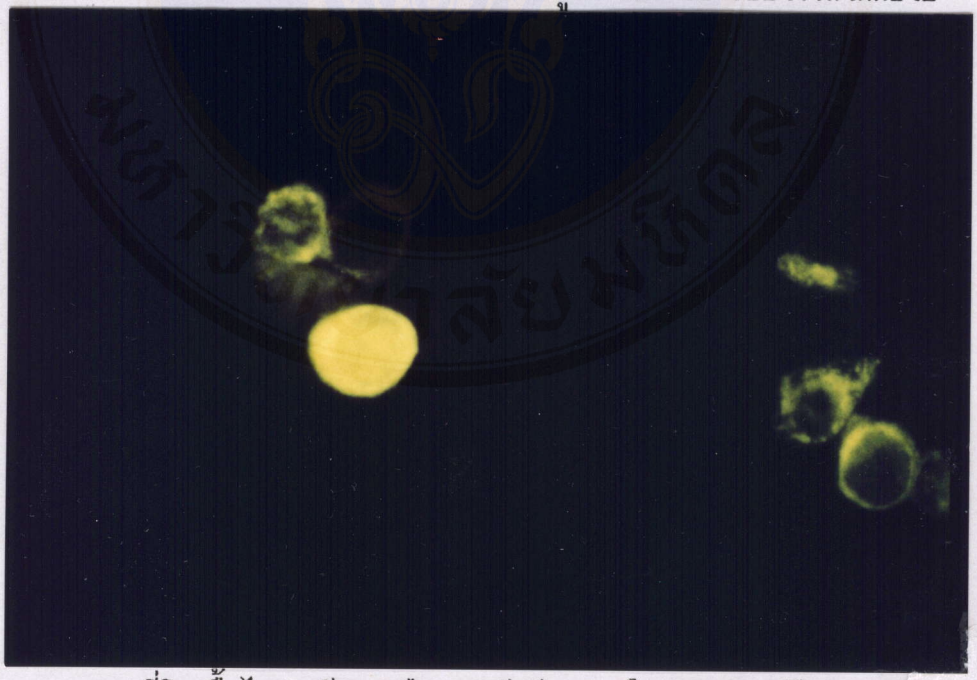
สารเคมีที่ใช้ 1. absolute acetone ที่อุณหภูมิ -20° c
2. Human anti dengue IgG conjugated with fluorescene isothiocyanate (FITC) อัตราส่วน 1:15 (เจือจางด้วย PBS pH 7.4)
3. phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
4. glycerol buffer pH 7.6

Materials เซล LLC-MK_2 และเซล C6/36 ที่ได้จากการ inoculate ซีรั่มลงเซล

วิธีการ หลังจากที่เก็บเอาส่วนของ supernate ไปทำ plaque assay แล้ว ส่วนของเซลที่มีการติดเชื้อจะถูกนำมาตรวจสอบหาเชื้อ Flavivirus โดยวิธี Direct Fluorescent Antibody Staining Technique นำขวดที่มีเซลดังกล่าวมาล้าง

Copyright by Mahidol University

ด้วย PBS pH 7.4 1 ครั้ง เพื่อกำจัดเอา media เก่าออกเติม Trypsin Versene 0.2 ซีซี เคาะให้เซลหลุดออกจากผนังขวดให้หมด ล้างซ้ำด้วย PBS 3 ซีซี ดูด suspension ใส่หลอดแก้วนำไปปั่น 1000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จะได้เซลติดอยู่ที่ก้นหลอดแก้ว เท PBS ทิ้ง ล้างซ้ำด้วย PBS แล้วปั่นอีก 2 ครั้ง เท PBS จากการปั่นครั้งสุดท้ายทิ้ง จะเหลือเซลติดก้นหลอด ดูดเซลจำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงบนสไลด์ 2 แผ่น แผ่นละ 2 หยด แล้วนำไป fix ให้เซลติดแน่นบนสไลด์ใน absolute acetone ที่อุณหภูมิ -20° c นาน 10 นาที เป่าให้แห้งด้วยพัดลม เมื่อสไลด์แห้งดีแล้วหยด Human antidengue IgG C fluorescent isothiocyate (FITC) ที่มีอัตราส่วน 1:15 1 หยดลงบนจุดที่มีเซลอยู่ทิ้งไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างสไลด์ด้วย PBS pH 7.4 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที โดยขณะแช่ใน PBS ให้ใช้ magnetic stirror ที่หมุนช้า ๆ ช่วยสั่นให้ PBS ในกระบะที่แช่สไลด์เข้าไปล้างสไลด์ได้อย่างทั่วถึง นำสไลด์มาเป่าด้วยพัดลมจนแห้งสนิท หยดทับด้วย Glycorol buffer pH 7.6 1 หยด ปิดทับด้วย cover slip แล้วนำสไลด์ดังกล่าวไปส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ ถ้ามีเชื้อไวรัสอยู่ในเซล ก็จะพบว่าเซลที่ติดเชื้อไวรัสนั้น มีการเรืองแสงสีเขียวอ่อนในส่วนของ ซัยโตปลาสซึม สามารถนำไปพิสูจน์ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสได้ต่อไป



ภาพที่ 17 เซลที่ติดเชื้อไวรัส มีการเรืองแสงสีเขียวอ่อนในส่วนของซัยโตปลาสซึม เมื่อดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ (กำลังขยายขนาด 400 เท่า)

Copyright by Mahidol University

II.III การพิสูจน์ ทัยป์ ของเชื้อไวรัส

การพิสูจน์ ทัยป์ ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ อาศัยวิธี Indirect Fluorescent Antibody Staining Technique (IFAT) (82,83)

หลักการ ให้แอนติเจน ทำปฏิกริยากับแอนติบอดีย์ที่จำเพาะ (Monoclonal antibody) ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ทัยป์ และต่อเชื้อแจแปนนีสเอนเซปฟาไลติส (JE) แล้วใส่ anti mouse-immunoglobulin G ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงลงไปจะแสดงทัยป์ ของไวรัสได้โดยเกิดการเรืองแสงสีเขียวอ่อนในส่วน ซัยโตปลาสซึม ของเซลที่มีเชื้อไวรัสอยู่

อุปกรณ์ที่ใช้ เช่นเดียวกับการทำ direct FA

สารเคมีที่ใช้

1. Absolute acetone ที่อุณหภูมิ -20° c
2. Monoclonal antibody ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ ที่ 1,2,3,4 และต่อเชื้อไวรัส JE
3. PBS pH 7.4
4. Rabbit anti-mouse-immunoglobulin G conjugate FITC อัตราส่วน 1:35 (เจือจางด้วย PBS pH 7.4)
5. 50% Glycerol buffer pH 7.6
   (Neutral glycerol 1 ส่วน : PBS pH 7.6 1 ส่วน)

Materials เซล LLC-MK_2 และ C6/36 ที่มีเชื้อไวรัสอยู่ โดยการใส่ Tripsin Versene เช่นเดียวกับการทำ Direct Fluorescent Antibody Staining Technique

วิธีการ ทำเครื่องหมาย 5 จุด บนสไลด์ หยดเซลที่มีการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวลงทุกจุดบนสไลด์ที่ได้ทำเครื่องหมายไว้ นำไปเป่าให้แห้งด้วยพัดลม และ fix ให้เซลติดแน่นบนสไลด์ด้วย absolute acetone ที่อุณหภูมิ -20° c นาน 10 นาที เป่าให้แห้งโดยใช้พัดลม แล้วหยด Monoclonal antibody ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ 1,2,3,4 และต่อเชื้อไวรัส JE ลงบนเซลแต่ละจุดดังกล่าวตามลำดับ จุดละ 10 ไมโครลิตร โดยเริ่มจาก anti-DENGUE 1, anti-DENGUE 2, anti-DENGUE 3, anti-DENGUE 4 และ anti-JE Virus ตามลำดับ วางทิ้งไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างสไลด์ด้วย PBS pH 7.4 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วหยด Rabbit

Copyright by Mahidol University

anti-mouse Ig G conjugate FITC ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:35 ลงบนสไลด์แต่ละจุดจุดละ 10 ไมโครลิตร ปล่อยทิ้งไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำสไลด์มาล้างใน PBS pH 7.4 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที โดยวางภาชนะที่ใส่ PBS บน mgnetic stirror เช่นเดียวกับขั้นตอนของ Direct FA เป่าสไลด์ให้แห้งด้วยพัดลม หยดทับด้วย 50% glycerol buffer pH 7.6 (Neutral glycerol 1 ส่วน : PBS pH 7.6 1 ส่วน) จุดละ 1 หยด แล้วปิดทับสไลด์ด้วย coverslip ส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ ถ้าไวรัสที่แยกได้เป็น ทัยป์ ใด จะเห็นการเรืองแสงสีเขียวอ่อนในส่วนของ ซัยโตปลาสซึมที่ใส่ แอนติบอดีย์ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่ ทัยป์ นั้น

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ค

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ค

สารเคมีที่ใช้ในการทำ HI Test

1. **Alsever Solution**

Dextrose	20.50	กรัม
NaCl	4.20	กรัม
Citric acid ($H_3C_6H_5O_7.H_2O$)	0.55	กรัม
Sodium Citrate ($Na_3C_6H_5O_7.{}_2H_2O$)	8.00	กรัม
Distilled water	1000.00	ซีซี

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100° c ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 10 นาที

2. **Dextrose-gelatin-veronal (DGV)**

Veronal (barbital)	0.58	กรัม
Gelatin	0.60	กรัม
Sodium veronal (sodium barbital)	0.38	กรัม
$CaCl_2$ (anhydrous)	0.02	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.12	กรัม
NaCl	8.50	กรัม
Dextrose	10.00	กรัม
Distilled water	1000.00	ซีซี

ผสม Veronal กับ Gelatin เข้าด้วยกัน ในน้ำกลั่นร้อน ๆ 250 ซีซี แล้วจึงค่อยเติมส่วนผสมที่เหลือลงไป ทำให้ปราศจากจากเชื้อโดยใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 100° c ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 10 นาที

Copyright by Mahidol University

3. reagents ที่ใช้ในการปรับค่า pH ของ RBC suspension

stock solutions

3.1 1.5 M. sodium chloride (10x0.9% NaCl)

NaCl	87.68	กรัม
Distilled H_2O	1000.00	ซีซี

3.2 2.0 M. dibasic sodium phosphate

Na_2HPO_4 (anhydrous)	283.96	กรัม
Distilled H_2O	1000.00	ซีซี

3.3 2.0 M. monobasic sodium phoshate

$NaH_2PO_4.H_2O$	276.02	กรัม
Distilled H_2O	1000.00	ซีซี

Adjusting diluents (AD)

0.15 M NaCl

0.2 M Phosphate

ผสมกับ stock solutions คือ

0.15 M NaCl - 0.2 M Na_2HPO_4 และ

0.15 M NaCl - 0.2 M NaH_2PO_4

0.15 NaCl - 0.2 M Na_2HPO_4 ประกอบด้วย

1.5 M NaCl	100	ซีซี
2.0 M Na_2HPO_4	100	ซีซี
Distilled H_2O	800	ซีซี

0.15 M NaCl - 0.2 M NaH_2PO_4 ประกอบด้วย

1.5 M NaCl	100	ซีซี
20 M NaH_2PO_4	100	ซีซี
Distilled H_2O	800	ซีซี

Copyright by Mahidol University

สัดส่วนการผสม ปรับตามค่า pH ดังตาราง

pH ที่เหมาะสม*	0.15 M NaCl + 0.2 M Na_2HPO_4 (ซีซี)	0.15 M NaCl + 0.2 M NaH_2PO_4 (ซีซี)
5.75	3.0	97.0
6.0	12.5	87.5
6.2	22.0	78.0
6.4	32.0	68.0
6.6	45.0	55.0
6.8	55.0	45.0
7.0	64.0	36.0
7.2	72.0	28.0
7.4	79.0	21.0

*ค่า pH ที่เหมาะสมนี้ ได้จากการผสม Borate saline solution pH 9 กับ adjusting diluent ในปริมาตรที่เท่ากัน

ถ้า solutions ที่ได้มีค่า pH 5.75-6.6 จะเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° c แต่ถ้า solutions ที่ได้มีค่า pH มากกว่านี้ ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพราะจะกลายเป็นของแข็งได้ ถ้าเก็บในตู้เย็น

4. **0.5 M Boric acid (H_3BO_3)**

H_3BO_3	30.92	กรัม
Hot distilled H_2O	700.00	ซีซี
Distilled H_2O	1000.00	ซีซี

5. **Borate saline solution, pH 9**

1.5 M NaCl	80.00	ซีซี
0.5 M H_3BO_3	100.00	ซีซี

Copyright by Mahidol University

1.0 N NaOH	24.00	ซีซี
Distilled H_2O	1000.00	ซีซี

ตรวจเช็คค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter

6. **4% Bovine Albumin Borate Saline (BABS)**

Bovine albumine	4.00	กรัม
Borate saline solution, pH 9	90.00	ซีซี

(ปรับค่า pH ให้เป็น 9 โดยใช้ 2N.NaOH)

Borate saline, pH 9	100.00	ซีซี

นำไปกรอง โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อขจัดแบคทีเรียออก และเก็บรักษาไว้เป็น stock solution ได้นาน ๆ

7. **0.4% Bovine Albumin Borate Saline Solution (0.4% BABS, pH 9)**

4% Bovine albumin, pH 9	100.00	ซีซี
Borate saline solution, pH 9	900.00	ซีซี

8. **Normal Saline Solution 0.9%**

NaCl	9.00	กรัม
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	1000.00	ซีซี

สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซล

1. **Growth Media สำหรับเลี้ยง cell LLC-MK_2 (100 ซีซี)**

BME Earle's	85	ซีซี
Calf serum	10	ซีซี
L-glutamine	1	ซีซี
Penicillin & Streptomycin (10000 u)	2	ซีซี
7.5% $NaHCO_3$	2	ซีซี

โดยเตรียมให้ได้ pH ขั้นสุดท้ายเป็น 7.4

Copyright by Mahidol University

2. **Maintainance Media สำหรับเลี้ยง Cell LLC-MK_2**

BME Earle's (10x)	10	ซีซี
Calf serum (heat inactivated)	2	ซีซี
L-glutamine	1	ซีซี
Penicillin & Streptomycin (10,000 u)	2	ซีซี
7.5% $NaHCO_3$	2.5	ซีซี
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	100	ซีซี

3. **Growth Media สำหรับเลี้ยง Cell C6/36 (100 ซีซี)**

E-MEM (10x)	10	ซีซี
Fetal calf serum (FCS)	10	ซีซี
Glutamine (200 mM)	1	ซีซี
Penicillin & Streptomycin (10,000 u)	2	ซีซี
Non essential amino acids (100xGIBCO)	2	ซีซี

ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิโมล (mM)

7.5% $NaHCO_3$	1.5	ซีซี

โดยปรับค่า pH ขั้นสุดท้ายให้อยู่ในช่วง pH 7.3-7.4

4. **Maintainance Media สำหรับเลี้ยง Cell C6/36**

E-MEM	85	ซีซี
30% bovine plasma albumin	10	ซีซี
glutamine	1	ซีซี
Non essential amino acid	2	ซีซี
Penicillin & Streptomycin (10,000 u)	2	ซีซี

สารเคมีที่ใช้ล้างเซล

Phosphate Buffer Saline (PBS) Solution)

Stock Solution

I. 1.5 M NaCl	87.68	กรัม/น้ำ 1 ลิตร

Copyright by Mahidol University

II. 0.5 M Na_2HPO_4 (ปราศจากความชื้น) 70.99 กรัม/น้ำ 1 ลิตร
Diabasic

III. 0.5 M $NaH_2PO_4.H_2O$ Monobasic 69.01 กรัม/น้ำ 1 ลิตร

Solution A	**จำนวน 1 ลิตร**
Stock I	80 ซีซี
Stock II	40 ซีซี
น้ำกลั่น	1000 ซีซี
Solution B	**จำนวน 1 ลิตร**
Stock I	80 ซีซี
Stock III	40 ซีซี
น้ำกลั่น	1000 ซีซี

ในการเตรียม PBS ที่ pH ต่าง ๆ กันนั้น ให้ใช้ Solution A เป็นหลัก แล้วค่อย ๆ เติม Solution B ลงไป จนได้ค่า pH ตามที่ต้องการ โดยปกติค่า pH ของ Solution A ควรมีค่ามากกว่า 8.5

สัดส่วนในการเตรียมของ Solution A และ B จะแตกต่างกันตามค่า pH ดังนี้

PBS pH 7.95	ใช้ Solution A	10 ส่วน
	Solution B	1 ส่วน
PBS pH 7.5	ใช้ Solution A	8 ส่วน
	Solution B	1 ส่วน
PBS pH 7.2	ใช้ Solution A	4 ส่วน
	Solution B	1 ส่วน

หลังจากผสม Solution ทั้ง 2 ชนิดจนได้ค่า pH ตามต้องการแล้ว นำไปเข้าตู้อบเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° c ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที (ถ้าไว้นาน 30 นาที จะมีผลทำให้เกลือบางส่วนเกิดการตกตะกอนได้ ทำให้ค่า pH เปลี่ยน)

Copyright by Mahidol University

สารเคมีที่ช่วยทำให้เซลหลุดเป็นเซลเดี่ยว

0.25% Trypsin + 0.1% Versene (TV) Solution

Trypsin 1:250 มาจาก DIFCO Laboratories ส่วน Versene มาจากบริษัท Sigma Co. สารทั้ง 2 ตัวเป็นผง ต้องเก็บรักษาไว้ในที่แห้งและเย็น ภายหลังจากที่ได้นำมาเตรียมเป็น Solution แล้ว ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -25° c จนกว่าจะใช้

Trypsin	2.5	กรัม
Versene (EDTA)	1	กรัม
(Ethylenediaminetetra-acitic acid)		
PBS pH 7.95 ที่อุณหภูมิ 37° c	1	ลิตร

กรองส่วนผสมดังกล่าวด้วยกระดาษกรองที่มีรูกรองเป็น 0.22 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ แบ่งใส่ขวด 10-20 ซีซี เมื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป นำขวดเก็บไว้ที่ -20 ถึง -25° c

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้

1. **L-glutamine**

L-glutamine	29.2	กรัม
น้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย		
กระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.22 µm	1	ลิตร

เก็บใส่ขวด 2 ออนซ์ ใส่ขวดละ 25-30 ซีซี ไว้ที่ -20° c จำนวนที่ใช้ จะใช้ L-glutamine 1 ซีซี ต่ออาหารเลี้ยงเซล 100 ซีซี ซึ่งจะมีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 2 มิลลิโมล

2. **Penicillin & Streptomycin (P & S)**

Penicillin G 5,000,000 ยูนิต/ขวด	1	ขวด
Streptomycin sulfate 1 กรัม/ขวด	5	ขวด
PBS pH 7.5	50	ซีซี

Copyright by Mahidol University

นำตัวยาทั้ง 2 ชนิดละลายใน PBS pH 7.5 และทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีกรองด้วยกระดาษกรอง ที่มีรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร ก็จะได้ P & S ที่มีความเข้มข้น 100,000 ยูนิต/ซีซี แบ่งบรรจุขวด 10-20 ซีซี เก็บไว้ที่ -20° c

3. Trypan Blue (Diamine Blue 3B)

ใช้ในการตรวจนับหาเซลที่มีชีวิตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

0.1% Trypan Blue ประกอบด้วย

Trypan Blue	0.1 กรัม
PBS pH 7.95	100.00 ซีซี

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เปลี่ยนกระดาษกรองบ่อย ๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิประมาณ 25° c

4. BME Hank's without phenol red (10x)

ขนาดบรรจุ 520 กรัม/ขวด ผลิตโดย GIBCO

1 ขวด ทำเป็นสารละลาย (1x) ได้ 50 ลิตร หรือ

ทำเป็นสารละลาย (10x) ได้ 5 ลิตร

โดย ถ้าเป็นสารละลาย 1x:

BME Hank's without phenol red	10.4 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 ซีซี

ถ้าเป็นสารละลาย 10x:

BME Hank's without phenol red	104 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 ซีซี

กรองแบคทีเรียออกโดยใช้ กระดาษกรองมีรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° c ได้นาน 6 เดือน

5. 2% Special agar noble

ผง Agar noble	20.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 ซีซี
เข้าตู้อบที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน	15 นาที

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° c จนกว่าจะใช้ได้นาน 2 เดือน

Copyright by Mahidol University

6. **Phenol Red (0.5% หรือ 1.0%)**

Stock Solution มีความเข้มข้นเป็น 0.5% หรือ 1.0% ตามความเหมาะสม

Phenol red	1.50 กรัม
1/60 M NaOH	300.00 ซีซี

ใส่ในขวด 4 ออนซ์ นำไปเข้าตู้อบที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บให้พ้นจากแสง มีอายุการใช้งานหลังผสมได้นาน 1 เดือน

Stock Solution ของ NaOH ที่ใช้ เตรียมจาก

1.0 M NaOH

19.5 M NaOH	1.0 ซีซี
น้ำกลั่นที่ไม่มีประจุไฟฟ้า	18.5 ซีซี

1/60 M NaOH

1.0 M NaOH	5.0 ซีซี
น้ำกลั่นที่ไม่มีประจุไฟฟ้า	295.0 ซีซี

ใช้ 0.5% Phenol Red 4 ซีซี ต่อ Media 1000 ซีซี

7. **Sodium Bicarbonate ($NaHCO_3$)**

7.5% Stock solution

$NaHCO_3$	75.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 ซีซี

แยกใส่ขวด 4 ออนซ์ ขวดละ 60 ซีซี นำไปเข้าตู้อบฆ่าเชื้อนาน 15 นาที เก็บแช่แข็งที่ -30° c นาน 1 เดือน ก่อนนำมาใช้ เพื่อให้ถึงจุดสมดุลของอิออนที่แตกตัวก่อน แต่ถ้าจำเป็นต้องใช้หลังการเตรียมทันที ให้เติมกาซ CO_2 ที่มีความเข้มข้น 5% ลงไปในสารละลายผ่านทาง pastuer pipet นานประมาณ 5 นาที เพื่อให้ $NaHCO_3$ แตกตัวเป็นด่างมากขึ้น ดังสมการ

$$H_2O + NaHCO_3 \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3 + H_2O \rightleftharpoons Na^+ + H_2CO_3 + OH^-$$

$$\Downarrow\Uparrow$$

$$H_2O + CO_2$$

75% $NaHCO_3$ Solution ที่เตรียมได้นี้ มีอายุการใช้งานหลังถึงจุดสมดุลของอิออนได้นาน 2 เดือน

Copyright by Mahidol University

8. Trytose phosphate broth (TRY) และ Thioglycollate broth (THI) คือ สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการปราศจากเชื้อของ Media ชนิดต่าง ๆ

1. Trytose phosphate broth (TRY) 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptose 40	20	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Bacto-Dextrose	2	กรัม
Sodium phosphate Dibasic	2.5	กรัม

ใช้ทดสอบพวก: Saprophytic Bacteria, Pneumococci, Streptococci, Meningococci, Fastidius organism จากเลือด และพวกแบคทีเรียที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ตัวอย่างที่ตรวจสอบได้: Streptococcus pyogenes, Strep. agalactiae, E. Coli, Staphylococcus aeureus, Pseudo. aeuruginosa.

2. Thioglycollate broth 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	15.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
L-cystine	0.5	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Sodium Chloride	2.5	กรัม
Potassium phosphate	0.5	กรัม
Resuzurin	0.001	กรัม
Agar pH 7.1 $\pm$ 0.2 ที่ 25° c	0.75	กรัม

ใช้ทดสอบพวก: pathogenic และ non-pathogenic aerobic bacteria, microaerophilic และ anaerobic microorganism ชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่างที่ตรวจสอบได้: Clostridium Perfringens, Clostridium Sporogenes, Bacteroids fragilis, Bacillis subtilis, staphylococcus aeureus, E. Coli, Pseudomonas aeuruginosa, Candida albicans และ Streptococcus faecalis

Copyright by Mahidol University

9. **Dimethyl Sulfoxide $(CH_3)_2SO$ หรือ DMSO**

คือสารที่ใช้ในการเตรียมเซล เพื่อเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือตู้แช่แข็ง -70° c เพื่อไว้ใช้ในยามขาดแคลน มีวิธีการเตรียมและใช้สารละลาย DMSO ดังนี้

1. **100% Solution**

ใช้ในการเก็บรักษาเซลในถังไนโตรเจนเหลว หรือในตู้แช่แข็ง -70° c ขณะที่ใส่ลงในเซลต้องใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ โดยใช้ DMSO

2. **15.0% Solution**

100% DMSO Solution	15.0	ซีซี
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	100.0	ซีซี

เก็บไว้ในตู้เย็น

3. **20% Solution** ใช้กับเซลเม็ดเลือดขาว (leukocytes)

100% DMSO Solution	20.0	ซีซี
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	100.0	ซีซี

เก็บไว้ในตู้เย็น

หมายเหตุ DMSO Solution จะกลายเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 18° c เวลาใช้ ต้องนำมาอุ่นก่อน

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ง

Copyright by Mahidol University

สูตรทางสถิติที่ใช้ทดสอบ

1. ค่าเฉลี่ย (Mean = $\bar{x}$)

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{k} f_i x_i}{\sum_{i=1}^{k} f_i}$$

โดยที่ $x_1, x_2, x_3, \ldots, x_k$ เป็นข้อมูล
ที่มีความถี่ $f_1, f_2, f_3, \ldots, f_k$ ตามลำดับ

2. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation = S.D.)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{k} f_i (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

โดยที่ x_i เป็นจุดกึ่งกลางของอันตรภาคชั้นที่ i
f_i เป็นความถี่ของอันตรภาคที่ i
k เป็นจำนวนอันตรภาคชั้น
N เป็นจำนวนข้อมูลทั้งหมด
$\bar{x}$ เป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิตของข้อมูลชุดนี้

3. Fisher's Exact Test

$$p = \frac{R_1!R_2!C_1!C_2!}{n!a!b!c!d!}$$

หรือ p เป็นค่า p-value
R_1 เป็นผลรวมในแถวที่ 1
R_2 เป็นผลรวมในแถวที่ 2
C_1 เป็นผลรวมในสดมภ์ที่ 1
C_2 เป็นผลรวมในสดมภ์ที่ 2
n เป็นขนาดของตัวอย่าง

Copyright by Mahidol University

a เป็นค่าที่ได้ในตำแหน่ง R_1C_1

b เป็นค่าที่ได้ในตำแหน่ง R_1C_2

c เป็นค่าที่ได้ในตำแหน่ง R_2C_1

d เป็นค่าที่ได้ในตำแหน่ง R_2C_2

Copyright by Mahidol University

19779