

ผลงานเอกสารวิชาการ (เอกสารหมายเลข 5)

ลำดับที่ 1

1. ชื่อผลงาน การเฝ้าระวังซีโรทัยป์ไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2560-2562

Dengue serotype surveillance in Thailand, 2017-2019

2. ระยะเวลาที่ดำเนินการ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 - 2561

3. ผลการดำเนินงาน

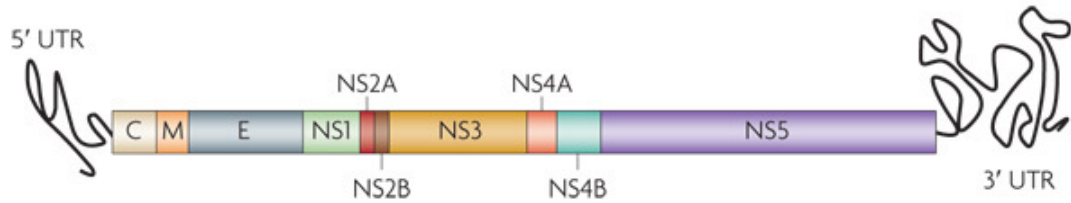
1) บทคัดย่อ

ไข้เลือดออกเป็นปัญหาสำคัญของสาธารณสุขไทย ซึ่งประเทศไทยสามารถพบไข้เลือดออกได้ทั้ง 4 ซีโรทัยป์ เมื่อผู้ป่วยมีการติดเชื้อชนิดใดแล้วจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อชนิดนั้นตลอดชีวิต การดำเนินงานเฝ้าระวังซีโรทัยป์ไข้เลือดออกในประเทศไทย ได้เก็บตัวอย่างผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสไข้เลือด เพื่อนำมาตรวจหาชนิดของไวรัสที่พบการกระจายในพื้นที่และสอดคล้องกับภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจริงในพื้นที่นั้น โดยมีโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการส่งตัวอย่างตรวจจำนวน 16, 19 และ 26 โรงพยาบาล ในปี 2560 2561 และ 2562 ตามลำดับ โดยคำนึงถึงอายุของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการเก็บตัวอย่างเพื่อเฝ้าระวังเท่ากับ 20 ปี ผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกด้วยวิธี Real-time RT PCR พบว่าในจังหวัดที่มีการเก็บข้อมูลการเฝ้าระวังต่อเนื่องทั้งสามปี จะมีซีโรทัยป์เด่นที่แตกต่างกันและในพื้นที่เดียวกันจะพบซีโรทัยป์เด่นที่ต่างกันในแต่ละปี ฉะนั้นการดำเนินการเฝ้าระวังซีโรทัยป์ไข้เลือดออกอย่างต่อเนื่อง ทำให้ทราบข้อมูลการกระจายของเชื้อไวรัสได้ทั้งในพื้นที่และมีความสำคัญในการพยากรณ์ความรุนแรงของการระบาดของโรคไข้เลือดออก เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย

2) ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ไวรัสวิทยา

ไวรัสเดงกี (Dengue viruses) จัดอยู่ใน family Flaviviridae ใน genus *Flavivirus* เป็น positive-sense, single-stranded RNA virus มีขนาดของสารพันธุกรรมประมาณ 11 Kb ประกอบไปด้วย โปรตีน 10 ชนิด คือ structural proteins 3 ชนิด (Membrane protein : M, Envelope protein : E และ Capsid protein : C) และ Nonstructural Protein 7 ชนิด (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) ตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 Dengue genome (1)

Dengue viruses มีโครงสร้างของเชื้อและสารพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันหลายชนิด เช่น Yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus และ Tick-borne encephalitis virus เป็นต้น การติดเชื้อไข้เลือดออกสามารถแบ่งได้เป็น 4 serotypes คือ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 ซึ่งแบ่งตามการตอบสนองของแอนติบอดีในซีรัมมนุษย์ (1) โดยในแต่ละซีโรทัยป์ สามารถแบ่งได้เป็นหลากหลาย genotype (2) ดังนี้

Dengue serotype 1 ประกอบไปด้วย 5 genotype

1. genotype I เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และแอฟริกาตะวันออก
2. genotype II เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากประเทศไทยที่รวบรวมในปี 1950 และ 1960
3. genotype III เป็นตัวแทนของ sylvatic strain ในมาเลเซีย
4. genotype IV เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากหมู่เกาะแปซิฟิกตะวันตกและออสเตรเลีย
5. genotype V เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ทั้งหมดที่รวบรวมในอเมริกา สายพันธุ์จากแอฟริกาตะวันตก และสายพันธุ์ที่รวบรวมจากเอเชียจำนวนจำกัด

Dengue serotype 2 ประกอบไปด้วย 6 genotype

1. Asian genotype 1 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากมาเลเซียและประเทศไทย
2. Asian genotype 2 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากเวียดนาม, จีน, ไต้หวัน, ศรีลังกา และฟิลิปปินส์
3. The cosmopolitan genotype เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ของการกระจายทางภูมิศาสตร์ในวงกว้าง รวมถึงออสเตรเลีย แอฟริกาตะวันออกและตะวันตก หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิกและอินเดีย อนุทวีปอินเดีย และตะวันออกกลาง
4. The American genotype เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากละตินอเมริกาและสายพันธุ์เก่าที่รวบรวมจากแคริบเบียน อนุทวีปอินเดีย และหมู่เกาะแปซิฟิกในทศวรรษ 1950 และ 1960
5. the Southeast Asian/American genotype เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากประเทศไทยและเวียดนาม และสายพันธุ์ที่รวบรวมในอเมริกาในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา

6. the sylvatic genotype เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่รวบรวมจากมนุษย์ ยุงป่า หรือลิง ยามในแอฟริกาตะวันตกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Dengue serotype 3 ประกอบไปด้วย 4 genotype

1. genotype I เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากอินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และสายพันธุ์ล่าสุดที่แยกได้จากหมู่เกาะแปซิฟิกใต้
2. genotype II เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากประเทศไทย เวียดนาม และบังคลาเทศ
3. genotype III เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากศรีลังกา อินเดีย แอฟริกา และซามัว
4. genotype IV เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากเปอร์โตริโก ละตินและอเมริกากลาง และสายพันธุ์ตาฮิติปี 1965 สายพันธุ์ซิลวาติคของ DENV-3 ยังไม่ได้รับการแยกออกจนถึงปัจจุบัน แต่เชื่อกันว่ามีอยู่ในมาเลเซีย โดยอิงจากการแปลง seroconversion ของลิง Sentinel

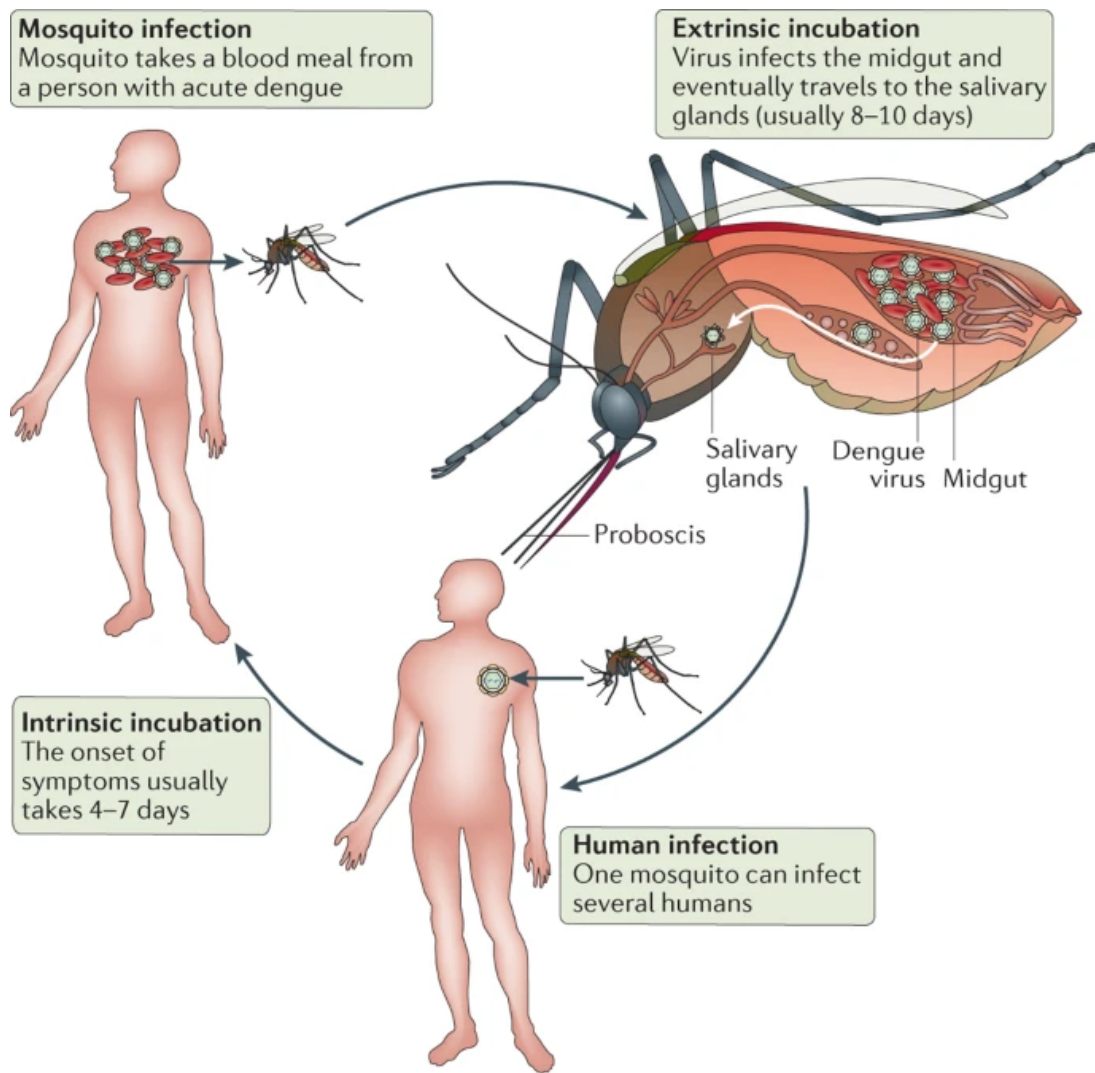
Dengue serotype 4 ประกอบไปด้วย 4 genotype

1. genotype I เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากประเทศไทย ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา และญี่ปุ่น (นำเข้าจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้)
2. genotype II เป็นตัวแทนของสายพันธุ์จากอินโดนีเซีย มาเลเซีย ตาฮิติ แคริบเบียน และอเมริกา
3. genotype III แสดงถึงสายพันธุ์ไทยล่าสุดที่แตกต่างจากสายพันธุ์ไทยอื่นๆ
4. genotype IV ซึ่งเป็นตัวแทนของสายพันธุ์ซิลวาติคจากมาเลเซีย

โดยการติดเชื้อของทั้ง 4 ซีโรทัยป์ส่งผลต่ออาการทางคลินิกที่หลากหลาย แต่ 70% - 80% ของผู้ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการ (asymptomatic infection) (3-5) โดยอาการทางคลินิกมีตั้งแต่เป็นไข้เพียงเล็กน้อย (Dengue fever) ไปจนถึงมีไข้เลือดออก (Dengue haemorrhagic fever : DHF) หรือในกรณีมีภาวะช็อคร่วม ด้วย (Dengue shock syndrome : DSS) ส่วนใหญ่ผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีอาการรุนแรงเกิดจากการติดเชื้อครั้งที่สอง (Secondary infection) ที่มีซีโรทัยป์แตกต่างกับการติดเชื้อครั้งแรก (Primary infection) (5)

2.2 การแพร่กระจาย (Transmission)

ไวรัสเดงกีแพร่กระจายในคน โดยการกัดของยุงลาย (*Aedes aegypti*) ซึ่งเป็นพาหะนำโรค ตามรูปที่ 2 เมื่อยุงลายกัดคนที่ไวรัสเดงกีในร่างกาย (viraemic phase) ในช่วง extrinsic phase เชื้อจะเข้าไปฝังตัวภายในกระเพาะและต่อมน้ำลายของยุงโดยมีระยะฟักตัวประมาณ 8- 10 วัน หลังจากนั้นยุงที่ติดเชื้อ (infected mosquito) จะสามารถแพร่กระจายเชื้อไวรัสสู่คนอื่นได้โดยการกัดแล้วปล่อยเชื้อไวรัสจากต่อมน้ำลายเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อไวรัสเดงกีเข้าสู่ร่างกาย จะใช้เวลาประมาณ 4-7 วัน จะเริ่มมีอาการไข้และสามารถแพร่เชื้อไวรัสเดงกีไปยังยุงตัวใหม่ได้ (intrinsic incubation) โดยคนที่มีอาการแสดงหรือไม่มีอาการแสดง ก็จะสามารถแพร่เชื้อไวรัสเดงกีไปยังยุงตัวใหม่ได้เหมือนกัน (6)



Nature Reviews | Disease Primers

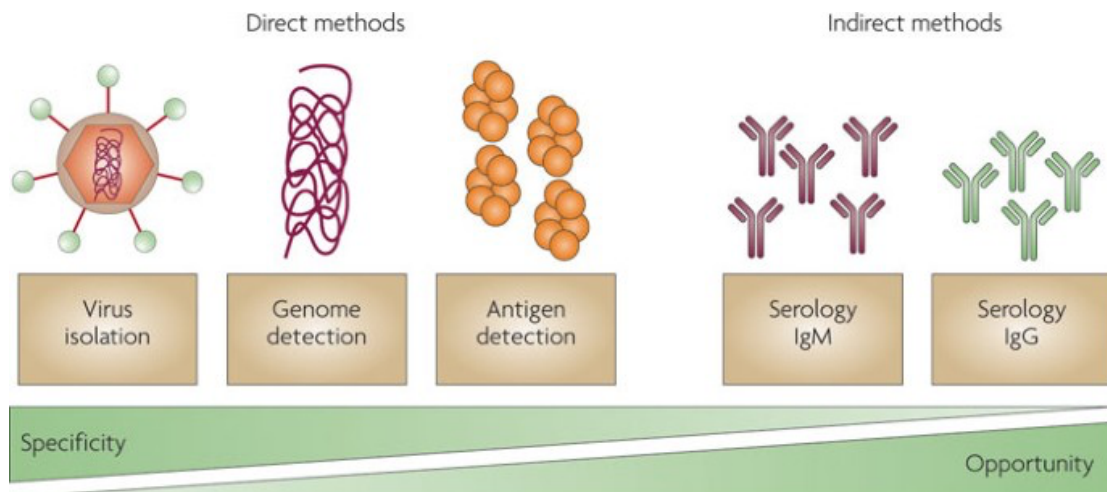
รูปที่ 2 Dengue virus cycle ในคนและในยุง

2.3 พยาธิสภาพ (Pathophysiology)

การติดเชื้อไวรัสเดงกี อาจจะไม่แสดงอาการ หรือมีอาการทางคลินิกที่หลากหลายเช่น การมีไข้ การมีเลือดออกทางผิวหนัง สุดท้ายเป็นความผิดปกติทางสรีรวิทยาที่ซับซ้อนซึ่งส่งผลต่อระบบต่างๆ รวมถึง การแข็งตัวของเลือด สารเติมเต็ม (complement) การสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) และระบบหลอดเลือด (vascular systems)

2.4 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

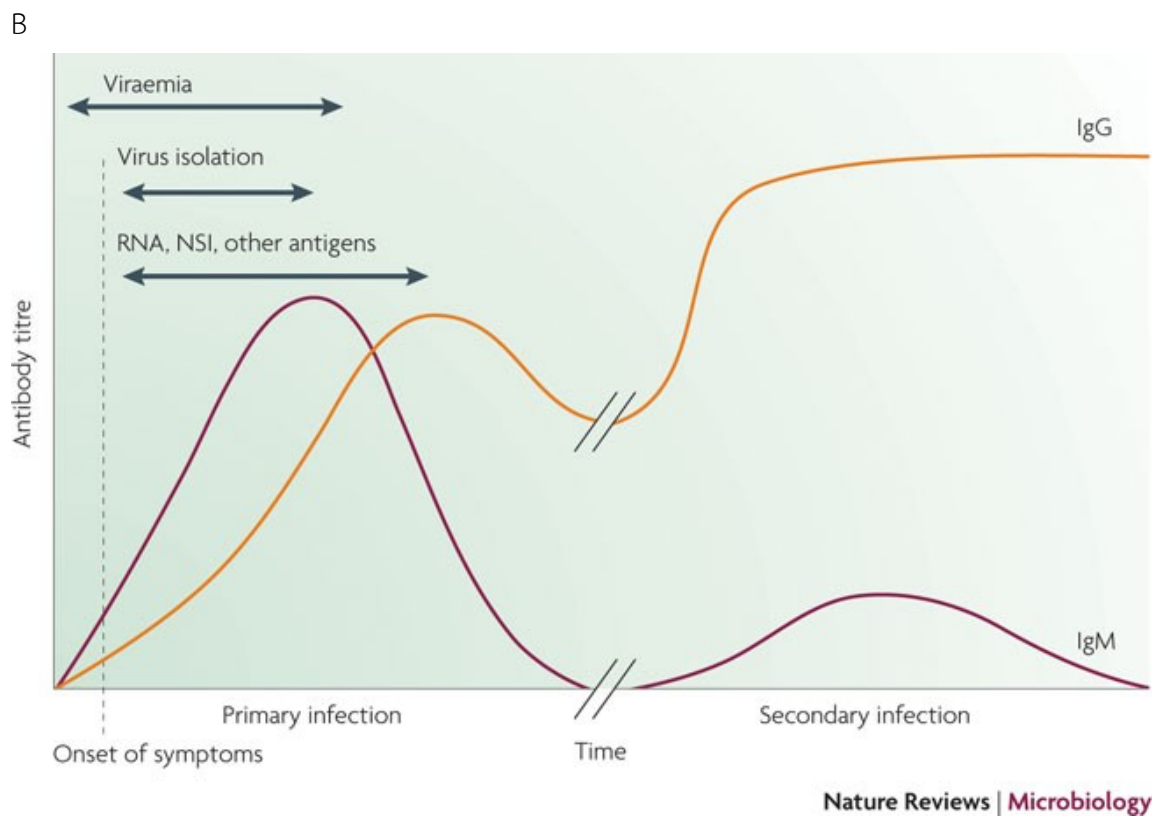
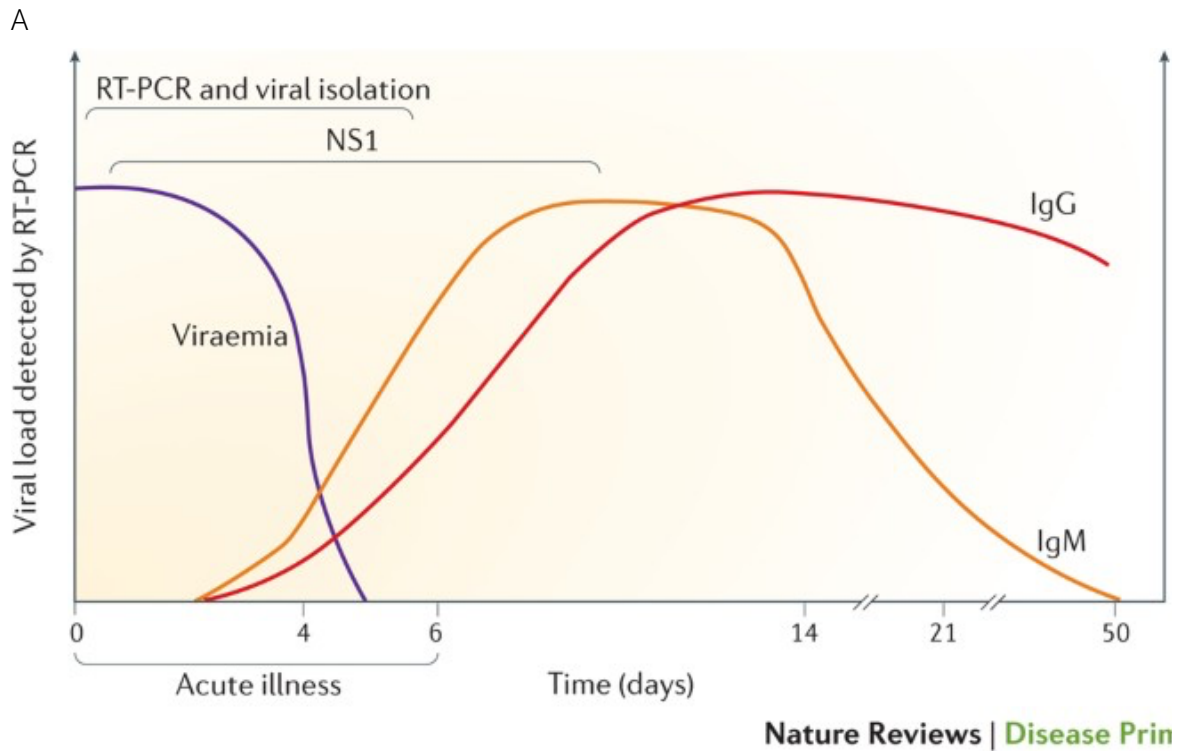
การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคไข้เลือดออกจะแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก คือ การตรวจหาชิ้นส่วนของตัวไวรัสโดยตรง (Virological tests or Direct methods) และการตรวจหาแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสที่เข้าสู่ร่างกาย (Serological tests or Indirect methods) ตามรูปที่ 3 (1, 7)



Nature Reviews | Microbiology

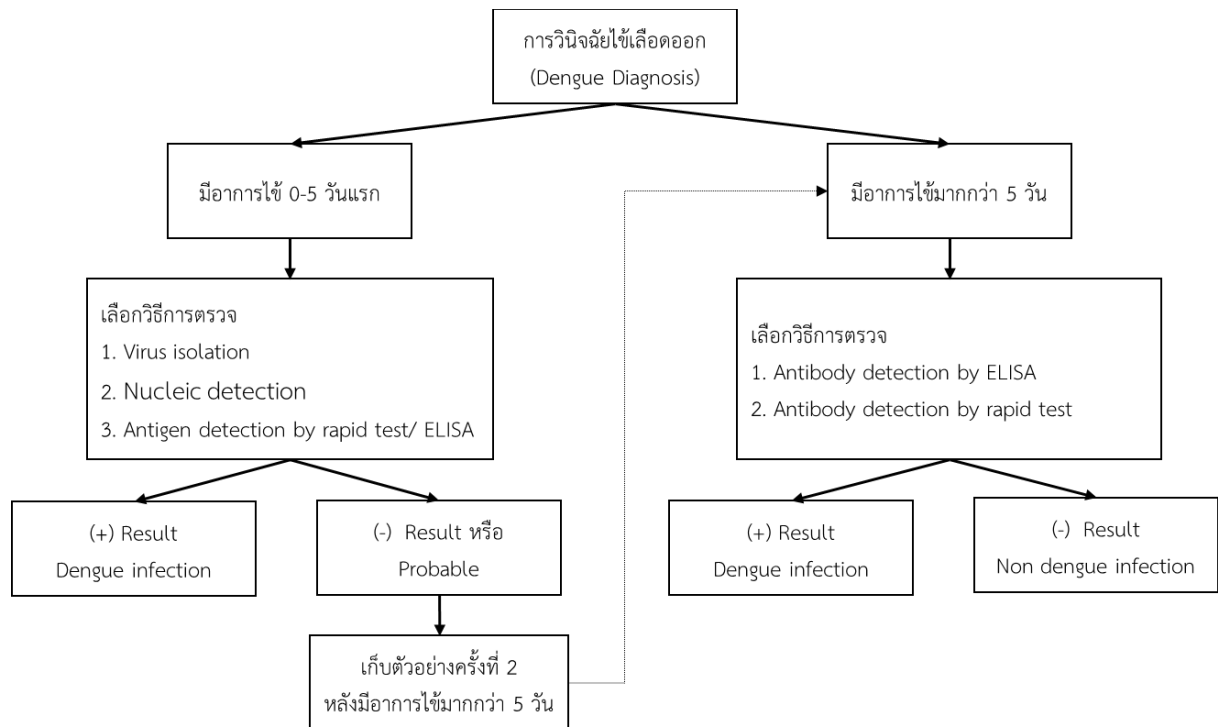
รูปที่ 3 วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก (7)

การเลือกใช้วิธีในการตรวจไข้เลือดออกให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการ ตามรูปที่ 4A (4) โดยจะตรวจหาไวรัสในกระแสเลือด (DENV viraemia) ได้ก่อนที่จะมีอาการไข้ 24 - 48 ชั่วโมง จนถึงวันที่ 5 - 6 หลังจากมีอาการไข้ และในช่วงเวลานี้จะสามารถตรวจหา RNA virus และโปรตีน NS1 (Nonstructural protein 1) ในเลือดของผู้ป่วยได้ การตรวจหา Antibody ที่ตอบสนองต่อ DENV จะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสปฐมภูมิ (Primary infection) หรือครั้งที่สอง (Secondary infection) โดยทั่วไปเมื่อมีการติดเชื้อครั้งแรก ในวันที่ 5 หลังจากผู้ป่วยแสดงอาการ IgM จะเป็น Immunoglobulin ชนิดแรกที่ปรากฏขึ้นมา และมีระดับที่สูงขึ้นจนถึง 2 สัปดาห์และหลังจากนั้น 2 - 3 เดือน จะลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ในขณะที่ร่างกายได้ผลิต Immunoglobulin อีกชนิดคือ IgG ซึ่งจะสามารถตรวจได้ในปริมาณที่ต่ำหลังจากมีอาการไข้ในสัปดาห์แรก และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น คงอยู่ในกระแสเลือดจนสามารถตรวจวัดได้เป็นเวลาหลายเดือนหรืออาจอยู่จนตลอดชีวิต (8, 9) แต่ถ้ามีการติดเชื้อทุติยภูมิ (Secondary infection) ซึ่งอาจจะเป็นซีโรทัยป์เดิม หรือซีโรทัยป์อื่น รวมทั้งไวรัสในกลุ่ม Flaviviruses ชนิดอื่น ก็จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันข้ามชนิดได้ ส่งผลให้มีอาการของไข้เลือดออกที่รุนแรงขึ้น โดยระดับของ IgG จะถูกตรวจวัดได้ในปริมาณที่สูงขึ้นถึงแม้จะเป็นช่วงแรกของการติดเชื้อ และคงสูงเป็นระยะเวลานานจนกระทั่งตลอดชีวิต โดยการติดเชื้อในครั้งที่สองนี้ ระดับ IgM จะสามารถตรวจได้ลดลงกว่าการติดเชื้อในครั้งแรก ซึ่งระดับแอนติบอดีของ IgM/IgG สามารถจำแนกได้ว่าเป็นการติดเชื้อแบบ Primary infection หรือ Secondary infection ตามรูปที่ 4B (9)



รูปที่ 4 การวินิจฉัยไขเลือดออก ตามระยะเวลาของการแสดงอาการในผู้ป่วย (A) และความแตกต่างของ titer ระหว่าง IgG กับ IgM ในการติดเชื้อ Primary infection และ Secondary infection (B)

แผนภูมิการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการ



การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก

วิธีการตรวจ วินิจฉัย	หลักการตรวจ วินิจฉัย	ชนิดสิ่งส่งตรวจ	รายละเอียดวิธีการตรวจ
Virus isolation	Virus culture	Serum, Plasma, Whole blood, Buffy coat, Tissue	-เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อไวรัส -ใช้เวลาในการวินิจฉัยนาน 1-2 สัปดาห์ -ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ
Nucleic detection	RT-PCR, qRT-PCR	Serum, Plasma, Whole blood, Tissue	-สามารถแยกซีโรทัยป์ได้ ได้ผลการวินิจฉัยที่มีความจำเพาะสูง -ใช้ระยะเวลาในการตรวจเพียง 1-2 วัน -ใช้เครื่องมือเฉพาะในการวินิจฉัย
Antigen detection	NS1 Ag Rapid tests	Whole blood, Plasma/serum	-สามารถอ่านผลได้ภายใน 30 นาที -ใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน -สามารถตรวจได้ในช่วง 5 วันหลังจากมีอาการไข้ -มีช่วงของความไวและความจำเพาะของชุดตรวจที่หลากหลาย

วิธีการตรวจวินิจฉัย	หลักการตรวจวินิจฉัย	ชนิดสิ่งส่งตรวจ	รายละเอียดวิธีการตรวจ
Antibody detection	Rapid tests	Plasma/serum	-สามารถอ่านผลได้ภายใน 30 นาที -ใช้งานง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะในการวินิจฉัย - อาจเกิด cross reaction ระหว่างเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกัน ใช้ในการตรวจคัดกรองขั้นต้นได้
	ELISA	Plasma/serum	-เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก -สามารถแยกการติดเชื้อเป็น primary infection หรือ secondary infection -ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 1-2 วัน
	Plaque reduction neutralization test (PRNT)	Plasma/serum	-ตรวจหา antibody ที่จำเพาะและสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกได้ -ใช้ระยะเวลาในการตรวจ 8-10 วัน -ขั้นตอนการทดสอบยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง -ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ

การเก็บสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

หลักการตรวจวินิจฉัย	วิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจ
-Virus culture หรือ Nucleic detection	- ควรใช้ plasma หรือ serum ที่เจาะเลือดในระยะมีไข้ แยกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C ในกรณีที่ไม่มีตู้แช่ที่อุณหภูมิ -70°C, dry ice หรือ liquid nitrogen ควรเก็บ whole blood (EDTA blood หรือ clot blood) ในอุณหภูมิ 4°C และนำส่งห้องปฏิบัติการโดยแช่น้ำแข็งภายใน 24 ชั่วโมง
Antibody detection (IgM/IgG)	- เจาะเลือดผู้ป่วยใส่หลอดเลือดชนิด clotted blood (ฝาแดง) หรือหลอด EDTA (ฟ้าม่วง) ประมาณ 5 มิลลิลิตร ปั่นแยกน้ำเหลืองใส่หลอดพลาสติกขนาดเล็ก หลอดละประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร

3) วัตถุประสงค์

เพื่อทราบข้อมูลซีโรทัยป์ไข้เลือดออกในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย ในปี 2560-2562

4) วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเฝ้าระวังโรคติดต่อมาโดยง่ายได้ประสานกับโรงพยาบาลทั่วประเทศ และชี้แจงแนวทางการเก็บตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา เพื่อการเฝ้าระวังชิโรทัยป์ ไข้เลือดออก (Dengue surveillance) ในปี 2560-2562 ใช้เกณฑ์การคัดเลือกคือ ผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยมีเกณฑ์อย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้ i.) ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test) ไวรัสเดงกี และให้ผลบวก (Positive) ii.) ผู้ป่วยเป็นไข้ไม่เกิน 5 วัน และ iii.) ผล CBC พบจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 5,000 cells/ml (พบ Lymphocyte เด่น หรือพบ Atypical lymphocyte) รายละเอียดตามภาคผนวก 1

การตรวจหาชนิดของไวรัสไข้เลือดออกโดยวิธีอณูชีวโมเลกุล

ตัวอย่างเลือดทั้งหมดนำมาสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ MagNA Pure LC 2.0 (Roche) ตัวอย่างละ 200 ไมโครลิตร ด้วยชุดสกัด MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) และเก็บสารพันธุกรรมที่สกัดได้ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปหาสารพันธุกรรมโดยวิธี Real-time RT-PCR (TaqMan) assay โดยสอดคล้องตามบทความวิจัยของ Johnson BW และคณะในปี 2005 (10) โดยนำ RNA template 5 ไมโครลิตร ใช้กับชุด QuantiTect RT-PCR (Qiagen) ลงในเครื่อง The LightCycler 480 real-time PCR system (Roche) โดยใช้ Positive control จาก cell culture เชื้อไวรัสเดงกีชิโรทัยป์ 1-4 ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากฝ่ายอาชีวไวรัส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และใช้ PBS เป็น Negative Control ในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม (ภาคผนวก 2)

5) ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

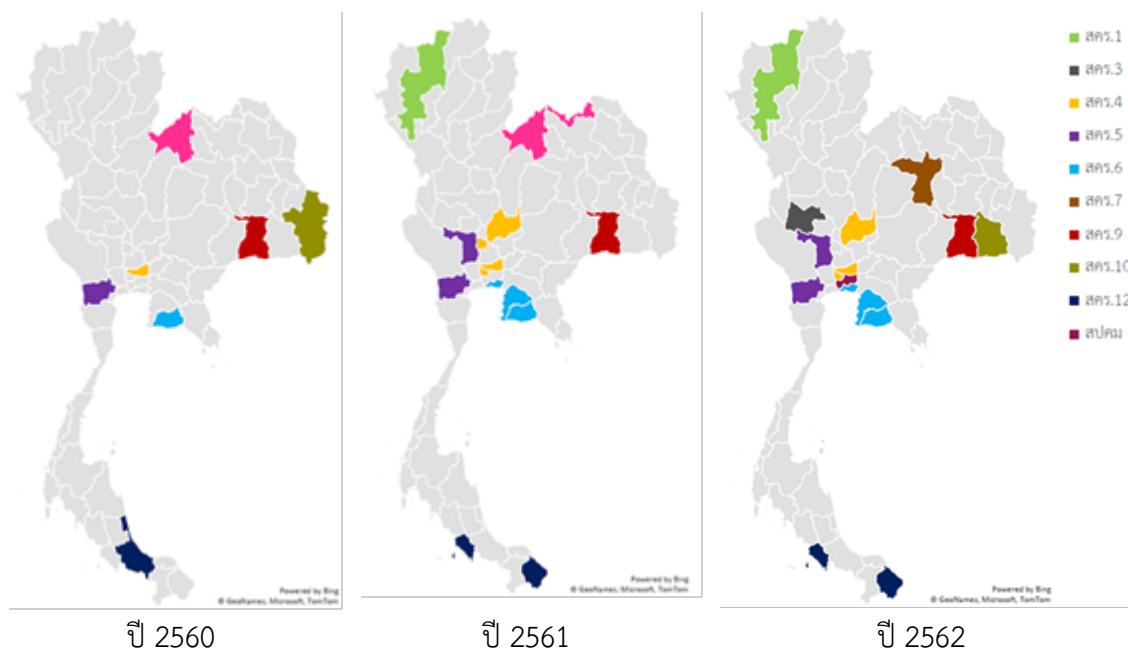
แนวทางการเก็บตัวอย่างเพื่อการเฝ้าระวังชิโรทัยป์ ไข้เลือดออก (Dengue surveillance) ในปี 2560-2562 ใช้เกณฑ์การคัดเลือกคือ ผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยมีเกณฑ์อย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้ i.) ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test) ไวรัสเดงกี ไวรัสชิกา หรือไวรัสซิกุนกุนยาและให้ผลบวก (Positive) ii.) ผู้ป่วยเป็นไข้ไม่เกิน 5 วัน และ iii.) ผล CBC พบจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 5,000 cells/ml (พบ Lymphocyte เด่น หรือพบ Atypical lymphocyte) ดำเนินการประสานโรงพยาบาลในพื้นที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1- 12 (สคร.1-12) และสถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง (สปคม.) โดยมีจำนวนตัวอย่างจากโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการส่งตัวอย่างตรวจเพื่อเฝ้าระวังชิโรทัยป์ ไข้เลือดออกในปี 2560 จำนวน 327 ราย ปี 2561 จำนวน 972 ราย และปี 2561 จำนวน 799 ราย ดังตารางที่ 1 ประกอบไปด้วย ตัวอย่างตรวจจากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ อุทัยธานี นนทบุรี ปทุมธานี ลพบุรี อ่างทอง ราชบุรี

สุพรรณบุรี ชลบุรี ระยอง สมุทรปราการ ขอนแก่น เลย หนองคาย สุนทร ศรีสะเกษ อุบลราชธานี
นราธิวาส สงขลา สตูล ดังแผนที่รูปที่ 1 (รายชื่อโรงพยาบาลที่เข้าร่วมตามภาคผนวกที่ 3)

ตารางที่ 1 จำนวนโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการส่งตัวอย่างตรวจเพื่อเฝ้าระวังซีโรทัยป์ใช้เลือดออกใน
ปี 2560-2561

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างส่งตรวจ			รวม
	2560	2561	2562	
สคร .1				
เชียงใหม่	-	54	22	76
สคร .2				
-	-	-	-	-
สคร .3				
อุทัยธานี	-	-	5	5
สคร .4				
นนทบุรี	-	25	11	36
ปทุมธานี	81	107	30	218
ลพบุรี	-	15	60	75
อ่างทอง	-	87		87
สคร .5				
ราชบุรี	36	25	33	94
สุพรรณบุรี	-	72	37	109
สคร .6				
ชลบุรี	-	51	94	145
ระยอง	42	262	140	444
สมุทรปราการ	-	99	54	153
สคร .7				
ขอนแก่น	-	-	55	55
สคร .8				
เลย	14	4	-	18
หนองคาย	-	37	-	37
สคร .9				
สุรินทร์	97	57	93	247

สคร .10				
ศรีสะเกษ	-	-	41	41
อุบลราชธานี	35	-	-	35
สคร .11	-	-	-	-
สคร .12				
นราธิวาส	-	38	64	102
สงขลา	22			22
สตูล	-	39	1	40
สปคม.				
กรุงเทพมหานคร	-	-	59	59
รวมทั้งหมด	327	972	799	2,098

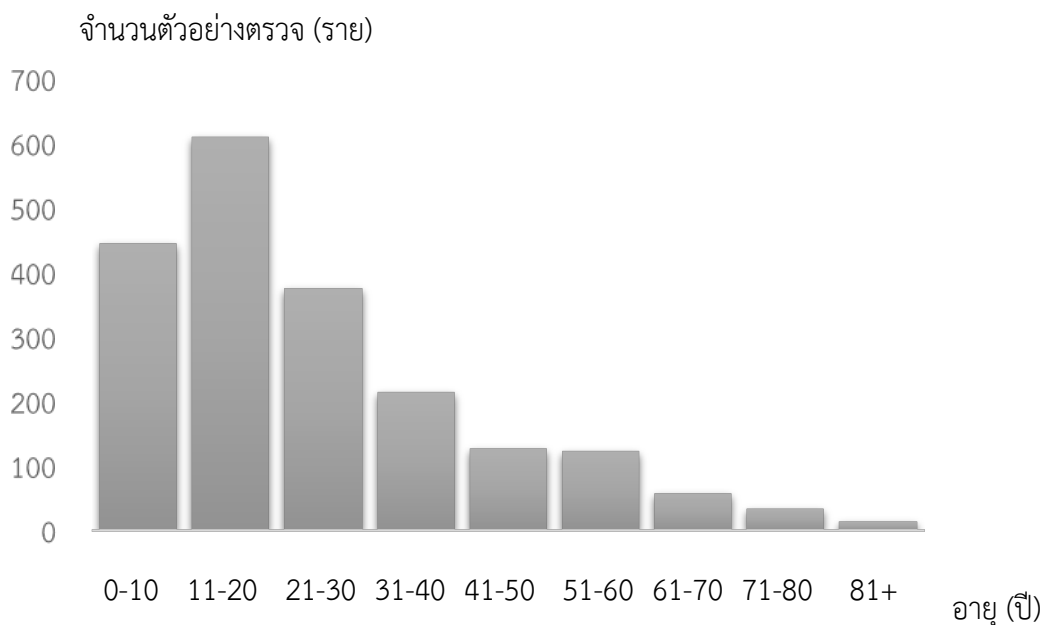


รูปที่ 1 แผนที่แสดงจังหวัดที่ส่งตัวอย่างตรวจเพื่อเฝ้าระวังซีโรทัยป์ไข้เลือดออกในปี 2560-2562

ช่วงอายุของตัวอย่างตรวจผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี ปี 2560 ตั้งแต่อายุต่ำสุด 3 เดือนและสูงสุด 77 ปี โดยมีค่ามัธยฐานของอายุอยู่ที่ 19 ปี 2561 ตั้งแต่อายุต่ำสุด 4 วันและสูงสุด 94 ปี โดยมีค่ามัธยฐานของอายุอยู่ที่ 20 ปี และปี 2562 ตั้งแต่อายุต่ำสุด 3 เดือนและสูงสุด 85 ปี โดยมีค่ามัธยฐานของอายุอยู่ที่ 19 ปี ตามตารางที่ 2 เมื่อรวมข้อมูลทั้งสามปี มีค่ามัธยฐานของอายุที่ 20 ปี ตามรูปที่ 2

ตารางที่ 2 ช่วงอายุของตัวอย่างตรวจงานเฝ้าระวังในผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี ปี 2560-2562

ปี	อายุต่ำสุด	อายุสูงสุด	ค่ามัธยฐาน
2560	3 เดือน	77 ปี	19 ปี
2561	4 วัน	94 ปี	20 ปี
2562	3 เดือน	85 ปี	19 ปี



รูปที่ 2 ช่วงอายุของตัวอย่างตรวจผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี ปี 2560-2562

การตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR จากตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา ในโครงการการเฝ้าระวังซิกาไวรัสที่ใช้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2560-2562 (ตารางที่3) โดยพบชนิดของไวรัส DENV-4 มากที่สุดในปี 2560 และพบชนิดของไวรัส DENV-1 มากที่สุดในปี 2561 และ 2562 พบการติดเชื้อร่วม (Co-infection) ระหว่าง DENV-1 และ DENV-4 จากจังหวัดปทุมธานี

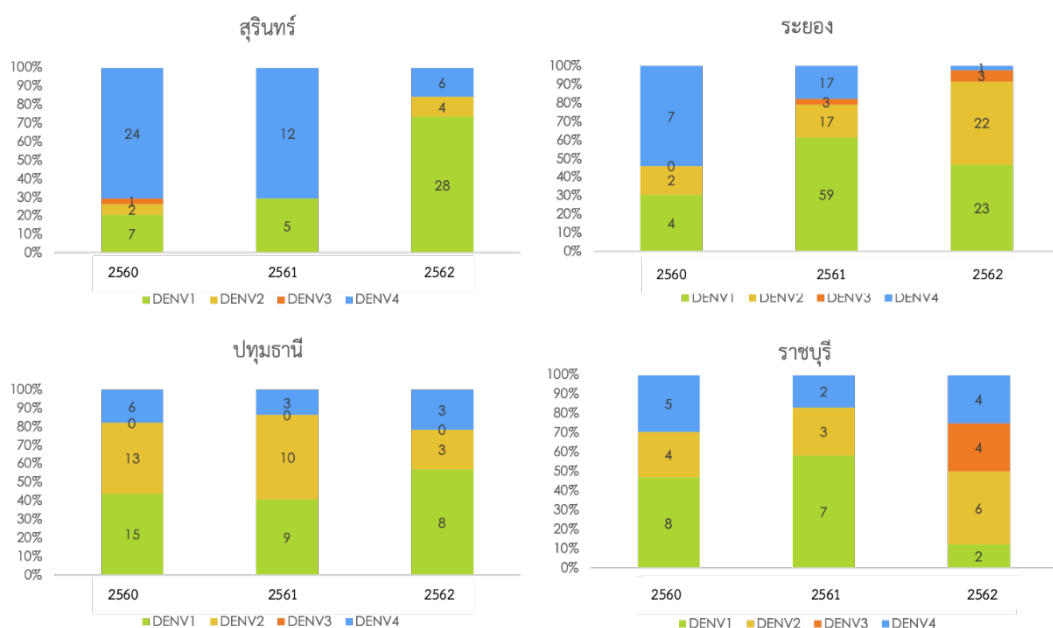
โดยเฉลี่ยทั้งสามปี พบว่า ร้อยละ 65.11 จากตัวอย่างตรวจทั้งหมด ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR (รายละเอียดผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR ในพื้นที่แต่ละจังหวัดปี 2560-2562 ภาคผนวก 4)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR ปี 2560-2562

RT-qPCR	2560	2561	2562	Total
DENV-1	11.62%	19.03%	25.41%	20.31%
DENV-2	6.73%	5.97%	7.88%	6.82%
DENV-3	0.92%	1.75%	1.63%	1.57%
DENV-4	15.60%	6.17%	2.13%	6.10%
Negative	64.53%	67.08%	62.95%	65.11%
Co-infection*	0.31%			0.05%
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	327	972	799	2,098

*Co-infection: DENV-1 และ DENV-4

จังหวัดที่มีการส่งตัวอย่างเพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีต่อเนื่องทั้งสามปี 2560-2562 ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดระยอง จังหวัดราชบุรี และจังหวัดสุรินทร์ เมื่อเปรียบเทียบกับภาพรวมชนิดของไวรัสทั้งหมดจะพบว่า ในแต่ละพื้นที่จะมีชนิดของไวรัสที่เด่นแต่ต่างกัน เช่น ปี 2560 ภาพรวมทั้งประเทศพบชนิดของไวรัส DENV-4 มากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลของจังหวัดปทุมธานีและราชบุรีที่ DENV-1 มากที่สุด



6) บทสรุป

การวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับระยะเวลาแสดงอาการของผู้ป่วย ซึ่งจะส่งผลต่อการตรวจไข้เลือดออกให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสไข้เลือดออกช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่างคือ ผู้ป่วยมีอาการไข้ไม่เกิน 5 วัน จากผลการดำเนินงานตรวจหาสารพันธุกรรมเพื่อเฝ้าระวังไวรัสไข้เลือดออกพบ Negative ที่มากกว่าร้อยละ 65 มาจากหลายสาเหตุที่สามารถเกิดขึ้นได้ เช่น i. ผู้ป่วยมีอาการไข้เลือดออกมากกว่า 5 วัน ii. ผู้ป่วยเป็นไข้จากเชื้อก่อโรคชนิดอื่นที่ไม่ใช่ไวรัสไข้เลือดออก iii. Limit of Detection (LOD) ของวิธีที่เลือกใช้ในการตรวจ iv. เนื่องจากไวรัสเดงกีเป็น RNA virus การเก็บรักษาและการขนส่งจึงเป็นปัจจัยสำคัญมากในการรักษาสภาพสารพันธุกรรมของไวรัสให้คงอยู่ได้

การดำเนินการเฝ้าระวังซีโรทัยป์ไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2560-2562 มีเกณฑ์การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกที่พบได้พื้นที่จริง ซึ่งเมื่อนำข้อมูลชนิดของไวรัสไข้เลือดออกจากคนไข้เสียชีวิต จะพบว่าส่วนใหญ่คนไข้เสียชีวิตด้วย DENV-2 ซึ่งเป็นข้อมูลที่แตกต่างจากการเฝ้าระวังชนิดของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในพื้นที่จริง โดยสอดคล้องกับหลายบทความวิจัยที่พบว่าการติดเชื้อ DENV-2 ส่งผลให้มีอาการ DHF และ DSS ที่รุนแรงเพิ่มขึ้น (11) ซึ่งการเก็บข้อมูลเพื่อการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ไข้เลือดออกมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการพยากรณ์ ที่อาจบ่งบอกความรุนแรงของการระบาดของโรคไข้เลือดออกในแต่ละพื้นที่ และเพื่อเป็นประโยชน์ในการกระตุ้นการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกที่จะเกิดขึ้นในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยต่อไป

7) เอกสารอ้างอิง

1. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol. 2010;8(12 Suppl):S7-16.
2. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infect Genet Evol. 2009;9(4):523-40.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496(7446):504-7.
4. Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. J Infect Dis. 2017;215(suppl_2):S89-S95.
5. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. Am J Trop Med Hyg. 1974;23(5):974-82.

6. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16055.
7. Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nat Rev Microbiol. 2010;8(12 Suppl):S30-8.
8. Organization WH. Dengue and severe dengue. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean; 2014.
9. Organization WH, Research SPf, Diseases TiT, Diseases WHODOCoNT, Epidemic WHO, Alert P. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World Health Organization; 2009.
10. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4977-83.
11. Vicente CR, Herlinger KH, Froschl G, Malta Romano C, de Souza Areias Cabidelle A, Cerutti Junior C. Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitoria, Brazil. BMC Infect Dis. 2016;16:320.

8) ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 แนวทางการเก็บตัวอย่างเพื่อเฝ้าระวังชิโรทัยป์ไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2560-2562

ภาคผนวก 2 วิธีการตรวจหาชนิดของไวรัสไข้เลือดออกโดยวิธีอนุชีวมเลกุล

ภาคผนวก 3 รายชื่อโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการเก็บตัวอย่างเพื่อเฝ้าระวังชิโรทัยป์ไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2560-2562

ภาคผนวก 4 ผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR จากการเฝ้าระวังชิโรทัยป์ไข้เลือดออกในพื้นที่แต่ละจังหวัดในประเทศไทย ปี 2560-2562

4. สัดส่วนของผลงานในส่วนที่ตนเองปฏิบัติ (%) (ระบุรายละเอียดของผลงานเฉพาะส่วนที่ตนเองปฏิบัติ พร้อมทั้งสัดส่วนของผลงาน)

สัดส่วนของผลงานในส่วนที่ตนเองปฏิบัติ คิดเป็นร้อยละ 80 โดยดำเนินการในส่วนของ

1. ศึกษา ทบทวน งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวินิจฉัยชิโรทัยป์ไข้เลือดออก
2. จัดทำแนวทางการเก็บตัวอย่างตรวจเพื่อการเฝ้าระวังชิโรทัยป์ไข้เลือดออกในโรงพยาบาล
3. ประสานงานกับสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1- 12 สถาบันป้องกันควบคุมโรค สำนักงานสาธารณสุข และโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการเก็บตัวอย่างเพื่อเฝ้าระวังชิโรทัยป์ไข้เลือดออก

4. พัฒนาวิธีการตรวจและจัดทำคู่มือการตรวจวินิจฉัยซีโรทัยป์ไข้เลือดออก โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล
5. ดำเนินการตรวจวินิจฉัยซีโรทัยป์ไข้เลือดออกทางห้องปฏิบัติการ
6. วิเคราะห์และแปลผลทางห้องปฏิบัติการ
7. สรุปผลการเฝ้าระวังซีโรทัยป์ ปี 2560-2562

5. ผู้ร่วมจัดทำผลงาน (ถ้ามี)

- | | | |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 5.1 นางประภา อนันตสุข | นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ | สัดส่วนของผลงาน 10% |
| 5.2 พญ.ดารินทร์ อารีโขชัย | นายแพทย์เชี่ยวชาญ | สัดส่วนของผลงาน 10% |

(ลงชื่อ)

(นางสาวพัชรินทร์ บุญอินทร์)

ผู้เสนอผลงาน

...../...../.....

เอกสารชี้แจงขั้นตอนการดำเนินงาน เพื่อเฝ้าระวังเชื้อไวรัส่นำโดยแมลง

การเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย
เพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี

กองโรคติดต่อนำโดยแมลง
กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

ขั้นตอนการดำเนินงานเฝ้าระวังไวรัสโรคติดต่อ นำโดยยุยงลาย

๑. การเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี จาก
 - ๑.๑ เลือกโรงพยาบาลภายในเขตบริการสุขภาพ ในพื้นที่รับผิดชอบของสคร.
 - ๑.๑.๑ โรงพยาบาลประจำจังหวัดหรือ รพศ., รพท. อย่างน้อย ๑ แห่ง หรือมากกว่านั้น
 - ๑.๑.๒ โรงพยาบาลชุมชนไม่จำกัดจำนวน (ควรเลือกโรงพยาบาลในอำเภอที่มีอุบัติการณ์ของโรคสูง)
 - ๑.๒ ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล และ/หรือ มีการส่งตัวอย่างตรวจมาที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรค หรือสถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง ซึ่งควรส่งตัวอย่างให้ครอบคลุมทั้งผู้มีอาการไม่รุนแรง และอาการรุนแรง
๒. แบ่งอุปกรณ์ไปตามโรงพยาบาลในจังหวัดที่ถูกเลือก เพื่อเก็บตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา
๓. เลือกเก็บตัวอย่าง ซีรัมหรือพลาสมา ของผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยมีเกณฑ์อย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้
 - ๓.๑ ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test) ไวรัสเดงกี และให้ผลบวก (Positive)
 - ๓.๒ ผู้ป่วยเป็นไข้ไม่เกิน ๕ วัน
 - ๓.๓ ผล CBC พบจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า ๕,๐๐๐ cells/ml (พบ Lymphocyte เด่น หรือพบ Atypical lymphocyte)
๔. ลงข้อมูลผู้ป่วยในแบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี โดยกรอกข้อมูลผู้ป่วยดังนี้

แบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี	
ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการฯ กองโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข	
1. อายุของผู้ป่วย.....ปี.....เดือน ที่อยู่ของผู้ป่วยอำเภอ.....จังหวัด.....	Barcode
2. สงสัยว่าติดเชื้อ ☐ Dengue ☐ Other	
3. WBC count.....cells/ml (ถ้ามี)	
4. ผลการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test)	
ชื่อสินค้าชุดตรวจอย่างรวดเร็ว.....รุ่น.....	
☐ Dengue Antigen (NS1) ☐ Negative ☐ Positive ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้	
☐ Dengue Antibody (IgM/IgG) ☐ Negative ☐ Positive IgG ☐ Positive IgM ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้	
☐ ชุดตรวจอื่นๆ.....	
5. วันที่เก็บซีรัม/พลาสมา.....ผู้เก็บตัวอย่างเลือด.....	

๕. ระยะเวลาที่จัดเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนตุลาคม ๒๕๕๙ – กันยายน ๒๕๖๒ โดยศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการฯ กองโรคติดต่อ นำโดยแมลง จะทำการตรวจในสัปดาห์ที่ ๓ ของทุกเดือน และแจ้งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการกลับภายใน วันที่ ๑๐ ของเดือนถัดไป โดยแจ้งผลกลับไปยังสำนักงานป้องกันควบคุมโรคและสาธารณสุขจังหวัดที่ประสานการเก็บ ตัวอย่าง (โรงพยาบาลสามารถแจ้งชื่อและอีเมลในกรณีที่ต้องการผลการตรวจโดยตรง ที่แบบบันทึกการเก็บตัวอย่าง)
๖. รวบรวมซีรัม/พลาสมาของผู้ป่วย ทั้งหมดที่สามารถเก็บได้ พร้อมแบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดฯ ส่งมาที่ นางสาวพัชรินทร์ บุญอินทร์ ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการฯ อาคาร ๑๑ ชั้น ๑ กองโรคติดต่อ นำโดยแมลง กระทรวงสาธารณสุข ถนนพหลโยธิน ๑๑๐๐๐
๗. หากมีข้อสงสัยหรือสอบถามข้อมูลติดต่อมาที่ นางสาวพัชรินทร์ บุญอินทร์ เบอร์โทรศัพท์ ๐๘๙-๗๘๙๔๐๔๒ หรือ ๐๒-๕๙๐๓๑๒๘ E-mail: Labvbd@gmail.com

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย

เอกสารหมายเลข ๕

ผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี

- 1.ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (RDT) ไวรัสเดงกี และให้ผลบวก(Positive)
- 2.ผู้ป่วยเป็นไข้ไม่เกิน 5 วัน
- 3.ผล CBC พบจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 5,000 cells/ml (พบ Lymphocyte เด่น หรือพบ Atypical lymphocyte)



เลือดผู้ป่วย 3 ml จากหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง (clotted blood tube)
หรือหลอดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง



ปั่นแยกที่ 2,800 - 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
เพื่อแยก serum/plasma



1. ลงข้อมูลในแบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี
2. ติดบาร์โค้ดที่มีหมายเลขเดียวกันกับหลอดเก็บเลือดที่เตรียมให้ ลงแบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดฯ



ใช้ Pasteur pipette ดูด serum/plasma ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดเก็บเลือดขนาดเล็ก



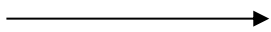
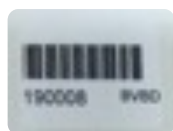
เก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่ -20°C



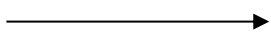
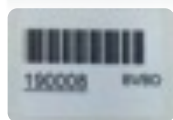
ส่งตัวอย่างเลือดแบบแช่แข็ง(-20°C)มาที่ ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการฯ อาคาร 11
ชั้น 1 กองโรคติดต่ออุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

ตัวอย่างการติด Barcode

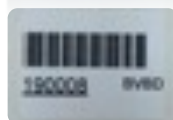
Barcode : ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย 1 ราย มี Barcode เดียวกัน 3 ชุด



1. ติดบนหลอดเก็บตัวอย่าง (ไม่มีขีด)



2. ติดบนแบบฟอร์มส่งตัวอย่าง (มี 1 ขีด)



3. สำรอง
(มี 2 ขีด)

แบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี
ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ กองโรคติดต่อหน้าโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

1. อายุของผู้ป่วย.....ปี.....เดือน ที่อยู่ของผู้ป่วยอำเภอ.....จังหวัด.....

2. สงสัยว่าติดเชื้อ ☐ Dengue ☐ Other

3. WBC count.....cells/ml (ถ้ามี)

4. ผลการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test)
ชื่อสินค้าชุดตรวจอย่างรวดเร็ว.....รุ่น.....

☐ Dengue Antigen (NS1) ☐ Negative ☐ Positive ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้

☐ Dengue Antibody (IgM/IgG) ☐ Negative ☐ Positive IgG ☐ Positive IgM ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้

☐ ชุดตรวจอื่นๆ.....

5. วันที่เก็บซีรัม/พลาสมา.....ผู้เก็บตัวอย่างเลือด.....

อุปกรณ์ที่ส่งมาด้วย

- เอกสารชี้แจงขั้นตอนการดำเนินงานการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี ขั้นตอนการดำเนินงาน, ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง (อยู่ภายในเล่มสีชมพู)
- อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด 10 ตัวอย่าง จำนวน 1 ชุด ประกอบด้วย
 - แบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือด (เล่มสีฟ้า) 1 เล่ม
 - หลอดเก็บเลือดขนาดเล็ก (microcentrifuge tube 1.5 ml) 12 หลอด
 - Pasture pipettes (ที่ดูดเลือด) 10 ชิ้น
 - สติกเกอร์ Barcode 1 แผ่น
 - สติกเกอร์ที่อยู่ผู้รับตัวอย่างเลือด 1 แผ่น
 - ถุงพลาสติกสำหรับใส่หลอดเก็บเลือดขนาดเล็ก 10 ถุง
 - ถุงพลาสติกสำหรับรวบรวมหลอดเก็บเลือด 2 ถุง

แบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือด เพื่อเฝ้าระวังไวรัสเดงกี

ที่ โรงพยาบาล.....

อำเภอ.....

จังหวัด.....

ชื่อผู้ที่ต้องการให้แจ้งผลการตรวจ.....

E-mail.....เบอร์โทรศัพท์.....

แบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี

ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการฯ กองโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

1. อายุของผู้ป่วย.....ปี.....เดือน ที่อยู่ของผู้ป่วยอำเภอ.....จังหวัด.....

Barcode

2. สงสัยว่าติดเชื้อ ☐ Dengue ☐ Other

3. WBC count.....cells/ml (ถ้ามี)

4. ผลการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test)
ชื่อสินค้าชุดตรวจอย่างรวดเร็ว.....รุ่น.....
☐ Dengue Antigen (NS1) ☐ Negative ☐ Positive ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้
☐ Dengue Antibody (IgM/IgG) ☐ Negative ☐ Positive IgG ☐ Positive IgM ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้
☐ ชุดตรวจอื่นๆ.....

5. วันที่เก็บซีรัม/พลาสมา.....ผู้เก็บตัวอย่างเลือด.....

แบบบันทึกการส่งตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของไวรัสเดงกี

ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการฯ กองโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

1. อายุของผู้ป่วย.....ปี.....เดือน ที่อยู่ของผู้ป่วยอำเภอ.....จังหวัด.....

Barcode

2. สงสัยว่าติดเชื้อ ☐ Dengue ☐ Other

3. WBC count.....cells/ml (ถ้ามี)

4. ผลการตรวจด้วยชุดตรวจอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnostic test)
ชื่อสินค้าชุดตรวจอย่างรวดเร็ว.....รุ่น.....
☐ Dengue Antigen (NS1) ☐ Negative ☐ Positive ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้
☐ Dengue Antibody (IgM/IgG) ☐ Negative ☐ Positive IgG ☐ Positive IgM ☐ ไม่สามารถอ่านผลได้
☐ ชุดตรวจอื่นๆ.....

5. วันที่เก็บซีรัม/พลาสมา.....ผู้เก็บตัวอย่างเลือด.....

ภาคผนวก 2

วิธีการตรวจหาชนิดของไวรัสไข้เลือดออกโดยวิธีอณูชีวโมเลกุล

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 Micropipette ขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร, 2-20 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร
- 1.2 Microcentrifuge
- 1.3 Vortex
- 1.4 PCR cabinet
- 1.5 BSCII (Biological Safety Cabinet)
- 1.6 LightCycler® 480 Real-Time PCR
- 1.7 MagNA Pure LC 2.0 Instrument
- 1.8 Cool rack
- 1.9 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml, 0.2 ml Strip tube

2. สารเคมี

- 2.1 MagNA Pure LC total nucleic acid isolation kit
- 2.2 PBS
- 2.3 Nuclease-free Water
- 2.4 QuantiTect Probe RT-PCR Kit
- 2.5 Primers และ Probes

Virus serotype detected	Nucleotide sequence	Fluorophore
DEN-1 F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	
DEN-1 C	CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC	
DEN-1 probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	FAM/BHQ-1
DEN-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	
DEN-2 C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	
DEN-2 probe	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	HEX/BHQ-1
DEN-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	

Virus serotype detected	Nucleotide sequence	Fluorophore
DEN-3 C	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	
DEN-3 probe	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	FAM/BHQ-1
DEN-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG	
DEN-4 C	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	
DEN-4 probe	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG	HEX/BHQ-1

3. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ (RNA Extraction)

3.1 ลงข้อมูลตัวอย่างตรวจ

	1	2	3	4
A	PosX	S8.....	S16.....	S24.....
B	S1.....	S9.....	S17.....	S25.....
C	S2.....	S10.....	S18.....	S26.....
D	S3.....	S11.....	S19.....	S27.....
E	S4.....	S12.....	S20.....	S28.....
F	S5.....	S13.....	S21.....	S29.....
G	S6.....	S14.....	S22.....	S30.....
H	S7.....	S15.....	S23.....	NegX

3.2 เปิดเครื่อง MagNA Pure LC

Username: LabOperator

Password: MPLC20

3.3 กรอกจำนวนตัวอย่างที่จะสกัด และใส่ Consumables ตามหน้าจอแสดง

3.4 นำ sample cartridge มาเติม Lysis buffer 300 µl ตามจำนวนตัวอย่างที่จะสกัด

3.5 เติมตัวอย่างตรวจ 200 µl ลงในช่อง S1-S30 รวม

3.6 เตรียมน้ำยาสำหรับลงเครื่อง MagNA Pure LC

เติมข้อมูล Lot: Expiry date:

Reagents	Type	8 ตัวอย่าง	32 ตัวอย่าง
Wash Buffer I	R1_L	10.8 ml	31.2 ml
Wash Buffer III	R2_L	11.0 ml	32.6 ml
	R3_M20		
Proteinase K	R4_M20	1.8 ml	4.2 ml
Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension	R5_M20	2.2 ml	5.8 ml
Elution buffer	R6_M20	2.0 ml	4.9 ml
Wash Buffer II	R7_M20	5.1 ml	15.9 ml

3.7 เติมเวลาเริ่มสกัด.....ประมาณเวลา.....

3.8 เติมผลการสกัด.....

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

4.1 ละลาย Working Probes, Primers, Master mix reagent และ NFW ที่ตู้ PCR cabinet

4.2 เตรียม PCR Reaction ดังนี้

Reagents (D1D2)	1X (μl)	X	Reagents (D3D4)	1X (μl)	X
2X Mastermix	10		2X Mastermix	10	
10 mM D1F	1		10 mM D3F	1	
10 mM D1C	1		10 mM D3C	1	
10 mM D2F	1		10 mM D4F	1	
10 mM D2C	1		10 mM D4C	1	
10 mM D1P	0.2		10 mM D3P	0.2	
10 mM D2P	0.2		10 mM D4P	0.2	
Enzyme	0.2		Enzyme	0.2	
Template	5.4		Template	5.4	
Total	20		Total	20	

4.3 Positive PCR จาก RNA ของไวรัสไข้เลือดออก DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4

4.4 Negative PCR จาก Nuclease-free Water

4.5 Cycling conditions

1 cycle: 50°C for 30 min (RT reaction)
95°C for 15 min (enzyme activation)
45 cycles: 95°C 15 sec
60°C 1 min

4.6 การแปลผล

4.6.1 Positive control ทุกขั้นตอนต้องอ่านค่าได้ ดังนี้

PosX อ่านค่า Ct value < 30

NegX อ่านค่า Ct values >36

Positive PCR DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4 อ่านค่า Ct value < 30

4.6.2 แปลผลตัวอย่างตรวจ

Positive: Ct value <36

Negative: Ct values >36

ภาคผนวก 3

รายชื่อโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการเก็บตัวอย่างการเฝ้าระวังซีโรทัยป์ใช้เลือดออกในประเทศไทย ปี 2560-2562

โรงพยาบาล	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนรวม	หมายเหตุ
ปี 2560	38	22	3	51	211	327	
สคร.4	15	13		6	46	81	
จังหวัดปทุมธานี	15	13		6	46	81	
ปทุมธานี	15	13		6	46	81	Co-infection*
สคร.5	8	4		5	19	36	
จังหวัดราชบุรี	8	4		5	19	36	
จอมบึง	2	1				3	
ดำเนินสะดวก	1			2		3	
บางแพ	1	2		1	7	11	
ปากท่อ	2			1	4	7	
โพธาราม	1				4	5	
บ้านโป่ง				1	3	4	
สวนผึ้ง	1	1			1	3	
สคร.6	4	2		7	29	42	
จังหวัดระยอง	4	2		7	29	42	
ระยอง	4	2		7	29	42	
สคร.8		1		3	10	14	
จังหวัดเลย		1		3	10	14	

โรงพยาบาล	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนรวม	หมายเหตุ
ผาขาว		1		3	10	14	
สคร.9	7	2	1	24	63	97	
จังหวัดสุรินทร์	7	2	1	24	63	97	
ปราสาท	5			19	18	42	
รัตนบุรี			1		9	10	
สุรินทร์	2	2		5	36	45	
สคร.10			2	5	27	35	
จังหวัดอุบลราชธานี			2	5	27	35	
ม่วงสามสิบ			2	5	24	32	
วารินชำราบ					3	3	
สคร.12	4			1	17	22	
จังหวัดสงขลา	4			1	17	22	
สะเดา	4			1	17	22	
ปี 2561	185	58	17	60	652	972	
สคร.1	39				15	54	
จังหวัดเชียงใหม่	39				15	54	
ไชยปราการ	39				15	54	
สคร.4	16	16	10	6	186	234	
จังหวัดนนทบุรี	1	3	1	2	18	25	
บางกรวย	1	3	1	2	18	25	
จังหวัดปทุมธานี	9	10		3	85	107	

โรงพยาบาล	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนรวม	หมายเหตุ
ปทุมธานี	9	10		3	85	107	
จังหวัดลพบุรี	6	1		1	7	15	
พระนารายณ์มหาราช	6	1		1	7	15	
จังหวัดอ่างทอง		2	9		76	87	
โพธิ์ทอง		2	9		76	87	
สคร.5	26	11	2	6	52	97	
จังหวัดราชบุรี	7	3		2	13	25	
โพธาราม	6	3		2	11	22	
บ้านโป่ง	1					1	
สวนผึ้ง					2	2	
จังหวัดสุพรรณบุรี	19	8	2	4	39	72	
เจ้าพระยายมราช	19	8	2	4	39	72	
สคร.6	85	31	5	34	257	412	
จังหวัดชลบุรี	9	4		3	35	51	
ชลบุรี	9	4		3	35	51	
จังหวัดระยอง	59	17	3	17	166	262	
ระยอง	59	17	3	17	166	262	
จังหวัดสมุทรปราการ	17	10	2	14	56	99	
สมุทรปราการ	17	10	2	14	56	99	
สคร.8				1	40	41	
จังหวัดเลย				1	3	4	

โรงพยาบาล	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนรวม	หมายเหตุ
วังสะพุง				1	3	4	
จังหวัดหนองคาย					37	37	
สังคม					37	37	
สคร.9	5			12	40	57	
จังหวัดสุรินทร์	5			12	40	57	
ปราสาท				3	12	15	
รัตนบุรี				2	20	22	
สุรินทร์	5			7	8	20	
สคร.12	14			1	62	77	
จังหวัดนราธิวาส	7			1	30	38	
นราธิวาสราชนครินทร์	7			1	30	38	
จังหวัดสตูล	7				32	39	
สตูล	7				32	39	
ปี 2562	203	63	13	17	503	799	
สคร.1	15	1			6	22	
จังหวัดเชียงใหม่	15	1			6	22	
ไชยปราการ	15	1			6	22	
สคร.3	2				3	5	
จังหวัดอุทัยธานี	2				3	5	
ห้วยคต	2				3	5	
สคร.4	43	5		5	48	101	

โรงพยาบาล	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนรวม	หมายเหตุ
จังหวัดนนทบุรี	3			1	7	11	
บางกรวย	2			1	4	7	
พระนั่งเกล้า	1				3	4	
จังหวัดปทุมธานี	8	3		3	16	30	
ปทุมธานี	8	3		3	16	30	
จังหวัดลพบุรี	32	2		1	25	60	
พระนารายณ์มหาราช	32	2		1	25	60	
สคร.5	9	13	6	4	38	70	
จังหวัดราชบุรี	2	6	4	4	17	33	
โพธาราม	1	4	2	4	14	25	
บ้านโป่ง	1	2	2		3	8	
จังหวัดสุพรรณบุรี	7	7	2		21	37	
เจ้าพระยายมราช	7	7	2		21	37	
สคร.6	75	30	5	2	176	288	
จังหวัดชลบุรี	19	2			73	94	
พระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา	13	1			31	45	
ชลบุรี	6	1			42	49	
จังหวัดระยอง	23	22	3	1	91	140	
ระยอง	23	22	3	1	91	140	
จังหวัดสมุทรปราการ	33	6	2	1	12	54	
สมุทรปราการ	33	6	2	1	12	54	

โรงพยาบาล	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนรวม	หมายเหตุ
สคร.7	10				45	55	
จังหวัดขอนแก่น	10				45	55	
สมเด็จพระยุพราชกระนวน	2				29	31	
สิรินธร	8				16	24	
สคร.9	28	4		6	55	93	
จังหวัดสุรินทร์	28	4		6	55	93	
ท่าตูม	1	1			5	7	
สังขะ	2			1		3	
ปราสาท	19	2		3	39	63	
รัตนบุรี	1					1	
สุรินทร์	5	1		2	11	19	
สคร.10		2	2		37	41	
จังหวัดศรีสะเกษ		2	2		37	41	
ศรีสะเกษ		2	2		22	26	
สสจ. จังหวัดศรีสะเกษ					15	15	
สคร.12	10	1			54	65	
จังหวัดนราธิวาส	10	1			53	64	
นราธิวาสราชนครินทร์	10	1			53	64	
จังหวัดสตูล					1	1	
สตูล					1	1	
สปคม.	11	7			41	59	

กรุงเทพมหานคร	11	7			41	59
แพทย์ปัญญา	4	1			5	10
มุกฎวัฒนะ	7	6			36	49
จำนวนรวม	426	143	33	128	1366	2098

ภาคผนวก 4

ผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR จากการเฝ้าระวังซีโรทัยป์ใช้เลือดออกในพื้นที่แต่ละจังหวัดในประเทศไทย ปี 2560

ปี 2560	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนทั้งหมด	หมายเหตุ
เลย		1		3	10	14	
ปทุมธานี	15	13		6	46	81	*Co-infection 1
ระยอง	4	2		7	29	42	
ราชบุรี	8	4		5	19	36	
สงขลา	4			1	17	22	
สุรินทร์	7	2	1	24	63	97	
อุบลราชธานี		2	5	27	35		
จำนวนทั้งหมด	38	22	3	51	211	327	1

*Co-infection: DENV-1 และ DENV-4

ผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR จากการเฝ้าระวังซีโรทัยป์ใช้เลือดออกในพื้นที่แต่ละจังหวัดในประเทศไทย ปี 2561

ปี 2561	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนทั้งหมด	หมายเหตุ
เชียงใหม่	39				15	54	
เลย				1	3	4	
ชลบุรี	9	4		3	35	51	
นนทบุรี	1	3	1	2	18	25	
นราธิวาส	7			1	30	38	
ปทุมธานี	9	10		3	85	107	
ระยอง	59	17	3	17	166	262	
ราชบุรี	7	3		2	13	25	
ลพบุรี	6	1		1	7	15	
สตูล	7				32	39	
สมุทรปราการ	17	10	2	14	56	99	
สุพรรณบุรี	19	8	2	4	39	72	
สุรินทร์	5			12	40	57	

ปี 2561	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนทั้งหมด	หมายเหตุ
หนองคาย					37	37	
อ่างทอง		2	9		76	87	
จำนวนทั้งหมด	185	58	17	60	652	972	

ผลการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Real-time RT PCR จากการเฝ้าระวังซิกาไวรัสที่ใช้เลือดออกในพื้นที่แต่ละจังหวัดในประเทศไทย ปี 2562

ปี 2562	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนทั้งหมด	หมายเหตุ
เชียงใหม่	15	1			6	22	
กรุงเทพมหานคร	11	7			41	59	
ขอนแก่น	10				45	55	
ชลบุรี	19	2			73	94	
นนทบุรี	3			1	7	11	
นราธิวาส	10	1			53	64	
ปทุมธานี	8	3		3	16	30	
ระยอง	23	22	3	1	91	140	
ราชบุรี	2	6	4	4	17	33	
ลพบุรี	32	2		1	25	60	
ศรีสะเกษ		2	2		37	41	
สตูล					1	1	
สมุทรปราการ	33	6	2	1	12	54	

ปี 2561	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Negative	จำนวนทั้งหมด	หมายเหตุ
สุพรรณบุรี	7	7	2		21	37	
สุรินทร์	28	4		6	55	93	
อุทัยธานี	2				3	5	
จำนวนทั้งหมด	203	63	13	17	503	799	