

การพัฒนาวัคซีนเด็งกีชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์

จिरพันธุ์ จันทร์จร^{1*}

Received: March 1, 2017

Revised & Accepted: April 30, 2017

บทคัดย่อ

จำนวนผู้ป่วยเด็งกี (Dengue) ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปีเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสุขภาพและเศรษฐกิจทั่วโลก มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี (Dengue virus; DENV) วัคซีนเด็งกีมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและกำจัดโรคเด็งกี แอนติเจนเป้าหมายหลักของวัคซีนคือ โปรตีน prM และ E ที่อยู่บนผิวด้านนอกของอนุภาคไวรัสเด็งกี ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์จดจำ ความหลากหลายของสายพันธุ์ไวรัสเด็งกีเป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกแอนติเจนของวัคซีน เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ครอบคลุมทั้ง 4 ซีโรไทป์ ในปัจจุบันการพัฒนาวัคซีนเด็งกีมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก โดยจะเห็นว่าวัคซีนเด็งกีที่ทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์หลายชนิดที่เข้าสู่วิทยุทธศาสตร์การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งนำไปสู่ความสำเร็จในการพัฒนาวัคซีนเด็งกีชนิดแรกของโลก ได้แก่ วัคซีนเด็งกิวาเซีย (Dengvaxia) ที่ป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ครบทั้ง 4 ซีโรไทป์ ที่ค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 60 และมีประสิทธิภาพสูงในการลดความรุนแรงของโรคเด็งกีในพื้นที่ระบาด สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งที่พบการกระจายของไวรัสเด็งกีครบทั้ง 4 ซีโรไทป์ จึงเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการใช้วัคซีนเด็งกี CYD อย่างไรก็ตามวัคซีนนี้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีแต่ละซีโรไทป์แตกต่างกัน โดยให้ผลป้องกันน้อยที่สุดต่อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 การทราบประวัติการติดเชื้อไวรัสเด็งกีแต่ละซีโรไทป์เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพิจารณาถึงความปลอดภัยและความคุ้มค่าของการฉีดวัคซีนสำหรับแต่ละบุคคล

คำสำคัญ: ไวรัสเด็งกี, แอนติเจนไวรัสเด็งกี, วัคซีนตัวเป็นอ่อนฤทธิ์, วัคซีนเด็งกี

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Development of live-attenuated dengue vaccine

Jiraphan Junjhon^{1*}

Abstract

Increasing of dengue cases each year burdens the public health and economic problems worldwide. Dengue virus (DENV) is the causative agent of the disease. Vaccine against this virus is a goal to prevent and eliminate dengue disease. The surface proteins, prM and E on top of the dengue virion are the major targets for vaccine. Variation of DENV strains is the key factor to target the vaccine antigens. A number of live-attenuated DENV vaccine candidate have been entering into different clinical trials. The breakthrough was the successful of the world first dengue vaccine development named Dengvaxia. This vaccine showed the overall efficacy to all 4 DENV serotypes about 60%. Due to its moderate efficacy, the use of this vaccine is therefore to reduce the hospitalization from DENV infection. The vaccine use is recommended in the dengue endemic region including Thailand, where high circulation of 4 DENV serotypes is observed. Unfortunately, the limitation of this vaccine is imbalance protection against 4 DENV serotypes, with the lowest level of protection to DENV-2. History of DENV-primed in individuals is the useful information to convey the effective and safe use of this dengue vaccine.

Key words: Dengue virus, Dengue virus antigen, Live-attenuated vaccine, Dengue vaccine

¹Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University

*Corresponding author: (e-mail: jiraphan.juh@mahidol.ac.th)

บทนำ

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ประเมินจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีต่อปีเป็น 50-100 ล้านคน จากการระบาดในมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลก จำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี โดยรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีเริ่มตั้งแต่ในช่วงปี ค.ศ.1955-1959 พบผู้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี 908 คน จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2010 จำนวนผู้ติดเชื้อเพิ่มสูงถึง 2.2 ล้านคน และล่าสุดในปี ค.ศ.2015 จำนวนผู้ติดเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 3.2 ล้านคน โดยในทวีปเอเชียพบมากที่สุด รองลงมาคือลาตินอเมริกาและแอฟริกา⁽¹⁾

ไวรัสเด็งกีเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส (RNA virus) ที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped) จัดอยู่ในวงศ์ Flaviviridae ตระกูล flavivirus เช่นเดียวกับเชื้อไวรัสสมาชิกอื่นๆ ได้แก่ ไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile virus; WNV) ไวรัสไข้สมองอักเสบซึ่งมีหมัดเป็นพาหะ (Tick-borne encephalitis virus; TBEV) และไวรัสไข้เหลือง (Yellow fever virus; YFV)⁽²⁾ ในปัจจุบันพบ 4 ซีโรไทป์ ได้แก่ DENV-1, DENV-2, DENV-3, และ DENV-4 ตามความแตกต่างทางด้านชีววิทยา เมื่อไวรัสติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายคนอาจเกิดอาการแสดงหลายรูปแบบ ตั้งแต่การติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (asymptomatic infection) ไข้ไม่ทราบสาเหตุ (undifferentiated fever) หรือมีอาการไข้และจุดเลือดออก หรือไข้เด็งกี (dengue fever; DF) ในผู้ป่วยบางรายอาจมีการพัฒนาความรุนแรงของโรคเป็นสาเหตุให้เลือดออกตามอวัยวะต่างๆ หรือไข้เลือดออกเด็งกี (dengue hemorrhagic fever; DHF) มีอาการตับโต และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียสารน้ำจากหลอดเลือดนำไปสู่สถานะช็อกอย่างเฉียบพลัน หรือไข้เลือดออกเด็งกีที่มีภาวะช็อก (dengue shock syndrome; DSS) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดการเสียชีวิตจากโรคเด็งกี

การรักษาผู้ป่วยโรคเด็งกีคือการรักษาตามอาการแสดง จากจำนวนผู้ติดเชื้อและแสดงอาการที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี ทำให้การสาธารณสุขในแต่ละประเทศ

ต้องสูญเสียงบประมาณจำนวนมากในการดูแลรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะในผู้ป่วย DHF/DSS ซึ่งต้องอาศัยการรักษาตามอาการอย่างใกล้ชิดในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน ทำให้ปัญหาทางด้านสุขภาพดังกล่าวพลอยกระทบปัญหาทางด้านเศรษฐกิจไปด้วย ส่งผลอย่างยิ่งต่อกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทย ดังนั้นการมีวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อเด็งกีที่มีประสิทธิภาพพร้อมกับการควบคุมกำจัดแหล่งยุงพาหะเป็นมาตรการสำคัญในการป้องกันและลดอัตราการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้อย่างยั่งยืน

การพัฒนาวัคซีนเด็งกีได้ดำเนินมามากกว่า 50 ปี โดยนักวิจัยจากหลายสถาบันทั่วโลก เทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรมเป็นเครื่องมือสำคัญในการสร้างและแสดงออกวัคซีนเด็งกีแอนติเจนทั้ง 4 ซีโรไทป์ในหลากหลายรูปแบบ ได้แก่ ไวรัสตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ (live-attenuated virus; LAV) ไวรัสลูกผสม (chimeric virus) ไวรัสตัวตาย (inactivated virus) อนุภาคคล้ายไวรัส (viral-like particle; VLP) โปรตีนรีคอมบิแนนท์ (recombinant protein) และ ดีเอ็นเอไวรัส (viral DNA) แอนติเจนของวัคซีนทดสอบในรูปแบบต่างๆ เหล่านี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีและนำไปสู่การทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนทดสอบในสัตว์ทดลองและในคน โดยในบทความนี้จะขยายรายละเอียดในเนื้อหาของโปรตีน prM และ E ซึ่งเป็นแอนติเจนสำหรับวัคซีนเด็งกี คุณลักษณะและประสิทธิภาพวัคซีนเด็งกีที่ทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์หลายรูปแบบที่เข้าสู่การทดสอบในคน และความรู้เกี่ยวกับคุณลักษณะ ประสิทธิภาพ และข้อควรพิจารณาการใช้วัคซีนเด็งกีวาเซียซึ่งเป็นวัคซีนเด็งกีชนิดแรกของโลกที่ได้รับการรับรองให้ถูกต้องเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

อนุภาคไวรัสเด็งกีและแอนติเจนเป้าหมายสำหรับวัคซีน (DENV particles and target antigens for vaccine)

อนุภาคไวรัสเด็งกีประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิด ได้แก่ capsid (C), premembrane (prM)/membrane (M) และ envelope (E) แบ่งอนุภาค

ออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ อนุภาคแบบไม่สมบูรณ์ (immature virion) อนุภาคแบบสมบูรณ์ (mature virion) และอนุภาคกึ่งสมบูรณ์ (partially mature virion)⁽³⁾ อนุภาคแบบไม่สมบูรณ์เป็นอนุภาคไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่ภายในเซลล์ ไม่มีความสามารถในการติดเชื้อ พบลักษณะโปรตีนโครงสร้าง prM และ E จับกันเป็นคู่ (prM-E heterodimer) จำนวน 3 คู่ รวมตัวเป็นโครงสร้างที่ยื่นออกนอกผนังเยื่อหุ้มอนุภาค หรือสไปค์ (spike) ในการทำหน้าที่เป็นแอนติเจน⁽⁴⁾ อนุภาคแบบสมบูรณ์จะเป็นอนุภาคที่ผ่านกระบวนการตัดโปรตีน prM บนผิวอนุภาคแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ furin โดยตัดส่วน pr ออกจากโปรตีน prM เหลือส่วน M แทรกอยู่กับผนังเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัส และเหนี่ยวนำให้มีการเรียงตัวของคู่เหมือนของโปรตีน E (E-E homodimer) จำนวน 3 คู่ ทั้งหมด 180 โมเลกุลเป็นแพบนผิวอนุภาคไวรัส⁽⁵⁾ ส่วนอนุภาคกึ่งสมบูรณ์ มีลักษณะโครงสร้างโปรตีน prM และ E ร่วมกันของทั้งแบบที่เป็นอนุภาคไวรัสแบบสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์⁽⁶⁾

โปรตีน E และ prM เป็นแอนติเจนเป้าหมายสำหรับการพัฒนาวัคซีนเด็งกี โปรตีน E ที่เรียงตัวอยู่บนผิวอนุภาคไวรัส (surface E; sE) ประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ส่วน (domain; D) DI ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน DI จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นเปปไทด์ทำหน้าที่ห่อหุ้มรวมผนังหุ้มไวรัสเข้ากับผนังเอนโดโซม เรียกว่า fusion peptide และ DIII มีการเรียงตัวของโครงสร้างคล้ายอิมมูโนโกลบูลิน⁽⁷⁾ เป็นส่วนที่ใช้จับกับโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์⁽²⁾ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญต่อการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ใหม่ ดังนั้นส่วนของโปรตีน E ใน DIII จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญของวัคซีน

โปรตีน prM ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ pr และ M โดยส่วน pr พบบนผิวอนุภาคแบบไม่สมบูรณ์และอนุภาคกึ่งสมบูรณ์ในรูปแบบสไปค์ของคู่โปรตีน prM และ E ที่จับกัน แต่จะไม่พบส่วน pr บนผิวอนุภาคแบบสมบูรณ์ ในขณะที่ส่วน M จะแทรกอยู่ในผนังหุ้มไวรัส พบได้ในอนุภาคทุกรูปแบบ ดังนั้นส่วน pr ของโปรตีน prM ที่อยู่บนผิวอนุภาคแบบไม่สมบูรณ์และอนุภาคกึ่งสมบูรณ์สามารถใช้เป็น

แอนติเจนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ร่วมกับโปรตีน E และเป็นที่น่าสนใจว่าอนุภาคกึ่งสมบูรณ์และอนุภาคแบบไม่สมบูรณ์ตรวจพบได้นอกเซลล์ยุงที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 ร้อยละ 41 และร้อยละ 3 ตามลำดับของสัดส่วนอนุภาคไวรัสเด็งกีทั้ง 3 รูปแบบ⁽³⁾ ดังนั้นโปรตีน pr จึงเป็นสัดส่วนครึ่งหนึ่งของแอนติเจนไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 ที่มองเห็นด้วยระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามสัดส่วนรูปแบบอนุภาคไวรัสเด็งกีซีโรไทป์อื่นยังไม่มีข้อมูลการศึกษา

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน E ที่ร่างกายสร้างขึ้นส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติยับยั้งฤทธิ์ไวรัสในการติดเชื้อในเซลล์ใหม่⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน prM ทั้งที่เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติบอดีที่แยกได้จากซีรัมผู้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี พบว่าแอนติบอดีต่อ prM มีคุณสมบัติส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซ้ำ⁽⁹⁾ และช่วยส่งเสริมให้อนุภาคแบบไม่สมบูรณ์และกึ่งสมบูรณ์สามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านทางตัวรับชนิด Fcγ (Fcγ receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocyte) ได้⁽¹⁰⁾ จากข้อมูลดังกล่าว การพัฒนาวัคซีนในรูปแบบอนุภาคไวรัสเด็งกีที่ปราศจากโปรตีน prM น่าจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดการเสริมฤทธิ์ในการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซ้ำด้วยแอนติบอดีต่อวัคซีน

การมีไวรัสเด็งกี 4 ซีโรไทป์ ทำให้ในช่วงชีวิตของแต่ละคนสามารถติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้มากกว่าหนึ่งซีโรไทป์ เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกีครั้งแรก (primary infection) ไวรัสจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์นั้น (serotype-specific antibody) โดยเป็นแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งฤทธิ์การติดเชื้อของไวรัสเด็งกี (neutralizing antibody) ส่งผลให้สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์เดิมเมื่อเข้าสู่ร่างกายเป็นครั้งที่สอง แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเด็งกีซีโรไทป์อื่น และในทางตรงข้ามพบว่าแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นต่อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์หนึ่งอาจมีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์อื่น (enhancing antibody) ทำให้พัฒนาความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการ

ติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเด็งกี่มากขึ้น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า antibody-dependent enhancement (ADE) และบ่อยครั้งพบว่าสัมพันธ์กับการเสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ซ้ำ⁽¹¹⁾

ไวรัสเด็งกี่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสามารถกลายพันธุ์นำไปสู่ความผันแปรทางยีน (genetic variation) ซึ่งอาจส่งผลทำให้มีเอพิโทป (epitope) มีความแตกต่างทางแอนติเจน (antigenic variation) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน ไวรัสเด็งกี่แต่ละซีโรไทป์มีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนประมาณร้อยละ 30⁽¹²⁾ โดยส่วนใหญ่เป็นผลมาจากความแตกต่างในยีน E ที่มีความหลากหลายสูงกว่ายีนชนิดอื่นๆ แบ่งกลุ่มความหลากหลายของไวรัสเด็งกี่ตามโปรตีน E ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ตามความสามารถในการทำปฏิกิริยากับซีรัมที่แตกต่างกันเป็น 4 ซีโรไทป์ ความซับซ้อนประการหนึ่งที่เป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่คือ ความหลากหลายของไวรัสแอนติเจนซึ่งเป็นเป้าหมายของวัคซีนไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันทางด้านพันธุกรรมอาจมีระดับความเหมือนหรือต่างกันของคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนได้ (antigenicity) รายงานจากการศึกษาความหลากหลายแอนติเจนของสายพันธุ์ไวรัสเด็งกี่จำนวน 46 สายพันธุ์ซึ่งเป็นตัวแทนคัดเลือกมาจากหลากหลายช่วงเวลาและภูมิภาคทั่วโลก ด้วยการทำปฏิกิริยากับชุดซีรัมลิงและคนที่ได้รับวัคซีนเด็งกี่ทดสอบและซีรัมคนที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ครั้งแรก แล้วใช้ความสามารถการกลบแสงฤทธิ์ไวรัสที่ร้อยละ 50 ของแต่ละซีรัมทดสอบไปแสดงในรูปความสัมพันธ์ของระดับความเหมือนหรือต่างของแอนติเจนจากไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ทั้งหมดที่ทดสอบในรูปแบบระยะทางด้วยวิธี antigenic cartography พบว่าไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์หนึ่งแสดงคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนในการทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรัมที่ได้รับไวรัสเด็งกี่ซีโรไทป์เดียวกันในระดับที่ใกล้เคียงกับไวรัสเด็งกี่ซีโรไทป์อื่นที่ใช้ทดสอบ แสดงถึงคุณลักษณะการเป็นเป้าหมายแอนติเจนที่ใกล้เคียงกันของไวรัสเด็งกี่ต่างซีโรไทป์และสะท้อนการจัดกลุ่มไวรัสเด็งกี่ตามคุณสมบัติการเป็น

แอนติเจนด้วย 4 ซีโรไทป์ในอดีตที่ไม่มีความละเอียดมากพอในการแยกแยะความแตกต่างสายพันธุ์ของไวรัสเด็งกี่⁽¹³⁾ ดังนั้นระดับความหลากหลายของไวรัสแอนติเจนที่มีความละเอียดมากกว่าในระดับซีโรไทป์เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อการกำหนดไวรัสสายพันธุ์สำหรับนำมาพัฒนาวัคซีนเพื่อให้สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้ครอบคลุมทั่วโลก

จากความรู้ทางด้านคุณลักษณะอนุภาคไวรัสเด็งกี่แอนติเจนชนิด pr และ E ที่พบบนผิวอนุภาคไวรัสในรูปแบบที่แตกต่างกันที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อช่วยป้องกันหรือส่งเสริมการติดเชื้อซ้ำ เป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่ในรูปแบบใหม่ในอนาคต การสร้างอนุภาคไวรัสเด็งกี่ให้ได้เป็นอนุภาคแบบสมบูรณ์ทั้งหมดเป็นความหวังในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน E ที่มีคุณสมบัติกลบแสงฤทธิ์ได้ดีและป้องกันการสร้างแอนติบอดีแบบเสริมฤทธิ์การติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ นอกจากนั้นการคัดเลือกไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์สำหรับนำไปสร้างเป็นวัคซีนอาจต้องพิจารณาเลือกจากตัวแทนไวรัสสายพันธุ์ชนิดที่ให้ระดับการทำปฏิกิริยากับซีรัมจากการศึกษาด้วยวิธี antigenic cartography ที่มาจากต่างกลุ่มกันอย่างชัดเจนจาก 46 ไวรัสสายพันธุ์แทนการคัดเลือกสายพันธุ์ไวรัสตามการแบ่งกลุ่มไวรัสเด็งกี่ 4 ซีโรไทป์

รูปแบบวัคซีนเด็งกี่ทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ที่ทดสอบในคน (Live-attenuated dengue vaccine type tested in clinical trials)

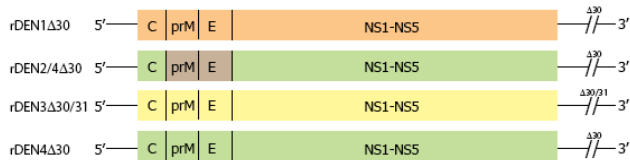
ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาการพัฒนาวัคซีนเด็งกี่มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก ตั้งแต่ริเริ่มพัฒนาวัคซีนจนถึงปัจจุบันมีวัคซีนเด็งกี่ทดสอบหลายชนิดที่อยู่ในระหว่างการศึกษาประสิทธิภาพในคน และนำไปสู่วัคซีนเด็งกี่ชนิดแรกที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในคนวัคซีนทดสอบชนิดแรกเป็นชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ มีคุณสมบัติเป็นอนุภาคไวรัสเด็งกี่ที่สามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์ได้ในระดับต่ำๆ ซึ่งได้ริเริ่มพัฒนาในประเทศไทยเป็นแห่งแรก ตั้งแต่ปี

ค.ศ.1980 โดยทีมนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำเชื้อไวรัสเด็งกีที่แยกได้จากผู้ป่วย DF หรือ DHF ในไทย มาเพาะเลี้ยงในเซลล์ชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เป้าหมายทางธรรมชาติ (unnatural host cells) ได้แก่ เซลล์ primary dog kidney (PDK) และเซลล์ african green monkey kidney (PGMK) และใช้ไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ 16007, ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ 16681, ซีโรไทป์ 3 สายพันธุ์ 16562 และ ซีโรไทป์ 4 สายพันธุ์ 1036 การเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ดังกล่าวจะทำให้เกิดสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัส ทำให้ได้ไวรัสสายพันธุ์ที่อ่อนฤทธิ์ ซึ่งสามารถตรวจวัดคุณสมบัติอ่อนฤทธิ์ของไวรัสในเบื้องต้นได้ เช่น การทำให้ลักษณะและขนาดกลุ่มเซลล์ตายมีขนาดเล็ก (small plaque) การสูญเสียความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ติดเชื้อ (cytopathic effect) และการมีความไวต่ออุณหภูมิ (temperature sensitivity) เป็นต้น เมื่อนำไวรัสเด็งกีแต่ละซีโรไทป์ที่มีคุณสมบัติอ่อนฤทธิ์ดังกล่าวไปทดสอบในคน เฟส 1a พบว่าไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2, 3 และ 4 สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ร้อยละ 75-100 ในขณะที่พบปฏิกิริยาแพ้จากวัคซีนทดสอบต่ำหรือไม่พบ อย่างไรก็ตามไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ร้อยละ 17 - 78 และกระตุ้นปฏิกิริยาแพ้สูงกว่าไวรัสซีโรไทป์อื่น (ตารางที่ 1) ทำให้ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นวัคซีนเดี่ยว (monovalent vaccine) เมื่อนำวัคซีนทดสอบผสมร่วมกันสองซีโรไทป์หรือสามซีโรไทป์ฉีดให้คนกลุ่มทดลอง พบว่าวัคซีนทดสอบแบบผสมนี้สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็งกีได้ทุกซีโรไทป์ แต่วัคซีนทดสอบชุดนี้ได้หยุดการพัฒนาถึงการทดลองในคนที่เฟส 2 เนื่องจากไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้เท่ากันทุกซีโรไทป์⁽¹⁴⁾

การพัฒนาวัคซีนทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์โดย Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) เป็นชนิด tetravalent vaccine ที่ประกอบด้วยวัคซีนทดสอบของไวรัสเด็งกีผสมทั้ง 4 ซีโรไทป์ โดยเป็นไวรัสเด็งกี

ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ 45AZ5 ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ S16803 ซีโรไทป์ 3 สายพันธุ์ CH53489 และซีโรไทป์ 4 สายพันธุ์ 341750⁽¹⁵⁾ สร้างจากการเพาะเลี้ยงไวรัสเด็งกีในเซลล์ PDK ตามด้วยเซลล์ fetal rhesus lung (FRhL) ผลการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนทดสอบเบื้องต้นในเด็กไทยวัยประถมและวัยแรกคลอด พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดี⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ ต่อมาจึงได้ขยายการศึกษาประสิทธิภาพวัคซีนทดสอบเฟส 2 ในคนที่มีช่วงอายุกว้างมากขึ้นคือ 1-50 ปี การศึกษาในประเทศอเมริกาพบว่าภายหลังการได้รับวัคซีนทดสอบ 2 เข็ม ห่างกัน 6 เดือน สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้อย่างน้อยร้อยละ 60 (ตารางที่ 1) ในคนที่ไม่เคยได้สัมผัสกับเชื้อมาก่อน นอกจากนี้การศึกษาในไทยตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อวัคซีนทดสอบเพิ่มขึ้นอย่างน้อยสี่เท่าเมื่อวัดที่ 1 เดือนภายหลังได้รับวัคซีนทดสอบเข็มที่ 2 ทั้งจากกลุ่มทดลองที่เคยได้รับเชื้อไวรัสและไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสมาก่อน⁽¹⁸⁾ แต่อย่างไรก็ตามวัคซีนทดสอบดังกล่าวยังต้องพัฒนาต่อไปในด้านความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ใกล้เคียงกันครอบคลุมไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์

ต่อมา National Institutes of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ริเริ่มสร้างวัคซีนเด็งกีทดสอบ โดยอาศัยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม ได้สร้างโคลนพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอคู่สมของสารพันธุกรรม (cDNA) ไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ Western Pacific⁽¹⁹⁾, ซีโรไทป์ 3 สายพันธุ์ Sleman/78⁽²⁰⁾ และ ซีโรไทป์ 4 สายพันธุ์ 814669⁽²¹⁾ ให้มีการกลายพันธุ์ โดยตัดชิ้นส่วน 30 นิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' untranslated region (UTR) ในจีโนมไวรัสเด็งกี แล้วใช้เป็นแม่แบบในการสร้างอนุภาคไวรัสเด็งกีอ่อนฤทธิ์ที่เป็นตัวแทนไวรัสเด็งกีแต่ละซีโรไทป์ คือ rDEN1Δ30, rDEN3Δ30/31, rDEN4Δ30 (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างจีโนมวัคซีนทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ไวรัสเด็งกี 4 ซีโรไทป์ โดยทีม NIH ได้ตัดชิ้นส่วน 30/31 นิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' UTR ในจีโนมไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 (แท่งสีส้ม) ซีโรไทป์ 3 (แท่งสีเขียว) และ ซีโรไทป์ 4 (แท่งสีเหลือง) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นไวรัสที่อ่อนฤทธิ์ rDEN1 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31 และ rDEN4 Δ 30 และได้ย้ายที่กำหนดการสร้างโปรตีน prM และ E ของไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 (แท่งสีม่วงอ่อน) มาแทนที่ตำแหน่ง prME ของ rDEN4 Δ 30 ได้เป็น rDEN2/4 Δ 30 ที่มีการแสดงออกโปรตีน prM และ E จากไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 ในโครงสร้างจีโนมไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 4

สำหรับวัคซีนทดสอบเด็งกีซีโรไทป์ 2 ได้พัฒนาโดยอาศัยการตัดต่อเฉพาะชิ้นส่วน prME จากไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 เข้าสู่ cDNA ของ rDEN4 Δ 30 ได้เป็นแม่แบบในการสร้างไวรัสลูกผสม (chimeric virus) rDEN2/4 Δ 30⁽²²⁾ (รูปที่ 1) ที่มีการแสดงออกแอนติเจนจากไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ New Guinea C (NGC)⁽²³⁾ ในโครงสร้างจีโนมไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 4 เมื่อนำวัคซีนทดสอบที่มีส่วนผสมของไวรัสทั้ง 4 ชนิดไปฉีดในคนในการศึกษาเฟส 1 พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ต่อไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ที่ร้อยละ 74 และ 92 ต่อไวรัสเด็งกี 3 ซีโรไทป์ขึ้นไปในคนที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อน กลุ่ม flavivirus สำหรับกลุ่มคนที่เคยได้รับเชื้อมาก่อน กลุ่ม flavivirus การฉีดวัคซีนทดสอบในโดส (dose) แรกให้ผลกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีสูงถึงร้อยละ 85 ต่อไวรัสเด็งกี 4 ซีโรไทป์ และให้ผลร้อยละ 100 ต่อไวรัสเด็งกี 3 ซีโรไทป์⁽²⁴⁾ (ตารางที่ 1) การทดสอบวัคซีนในเฟส 2 อยู่ในระหว่างการทดสอบในกลุ่มอาสาสมัครในประเทศไทยและบราซิล⁽²⁵⁻²⁶⁾

นอกจากนี้ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้สร้างไวรัสเด็ง

กีลูกผสมชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ด้วยการตัดต่อยีน prME ของไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ 16007⁽²⁷⁾, ไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 3 สายพันธุ์ 16562⁽²⁸⁾ และ ไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 4 สายพันธุ์ 1036⁽²⁸⁾ เข้าสู่ cDNA ของจีโนมไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ 16681⁽²⁷⁾ ชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ ได้วัคซีนทดสอบชนิดลูกผสม DENV-1/DENV-2, DENV-3/DENV-2 และ DENV-4/DENV-2⁽²⁷⁻³¹⁾ ที่มีส่วนผสมแอนติเจนเป็นตัวแทนมาจากแต่ละไวรัสเด็งกีซีโรไทป์แต่เพิ่มจำนวนไวรัสด้วยโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างจากไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 2 รวมกับวัคซีนทดสอบ DENV-2 เป็นวัคซีนทดสอบที่ประกอบด้วยไวรัสเด็งกี 4 ชนิดผสมกัน และพัฒนาต่อยอดโดยบริษัท Inviragen ซึ่งในปัจจุบันส่งต่อให้บริษัท Takeda โดยพบว่าเมื่อนำส่วนผสมวัคซีนทดสอบมาฉีดให้กับคนกลุ่มผู้ใหญ่ที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อน ในเฟส 1 ให้ผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความปลอดภัยของวัคซีนทดสอบอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้⁽³²⁾ ต่อมาได้ขยายการทดสอบเป็นเฟส 2 ในคนที่มีความเสี่ยงสูง 1-45 ปี โดยฉีด 2 เข็มห่างกัน 3 เดือน พบว่าสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกี 4 ซีโรไทป์สูงถึงร้อยละ 97 โดยตรวจพบระดับแอนติบอดีสูงถึงร้อยละ 100 ต่อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 และ 2 แต่ให้ค่าต่ำที่สุดต่อไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 4⁽³³⁾ (ตารางที่ 1) ในปัจจุบันวัคซีนทดสอบชุดนี้ยังคงอยู่ในระหว่างการทดสอบในคนเฟสที่ 2

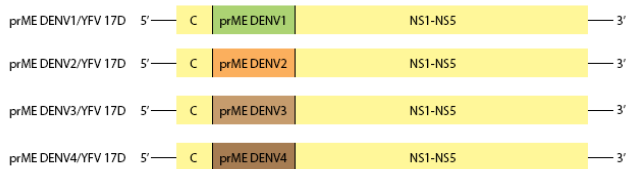
ข้อดีของการพัฒนาวัคซีนเด็งกีทดสอบแบบไวรัสตัวเป็นอ่อนฤทธิ์คือการสามารถกลอกเลียนแบบแอนติเจนของไวรัสให้เหมือนกับลักษณะแอนติเจนที่พบในธรรมชาติ ทำให้การกระตุ้นด้วยวัคซีนทดสอบชนิดดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับการติดเชื้อในธรรมชาติ โอกาสที่ภูมิคุ้มกันจะจดจำไวรัสที่ติดเชื้อในร่างกายรอบใหม่จะมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากการเตรียมแอนติเจนเป้าหมายสำหรับวัคซีนทดสอบหลายรูปแบบที่เข้าสู่การทดสอบในคนดังที่ได้กล่าวไปเบื้องต้น จะเห็นว่าเป็นการสร้างไวรัสเด็งกีตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ด้วยรูปแบบการเพาะเลี้ยงไวรัสหลายๆ รอบในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือการสร้างไวรัสตัวเป็นหรือไวรัสลูกผสมให้อ่อนฤทธิ์ในหลอด

ทดลอง โดยแสดงแอนติเจน prM และ E ที่เป็นตัวแทนจากแต่ละซีโรไทป์ ซึ่งยังไม่มี การนำความรู้ทางด้านความหลากหลายแอนติเจนของสายพันธุ์ไวรัสเด็งกี รูปแบบอนุภาคไวรัสเด็งกี และตำแหน่งแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีชนิดลบข้างฤทธิ์ไวรัสเด็งกีมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนทดสอบ จึงทำให้เกิดข้อจำกัดในการคัดเลือกแอนติเจนในรูปแบบที่ดีที่สุดในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพป้องกันโรค นอกจากนี้ข้อด้อยของการใช้วัคซีนทดสอบแบบมีชีวิตถึงแม้ว่าจะเป็นชนิดอ่อนฤทธิ์แต่พบว่าสามารถทำให้ติดเชื้อในกลุ่มทดลองได้และเกิดปฏิกิริยาตอบสนองที่รุนแรงต่อวัคซีนทดสอบ⁽¹⁴⁾ และไม่สามารถใช้กับคนที่มีความพร้อมทางภูมิคุ้มกันรวมไปถึงคนที่ท้องซึ่งจะมีความเสี่ยงที่วัคซีนจะก่อโรคสูงกว่าในคนปกติ นอกจากนี้ยังอาจพบปัญหาไวรัสซีโรไทป์ใดซีโรไทป์หนึ่งรบกวนการเข้าเซลล์ของซีโรไทป์อื่นเมื่อเตรียมเป็นส่วนผสมในการฉีดพร้อมกันทั้ง 4 ซีโรไทป์ ซึ่งทำให้เกิดผลกระทบต่อ การสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์เพื่อให้ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน⁽³⁴⁾

จากผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคนด้วยวัคซีนเด็งกีทดสอบ 4 รูปแบบที่เตรียมจากทีมมหาวิทยาลัยมหิดล WRAIR NIH และ CDC ในรูปแบบไวรัสเด็งกีตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ แสดงให้เห็นถึงความสามารถการเป็นแอนติเจนของไวรัสเด็งกีในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็งกีได้ดีมากกว่า 3 ซีโรไทป์ โดยเฉพาะการพัฒนาวัคซีนทดสอบชุด rDEN1 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30, rDEN3 Δ 30/31, rDEN4 Δ 30 จากทีม NIH เป็นความหวังของการพัฒนาวัคซีนเด็งกีต่อไป เนื่องจากเป็นชุดแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็งกีได้ครบ 4 ซีโรไทป์และสูงในระดับที่ใกล้เคียงกันถึงมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทดสอบในคนเฟส 2 อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญที่ทำให้วัคซีนเด็งกีทดสอบโดยทีมมหาวิทยาลัยมหิดลไม่ได้พัฒนาต่อเนื่องจนถึงปัจจุบันเนื่องจากประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ไม่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นข้อควรพิจารณาที่สำคัญต่อความสำเร็จของการพัฒนาวัคซีนเด็งกี

วัคซีนเด็งวาเซีย (Dengvaxia)

วัคซีนเด็งวาเซีย คือ วัคซีนลูกผสมไวรัสไข้เหลืองและไวรัสเด็งกีชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ที่มีการรวมแอนติเจนจากไวรัสเด็งกีครบ 4 ซีโรไทป์ (chimeric yellow fever-dengue, live-attenuated, tetravalent dengue vaccine, CYD-TDV) เป็นวัคซีนเด็งกีทดสอบชนิดแรกในโลกที่ผ่านการทดสอบเฟส 3 ในคน โดยให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในคนกลุ่มทดลองได้ครอบคลุม 4 ซีโรไทป์ วัคซีนดังกล่าวเป็นชนิดไวรัสตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ลูกผสมสร้างโดยทีมนักวิจัยจาก St. Louis University Health Sciences Center จากนั้นส่งต่อไปให้กับบริษัท Acambis และพัฒนาต่อในระดับอุตสาหกรรมเพื่อทดสอบในคนโดยบริษัท Sanofi Pasteur วัคซีนเด็งวาเซียสร้างโดยกระบวนการตัดต่อทางพันธุกรรม นำเอาชิ้น prME ของไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ PUO-359/TVP-1140 ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ PUO-218 ซีโรไทป์ 3 สายพันธุ์ PaH881/88 ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์มาจากไทย และซีโรไทป์ 4 สายพันธุ์ 1228 (TVP-980) มาจากอินโดนีเซีย⁽³⁵⁻³⁶⁾ ตัดต่อแทนที่ยีน prME ใน cDNA ของไวรัสไข้เหลืองสายพันธุ์วัคซีน 17D(YFV 17D) (รูปที่ 2) การออกแบบแอนติเจนสำหรับวัคซีนเด็งวาเซียเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับวัคซีนเด็งกีทดสอบอื่นๆ ที่อยู่ในระหว่างการทดสอบในคน โดยใช้โปรตีน prM และ E ของไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่แยกได้จากภูมิภาคหรือประเทศเดียวกันเป็นเป้าหมายกระตุ้นภูมิคุ้มกันและอาจมีรูปแบบอนุภาคไวรัสเด็งกีจากไวรัสตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ทั้ง 4 ซีโรไทป์ในสัดส่วนที่ปนกันระหว่างอนุภาคแบบสมบูรณ์ อนุภาคแบบไม่สมบูรณ์ และอนุภาคแบบสมบูรณ์ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ร่วมกันของโปรตีน pr และ E ที่อยู่บนผิวอนุภาคไวรัสแต่ละรูปแบบ



รูปที่ 2 โครงสร้างจีโนมวัคซีนเด็งวาเซีย โดยการตัดต่อชิ้นส่วนยีน prME จากไวรัสเด็งกัทั้ง 4 ซีโรไทป์ (ແທ່ງສີເຂົ້ວ สำหรับซีโรไทป์ 1 สีส้ม สำหรับซีโรไทป์ 2 สีน้ำตาลอ่อน สำหรับซีโรไทป์ 3 และสีน้ำตาลเข้มสำหรับซีโรไทป์ 4) ใส่แทนที่ยีน prME ของไวรัสไข้เหลืองสายพันธุ์ที่ใช้ทำวัคซีนได้เป็นไวรัสลูกผสมตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ที่มีโปรตีน prM และ E ของไวรัสเด็งกัก็แสดงออกภายใต้การเพิ่มจำนวนด้วยยีนอื่นๆ ที่มาจากไวรัสไข้เหลือง (ແທ່ງສີເຂົ້ວ) ได้เป็น prME DENV1/YFV 17D, prME DENV2/YFV 17D, prME DENV3/YFV 17D และ prME DENV4/YFV 17D

การศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกัทั้ง 4 ซีโรไทป์ของวัคซีนเด็งวาเซียในระดับเฟส 3 ในคนประกอบด้วยการศึกษาในอาสาสมัครจาก 2 กลุ่มแบ่งตามประเทศในแถบเอเชียและลาตินอเมริกา ซึ่งเป็นแหล่งที่มีอัตราการระบาดของโรคเด็งกัสูง การศึกษาในอาสาสมัครในกลุ่มที่ 1 ในประเทศในแถบเอเชียประกอบด้วยกลุ่มทดลองอายุช่วง 2-14 ปี รวมทั้งสิ้น 10,275 คน จากประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม อินโดนีเซีย และไทย วัคซีนโดสที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยไวรัสลูกผสมที่มาจากทั้งหมด 4 ซีโรไทป์ ที่ปริมาณไวรัสแต่ละซีโรไทป์ 10^5 CCID₅₀ (50% cell culture infective dose) ทำการฉีด 3 เข็มที่ 0-6-12 เดือน พบประสิทธิภาพป้องกันโรคโดยรวมเฉลี่ยต่อทั้ง 4 ซีโรไทป์ร้อยละ 65.6 เมื่อแยกออกเป็นแต่ละซีโรไทป์ได้ ประสิทธิภาพการป้องกันโรคร้อยละ 58.4 สำหรับ DENV-1, ร้อยละ 47.1 สำหรับ DENV-2, ร้อยละ 73.6 สำหรับ DENV-3, และร้อยละ 83.2 สำหรับ DENV-4 เมื่อแบ่งผลการป้องกันโรคของวัคซีนตามกลุ่มอายุ พบว่าร้อยละการป้องกันโรคเพิ่มสูงขึ้นตามอายุกลุ่มทดสอบ โดยในเด็กอายุ 2-5 ปี แสดงผลการป้องกันโรคที่ร้อยละ 33.7 อายุ 6-11 ปี ป้องกันที่ร้อยละ 59.5 และอายุ 12-14 ปี ป้องกันที่ร้อยละ

74.4 นอกจากนี้ผลการป้องกันโรคในกลุ่มทดลองฉีดวัคซีนที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนสูงถึงร้อยละ 74.3 ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนแสดงผลการป้องกันโรคร้อยละ 35.5 (ตารางที่ 1) นอกจากนี้วัคซีนสามารถลดอัตราการเข้ารักษาในโรงพยาบาลในสัดส่วน 2 ใน 3⁽³⁷⁾

การทดสอบในคนเฟส 3 สำหรับกลุ่มที่ 2 ในประเทศแถบลาตินอเมริกา ได้แก่ ประเทศบราซิล เม็กซิโก โคลัมเบีย เปรู โตริโก และฮอนดูรัส ได้ทำการทดสอบวัคซีนเด็งวาเซียในคนอายุ 9-16 ปี จำนวน 20,869 คน ประสิทธิภาพป้องกันโรคร้อยละ 60.8 ต่อไวรัสเด็งกัทั้ง 4 ซีโรไทป์ เมื่อแยกออกเป็นแต่ละซีโรไทป์แสดงประสิทธิภาพการป้องกันโรคร้อยละ 50.3 สำหรับ DENV-1, ร้อยละ 42.3 สำหรับ DENV-2, ร้อยละ 74.0 สำหรับ DENV-3, และร้อยละ 77.7 สำหรับ DENV-4 เมื่อแบ่งผลการป้องกันโรคของวัคซีนตามกลุ่มอายุ 9-11 ปี และ 12-16 ปี พบว่าร้อยละการป้องกันโรคสูงใกล้เคียงกันทั้งสองช่วงอายุคือ ร้อยละ 61.7 และ ร้อยละ 67.6 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการป้องกันโรคในกลุ่มทดลองฉีดวัคซีนที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนสูงถึงร้อยละ 83.7 ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนแสดงผลการป้องกันโรคเพียงร้อยละ 43.2 (ตารางที่ 1) และวัคซีนนี้สามารถลดการเข้ารักษาในโรงพยาบาลได้ที่ร้อยละ 80.3⁽³⁸⁾

การศึกษาความปลอดภัยของวัคซีนเด็งวาเซียในปีที่ 3 จากเฟส 3 จำนวน 31,034 คน และจากเฟส 2b จำนวน 3,203 คน หลังการได้รับวัคซีนครบ 3 โดส พบสัดส่วนผู้ป่วยเข้าโรงพยาบาลที่ยืนยันผลการตรวจไวรัสเด็งกัในกระแสเลือดร้อยละ 0.50 ในกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 9 ปี ขณะที่ในกลุ่มอายุน้อยกว่า 9 ปี มีสัดส่วนที่สูงกว่า โดยเฉพาะในกลุ่มอายุ 2-5 ปี พบสัดส่วนผู้ป่วยเข้าโรงพยาบาลที่ยืนยันผลการตรวจไวรัสเด็งกัในกระแสเลือดร้อยละ 7.45 ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไข้เลือดออกเด็งกัโดยรวมที่ 25 เดือนหลังได้รับวัคซีนคือ ร้อยละ 60.3 และเมื่อแยกตามกลุ่มอายุสามารถป้องกันโรคได้ร้อยละ 65.6 ในกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 9 ปี และสำหรับกลุ่ม

อายุน้อยกว่า 9 ปี ป้องกันโรคได้เพียงร้อยละ 44.6 และเมื่อพิจารณาตามกลุ่มอายุร่วมกับประวัติการติดเชื้อมาก่อนจะเห็นว่าในกลุ่มที่อายุเท่ากับ 9 ปีขึ้นไปที่เคยได้รับเชื้อมาก่อน ให้ผลการป้องกันโรคที่ร้อยละ 81.9 ในขณะที่แสดงผลการป้องกันโรคต่ำกว่าที่ร้อยละ 52.5 ในคนที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อน และสำหรับกลุ่มที่อายุน้อยกว่า 9 ปี ร่วมกับมีประวัติเคยได้รับเชื้อมาก่อนแสดงผลการป้องกันโรคที่ร้อยละ 70.1 ในขณะที่แสดงผลการป้องกันโรคในกลุ่มคนที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนที่ร้อยละ 14.4 (ตารางที่ 1)⁽³⁹⁾

ในปัจจุบันวัคซีนเด็งวาเซียได้รับการรับรองให้ใช้เพื่อให้บริการฉีดในสถานสุขภาพในหลายประเทศได้แก่ เม็กซิโก บราซิล ฟิลิปปินส์ รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากประสิทธิภาพป้องกันโรคของวัคซีนต่อไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ อยู่ในระดับปานกลาง แต่วัคซีนสามารถลดสัดส่วนจำนวนผู้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลได้สูง ทำให้วัคซีนเด็งวาเซียมีความเหมาะสมในการฉีดเพื่อลดความรุนแรงของโรคเป็นหลักวัคซีนเด็งวาเซียหนึ่งโดสประกอบด้วย 3 เข็ม ฉีดห่างกัน 6 เดือน วัคซีนนี้จะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็งกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์นานอย่างน้อย 2 ปี อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาการคงอยู่ของภูมิคุ้มกันในระยะยาวอยู่ในระหว่างการศึกษาโดยการติดตามผู้ที่ได้รับวัคซีนทดสอบถึงระยะเวลา 6 ปี หลังจากการได้รับวัคซีน⁽³⁹⁾ ข้อเสนอแนะสำหรับกลุ่มผู้รับการฉีดวัคซีนควรมีอายุในช่วง 9-45 ปี และเคยมีประวัติการติดเชื้อมาก่อนและอยู่ในแหล่งที่มีการระบาดของไวรัสเด็งกี่สูงตั้งแต่ร้อยละ 70 สำหรับในเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 9 ปี และยังไม่เคยมีประวัติการได้รับเชื้อมาก่อน มีความเสี่ยงสูงต่อการเข้าโรงพยาบาลจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ ดังนั้นจึงเป็นกลุ่มที่ไม่ควรรับการฉีดวัคซีนเด็งวา

เซีย ทั้งนี้รวมไปถึงกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ คนชรา และคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องด้วย

เป็นที่น่าสนใจว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แยกได้จากซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่มีฤทธิ์ส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสซิกา (Zika virus) ในหลอดทดลองได้ แอนติบอดีนี้จดจำแอนติเจนไวรัสเด็งกี่ที่ตำแหน่ง D2 ของโปรตีน E ในส่วนที่ทำหน้าที่หลอมรวมผนังหุ้มไวรัสเข้ากับผนังเอนโดไซมของโฮสต์สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับไวรัสเด็งกี่ได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์⁽⁴⁰⁾ จากผลการศึกษาจึงเกิดประเด็นกังวลในการใช้วัคซีนเด็งวาเซียต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่อาจนำไปสู่การส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสซิกาเมื่อพิจารณาถึงความเสี่ยงของการเข้าโรงพยาบาลด้วยการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่สูงในกลุ่มเด็กที่ได้รับวัคซีนเด็งวาเซียที่มีอายุน้อยกว่า 9 ปี และไม่เคยได้รับเชื้อไวรัสเด็งกี่มาก่อนเปรียบเทียบกับเด็กที่ไม่ได้รับวัคซีน⁽³⁹⁾ สะท้อนให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนไม่ได้ผลหรืออาจมีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มและส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้จึงทำให้เด็กที่ได้รับวัคซีนมีการติดเชื้อเข้าโรงพยาบาล เนื่องจากไวรัสซิกามีความแตกต่างของโปรตีน E จากไวรัสเด็งกี่ประมาณร้อยละ 41-46⁽⁴⁰⁾ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่แอนติบอดีต่อวัคซีนเด็งวาเซียจะสามารถจับข้ามกลุ่มกับไวรัสซิกาและอาจส่งเสริมการติดเชื้อได้ อย่างไรก็ตามการทดลองเพื่อสืบหาฤทธิ์แอนติบอดีจากการกระตุ้นด้วยวัคซีนเด็งวาเซียต่อการส่งเสริมฤทธิ์การติดเชื้อไวรัสซิกาควรมีการดำเนินการต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการวางมาตรการป้องกันไวรัสเด็งกี่และไวรัสซิกาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพวัคซีนเด็กที่ทดสอบที่เข้าสู่งการทดสอบในคนและวัคซีนเด็กวาเซีย

วัคซีนเด็กที่ทดสอบ/วัคซีน เด็ก (ทีมทดสอบ)	ระยะการ ทดสอบ ในคน	ประสิทธิภาพวัคซีนทดสอบ/วัคซีน	ข้อดี/ข้อด้อย
ไวรัสเด็กที่ตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ ชนิดเดี่ยว (มหาวิทยาลัยมหิดล)	เฟส 2 (หยุดการศึกษา)	- กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็กที่ซีโรไทป์ 2, 3 และ 4 ร้อยละ 75-100 - กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็กที่ซีโรไทป์ 1 ได้ร้อยละ 17 - 78	- ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็กที่ซีโรไทป์ - กระตุ้นปฏิกิริยาแพ้ต่อ วัคซีนสูงในไวรัสเด็กที่ซีโร ไทป์ 1
ไวรัสเด็กที่ชนิดตัวเป็นอ่อน ฤทธิ์ 4 ซีโรไทป์ (WRAIR)	เฟส 2	กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ $\geq$ ร้อยละ 60 ต่อ ไวรัสเด็กที่ 4 ซีโรไทป์	- กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีในคน ที่ไม่เคยสัมผัสกับเชื้อมาก่อน
รีคอมบิแนนท์ไวรัสเด็ก/ ไวรัสเด็กที่ลูกผสมชนิดตัว เป็นอ่อนฤทธิ์ 4 ซีโรไทป์ (NIH)	เฟส 2	1. กลุ่มทดสอบที่ไม่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อน - กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็กที่ทุกซีโร ไทป์ ร้อยละ 74 - กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็กที่ ≥ 3 ซี โรไทป์ ร้อยละ 92 2. กลุ่มทดสอบที่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อน - กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็กที่ทุกซีโร ไทป์ ร้อยละ 85 - กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสเด็กที่ ≥ 3 ซี โรไทป์ ร้อยละ 100	- กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงทั้ง ในคนที่เคยและไม่เคยสัมผัส กับเชื้อมาก่อน
รีคอมบิแนนท์ไวรัสเด็กที่ ลูกผสมในจีโนมไวรัสเด็กที่ซี โรไทป์ 2 ชนิดตัวเป็นอ่อน ฤทธิ์ 4 ซีโรไทป์ (CDC)	เฟส 2	- ตรวจพบแอนติบอดีชนิดกลางฤทธิ์ต่อไวรัสเด็ก ที่ 4 ซีโรไทป์ ร้อยละ 97	- สร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเด็ก ที่ 4 ซีโรไทป์ในระดับที่ แตกต่างกันมาก โดยให้ค่าที่ ต่ำต่อไวรัสเด็กที่ซีโรไทป์ 4
รีคอมบิแนนท์ไวรัสเด็กที่ ลูกผสมในจีโนมไวรัสไข้ เหลืองชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ 4 ซีโรไทป์ (Sanofi Pasteur)	เฟส 3 (ผ่านการรับรอง ในคน)	1. กลุ่มทดสอบ ≥ 9 ปี - ป้องกันไวรัสเด็กที่ทุกซีโรไทป์ที่ค่าเฉลี่ยร้อยละ 65.6% ซีโรไทป์ 1 ร้อยละ 58.4 ซีโรไทป์ 2 ร้อยละ 47.1 ซีโรไทป์ 3 ร้อยละ 73.6 ซีโรไทป์ 4 ร้อยละ 83.2 2. กลุ่มทดสอบ < 9 ปี - ป้องกันไวรัสเด็กที่ทุกซีโรไทป์ที่ค่าเฉลี่ยร้อยละ 44.6 ซีโรไทป์ 1 ร้อยละ 46.6 ซีโรไทป์ 2 ร้อยละ 33.6 ซีโรไทป์ 3 ร้อยละ 62.1 ซีโรไทป์ 4 ร้อยละ 51.7	- ให้ผลป้องกันโรคสูงในกลุ่ม ที่มีประวัติเคยสัมผัสเชื้อมา ก่อน - ประสิทธิภาพการป้องกัน ไวรัสเด็กที่ซีโรไทป์ 2 ต่ำ - ป้องกันโรคในกลุ่มเด็กที่ไม่ เคยได้รับเชื้อมาก่อนที่ร้อย ละ 14.4

บทสรุป

สถานการณ์โรคเด็งกีมีแนวโน้มขยายวงกว้างเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับและยังคงเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพของประชากรโลกอย่างต่อเนื่อง ความหลากหลายของไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ทำให้เกิดความซับซ้อนของโรคเด็งกีและทำให้เกิดข้อจำกัดหลายๆด้านในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค การออกแบบวัคซีนเด็งกีทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์และวัคซีนเด็งวาเซียในอดีตใช้โปรตีน prM และ E ทั้งชิ้นส่วนที่อยู่บนอนุภาคไวรัสเด็งกีเป็นเป้าหมายแอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปัจจุบันความรู้ทางด้านคุณลักษณะแอนติเจนไวรัสเด็งกีเพิ่มมากขึ้น รูปแบบอนุภาคไวรัสเด็งกีมีหลากหลายชนิดและแสดงสัดส่วนที่ต่างกันของโปรตีน pr และ E ที่อยู่บนผิวอนุภาคไวรัสการออกแบบวัคซีนเด็งกีในอนาคตอาจต้องคำนึงถึงการเลือกสร้างวัคซีนให้มีโครงสร้างของโปรตีนบนผิวอนุภาคแบบสมบูรณ์เท่านั้นเพื่อเป็นเป้าหมายระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีชนิดลบล้างฤทธิ์ไวรัสเด็งกีได้อย่างมีประสิทธิภาพเพียงชนิดเดียวอีกทั้งการนำความรู้ของไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ที่จำแนกความแตกต่างของแอนติเจนระหว่างไวรัสสายพันธุ์ทั่วโลกที่ทำได้ละเอียดขึ้นด้วยวิธี antigenic cartography เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์ไวรัสเด็งกีซึ่งแตกต่างจากการคัดเลือกตามซีโรไทป์ในอดีตจะทำให้ได้แอนติเจนของวัคซีนที่มีความหลากหลายครอบคลุมไวรัสสายพันธุ์มากขึ้น

เป็นที่น่ายินดีเมื่อมีวัคซีนเด็งวาเซียชนิดแรกของโลกได้ใช้ในหลายประเทศที่เป็นแหล่งระบาดของโรคเด็งกีด้วยวัตถุประสงค์เพื่อลดความรุนแรงของโรคเป็นหลักแต่ยังไม่สามารถใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ใกล้เคียงกันทุกซีโรไทป์ผู้รับการฉีดวัคซีนควรได้รับทราบความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นภายหลังการฉีดวัคซีน การมีวัคซีนเด็งกีทดสอบชนิดตัวเป็นอ่อนฤทธิ์อีกหลายรูปแบบที่อยู่ในระหว่างการทดสอบในคนจึงเป็นความหวังในการมีวัคซีนเด็งกีตัวเลือกและโดยเฉพาะประเทศไทยหากสามารถผลิตวัคซีนเด็งกีใช้ได้เองภายในประเทศน่าจะเป็นคำตอบที่สมบูรณ์แบบที่สุดในการป้องกันโรคอย่างไรก็ตามเนื่องจาก

การแพร่กระจายของโรคเด็งกีนำโดยยุงพาหะดังนั้นการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงจึงยังเป็นวิธีที่ควรใช้ร่วมกับการฉีดวัคซีนเพื่อให้อาจสามารถป้องกันและควบคุมโรคเด็งกีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Global Strategy for dengue prevention and control, 2012-2020. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2012. Available at http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf
2. Lindenbach BD, Rice CM. The viruses and their replication: Flaviviridae. In: Fields BN, Knipe DN, Howley PM, editos. Fields virology, 4th ed. Lippincott-Raven, New York; 2001. p 991-1041.
3. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. J Virol 2010; 84: 8353-8.
4. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. Science 2008; 319: 1834-7.
5. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell 2002; 108: 717-25.
6. Plevka P, Battisti AJ, Junjhon J, Winkler DC, Holdaway HA, Keelapang P, et al. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. EMBO Rep 2011; 12: 602-6.
7. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization

- of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 907-12.
8. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 168-75.
 9. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 2010; 328: 745-8.
 10. Chan AH, Tan HC, Chow AY, Lim AP, Lok SM, Moreland NJ, et al. A human PrM antibody that recognizes a novel cryptic epitope on dengue E glycoprotein. *PLoS One* 2012; 7: e33451.
 11. Halstead SB. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Health* 2012; 32 Suppl 1: 5-9.
 12. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 19-28.
 13. Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Bustos Arriaga J, Green A, James SL, et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science* 2015; 349: 1338-43.
 14. Bhamarapravati N, Yoksan S. Live-attenuated tetravalent dengue vaccine. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford, UK: Cab international; 1997. p. 367-78.
 15. Bauer K, Esquilin IO, Cornier AS, Thomas SJ, Quintero Del Rio AI, Bertran-Pasarell J, et al. A Phase II, randomized, safety and immunogenicity trial of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy children and adults living in Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 93: 441-53.
 16. Watanaveeradej V, Simasathien S, Nisalak A, Endy TP, Jarman RG, Innis BL, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve infants. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85: 341-51.
 17. Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naïve children. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 426-33.
 18. Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, et al. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 88: 73-88.
 19. Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol* 2003; 77: 1653-7.
 20. Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a live-attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol* 2006; 19: 10-32.
 21. Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5139-43.
 22. Whitehead SS, Hanley KA, Blaney JE Jr, Gilmore LE, Elkins WR, Murphy BR. Substitution of the

- structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. *Vaccine* 2003; 21: 4307-16.
23. Bray M, Lai CJ. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 10342-6.
 24. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, et al. A single dose of any of four different live-attenuated tetravalent dengue vaccines is safe and immunogenic in flavivirus-naïve adults: a randomized, double-blind clinical trial. *J Infect Dis* 2013; 207: 957-65.
 25. ClinicalTrials.gov. Evaluating the safety of and immune response to a dengue vaccine (TV003) in healthy adults, adolescents, and children in Thailand [Internet]. 2016 [cited 2017 Feb 1]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02332733>.
 26. ClinicalTrials.gov. Phase II trial to evaluate safety and immunogenicity of a dengue 1,2,3,4(attenuated) vaccine [Internet]. 2016[cited 2017 Feb 1]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01696422>.
 27. Huang CY, Butrapet S, Pierro DJ, Chang GJ, Hunt AR, Bhamarapavati N, et al. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol* 2000; 74: 3020-8.
 28. Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol* 2003; 77: 11436-47.
 29. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapavati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 1997; 230: 300-8.
 30. Huang CY, Butrapet S, Pierro DJ, Chang GJ, Hunt AR, Bhamarapavati N, et al. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol* 2000; 74: 3020-28.
 31. Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol* 2003; 77: 11436-47.
 32. George SL, Wong MA, Dube TJ, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, et al. Safety and immunogenicity of a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate in flavivirus-naïve adults: a randomized, double-blinded phase 1 clinical trial. *J Infect Dis* 2015; 212: 1032-41.
 33. Sirivichayakul C, Barranco-Santana EA, Esquelin-Rivera I, Oh HM, Raanan M, Sariol CA, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine candidate in healthy children and adults in dengue-endemic regions: a randomized, placebo-controlled phase 2 study. *J Infect Dis* 2016; 213: 1562-72.

34. Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue vaccines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015;46 Suppl 1: 138-45.
35. Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, et al. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol* 2000; 74: 5477-85.
36. Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* 2001; 75: 7290-304.
37. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014; 384: 1358-65.
38. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med* 2015; 372: 113-23.
39. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med* 2015; 373: 1195-206.
40. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virussero-cross-reactivitydrivesantibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* 2016; 17: 1102-8.