

การเฝ้าระวังสายพันธุ์เชื้อไวรัสไข้เลือดออกในประเทศไทย

Dengue genotyping surveillance in Thailand

นางสาวพัชรินทร์ บุญอินทร์

กองโรคติดต่อภายในโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

ไข้เลือดออกเป็นปัญหาสำคัญของสาธารณสุขไทย ซึ่งประเทศไทยสามารถพบไข้เลือดออกได้ทั้ง 4 ซีโรทัยป์ (Dengue Serotype) โดยในปัจจุบันนี้เทคโนโลยีทางการหาลำดับเบสในเชื้อก่อโรค ซึ่งใช้เป็นวิธีการตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี เพื่อแยกสายพันธุ์ของไวรัส (Dengue genotyping) จากสารพันธุกรรมงานเฝ้าระวังไวรัสโรคติดต่อภายในโดยแมลง ปี 2564-2566 พบ Dengue serotype 1 แยกได้ genotype I ร้อยละ 100 Dengue serotype 2 แยกได้ Asian genotype I ร้อยละ 44 และ Cosmopolitan genotype ร้อยละ 56 Dengue serotype 3 แยกได้ genotype III ร้อยละ 100 และ Dengue serotype 4 แยกได้ genotype I ร้อยละ 92.3 และ genotype II ร้อยละ 7.7 จากข้อมูลของ Dengue genotyping ทำให้ข้อมูลการเฝ้าระวังทางด้านระบาดวิทยาและความหลากหลายของเชื้อไวรัสในประเทศไทยมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น และเป็นข้อมูลในการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสกับความรุนแรงของโรค อัตราการแพร่กระจายในแต่ละสายพันธุ์ การวางแผนการใช้วัคซีน เพื่อประโยชน์ต่อการป้องกันควบคุมโรคไข้เลือดออกต่อไป

ความสำคัญ

ไวรัสเดงกี (Dengue viruses) จัดอยู่ใน family Flaviviridae ใน genus *Orthoflavivirus* 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)

Dengue viruses มีโครงสร้างของเชื้อและสารพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันหลายชนิด เช่น Yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus และ Tick-borne encephalitis virus เป็นต้น ผู้ป่วยไข้เลือดออกส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการหรือมีอาการไข้เล็กน้อย แต่บางรายอาจมีอาการไข้เลือดออกรุนแรง ซึ่งอาจมีอาการช็อก มีเลือดออกรุนแรง หรืออวัยวะเสียหาย 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 หรือลิงยามในแอฟริกาตะวันตกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

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 ซึ่งเป็นตัวแทนของสายพันธุ์ซิลวาติกจากมาเลเซีย

การศึกษาทางระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสเดงกีเริ่มประมาณปี 1990 เป็นต้นมา เพื่อระบุความหลากหลายทางพันธุกรรม วิวัฒนาการ และเฝ้าระวังการเกิดสายพันธุ์ใหม่ในพื้นที่ระบาดของโรค ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนและความสัมพันธ์ของลำดับเบสที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค มีความสำคัญต่อการประเมินความเสี่ยงของการระบาดของโรค ใช้เลือดออก (3)

วัตถุประสงค์

เพื่อทราบข้อมูลสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีที่กระจายทั่วพื้นที่ในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

การหาลำดับเบส

ตัวอย่างสารพันธุกรรมงานเฝ้าระวังไวรัสโรคติดต่อนำโดยยูงลายที่มีผล RT-qPCR พบสารพันธุกรรม Dengue serotype 1 2 3 หรือ 4 และมีค่า Ct น้อยกว่า 25 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์จำเพาะในส่วนของยีนเปลือกหุ้ม (Envelope gene) ตามขั้นตอนของทีมวิจัย Sy, A.K ปี 2023 (3) ตรวจสอบคุณภาพและประมาณของ PCR product ด้วย 1% gel electrophoresis และหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger sequencing

การวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัสเดงกีโดยการสร้าง Phylogenetic Analysis

นำข้อมูลลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างมาเชื่อมต่อกันโดยใช้ Reference Dengue Envelope gene เพื่อเทียบการต่อเชื่อม โดยใช้ Bioinformatic tool ชื่อ DNA Baser และการ Alignment เทียบกับฐานข้อมูลของ Dengue Envelope gene เพื่อสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ Bioinformatic tool ชื่อ MEGA software

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

Dengue genotyping จากตัวอย่างสารพันธุกรรมงานเฝ้าระวังไวรัสโรคติดต่อนำโดยยูงลาย ปี 2564-2566 ทั้งสิ้น 53 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก พิษณุโลก

พระนครศรีอยุธยา ระยอง ร้อยเอ็ด สุรินทร์ กาฬสินธุ์ นราธิวาส ยะลา และกรุงเทพมหานคร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีในแต่ละจังหวัด

จังหวัด	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	รวม
พระนครศรีอยุธยา	3	1			4
กรุงเทพมหานคร	2	1	1	1	5
เชียงใหม่	1		3		4
กาฬสินธุ์	4	4			8
ลำปาง	1				1
แม่ฮ่องสอน	2		1		3
นราธิวาส	6		1	3	10
พิษณุโลก	2	1		2	5
ระยอง	2			4	6
ร้อยเอ็ด		1		2	3
สุรินทร์	1				1
ตาก		1			1
ยะลา	1			1	2
รวม	25	9	6	13	53

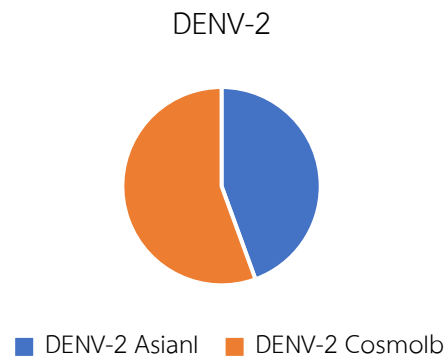
ผลจากการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของทั้ง 4 ซีโรทัยป์ พบ Dengue serotype 1 (รูปที่ A) แยกได้ genotype I ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) (แม่ฮ่องสอน ลำปาง พระนครศรีอยุธยา กาฬสินธุ์ และนราธิวาส) โดย 24 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากประเทศไทย จีน เวียดนาม และสิงคโปร์ ปี 2556-2557 และ 1 ตัวอย่างจากจังหวัดนราธิวาส มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากฮาวาย ปี 2487 Dengue serotype 2 (รูปที่ B) ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง แยกได้ Asian genotype I จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 44) (พิษณุโลก ร้อยเอ็ด ตาก กรุงเทพมหานคร) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากประเทศมาเลเซีย และสิงคโปร์ ปี 2556-2557 และ Cosmopolitan genotype จำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 56) (พระนครศรีอยุธยาและกาฬสินธุ์) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากประเทศไต้หวัน และเมียนมา ปี 2556-2557 Dengue serotype 3 (รูปที่ C) แยกได้ genotype III ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) (เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน นราธิวาส และกรุงเทพมหานคร) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากประเทศสิงคโปร์ ปี 2556-2557 และ Dengue serotype 4 (รูปที่ D)

ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง แยกได้ genotype I จำนวน 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 89) (พิษณุโลก ระยอง ร้อยเอ็ด นราธิวาส ยะลา และ กรุงเทพมหานคร) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากประเทศเม็กซิโก และสิงคโปร์ ปี 2556-2557 และ genotype II จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11) (ระยอง) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์จากประเทศอินโดนีเซีย ปี 2556-2557

รูปที่ A



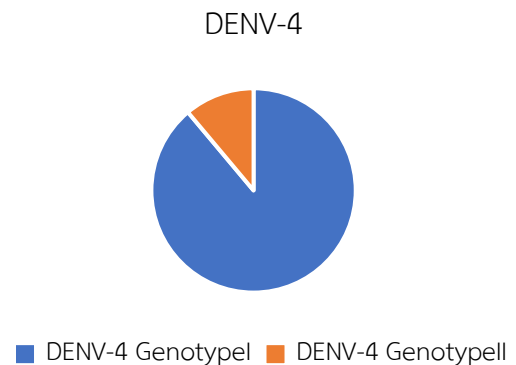
รูปที่ B



รูปที่ C



รูปที่ D



รูปที่ 5 แผนรูปแสดงสัดส่วนสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีที่พบในประเทศไทย

บทสรุป

การดำเนินการเฝ้าระวังสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีในประเทศไทย ทำให้เห็นถึงความแตกต่างของเชื้อไวรัสเดงกีในแต่ละพื้นที่ ซึ่งควรดำเนินการเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ หรือการเกิดสายพันธุ์ใหม่ขึ้นในพื้นที่การระบาดของโรค ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรค ประสิทธิภาพของวัคซีน การควบคุม ป้องกันจากสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว และนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นมาตรการควบคุม ป้องกันโรคไข้เลือดออกที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยต่อไป

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. Sy, A.K.; Koo, C.; Privaldos, K.J.R.; Quinones, M.A.T.; Igoy, M.A.U.; Villanueva, S.Y.A.M.; Hibberd, M.L.; Ng, L.C.; Hapuarachchi, H.C. Genetic Diversity and Dispersal of DENGUE Virus among Three Main Island Groups of the Philippines during 2015–2017. *Viruses* 2023, 15, 1079