

Development and Designation of Primers and Probes for Detection and Serotype Identification of Dengue Viruses with One-Step Multiplex Fluorogenic TaqMan Real-Time RT-PCR

Kittipong Kerdrat¹ and Rerngwit Boonyom^{2*}

¹Bureau of Vector Borne Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

Dengue fever is caused by dengue viruses. These viruses are transmitted to human *via* a common house mosquito, *Aedes aegypti*. Dengue viruses are classified into 4 serotypes, 1-4 by distinct immunogenicity. The aim of this study was to develop an in-house assay one-step multiplex real-time RT-PCR for dengue viruses identifying. Specific primers and probes were designed for each viral serotype and all serotypes. All sets of primers were examined for viral specificity by conventional RT-PCR. The results showed that the designed primers were able to amplify dengue serotype 1, 2, 3 and 4. All primers were then applied for multiplex real-time RT-PCR. The result demonstrated that the multiplex real-time RT-PCR with specific probes were capable of detecting and classifying serotype of dengue virus. Finally, the results from in-house real-time RT-PCR and those from AmpliSens® Dengue virus type-FRT PCR kit were compared. It was demonstrated that the results from real-time RT-PCR were concordant to those from AmpliSens kit. The preliminary result led to the conclusion that the developed in-house real-time RT-PCR assay with specific primers and probes is capable of detecting and classifying dengue virus serotypes. However, in-house real-time RT-PCR should be evaluated further to identify low detection limit and cross reactivity with other viruses.

Keywords: Dengue fever, Dengue virus, Multiplex Real-time RT-PCR

*Corresponding author E-mail address: rerngwitb@nu.ac.th

Received: May 12, 2018

Revised: June 20, 2018

Accepted: October 1, 2018

การพัฒนาและออกแบบไพรเมอร์และโพรบเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสไข้เลือดออกเดงกีด้วยวิธี One-Step Multiplex Fluorogenic TaqMan Real-Time RT-PCR

กิตติพงษ์ เกิดฤทธิ์¹ และ เรืองวิทย์ บุญโยม^{2*}

¹สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกเดงกีเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกีโดยมียุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะสู่คน เชื้อไวรัสดังกล่าวสามารถแยกได้ 4 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์ 1-4 ตามลักษณะของแอนติเจนที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการทดสอบหาไวรัสเดงกีและจำแนกซีโรไทป์โดยอาศัยหลักการ one-step multiplex real-time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่ได้ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ และทุกซีโรไทป์ โดยได้ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1-4 ได้ แล้วได้นำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งหมดมาทดสอบกับ multiplex real-time RT-PCR ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทดสอบ multiplex real-time RT-PCR ร่วมกับโพรบที่จำเพาะสามารถตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบของ in-house real-time RT-PCR กับผลการทดสอบจาก AmpliSens® Dengue virus type-FRT PCR kit พบว่าผลที่ได้จากการทดสอบทั้งสองมีความสอดคล้องกัน ดังนั้นสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า การทดสอบ in-house real-time RT-PCR ร่วมกับไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบขึ้นอย่างจำเพาะ สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์หาและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับขีดจำกัดของปริมาณสารพันธุกรรมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี in-house real-time RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นรวมทั้งการเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์เมื่อทดสอบกับไวรัสชนิดอื่น ๆ

คำสำคัญ: โรคไข้เลือดออก ไวรัสเดงกี Multiplex Real-time RT-PCR

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: rerngwitb@nu.ac.th

รับบทความ: 12 พฤษภาคม 2561

แก้ไขบทความ: 20 มิถุนายน 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 1 ตุลาคม 2561

บทนำ

โรคไข้เลือดออกเดงกีเป็นโรคติดต่อที่มีอยู่กลายเป็นพาหะซึ่งส่งผลกระทบต่อทางสังคมและสุขภาพของประชากรทั่วโลกและองค์การอนามัยโลกได้จัดให้โรคไข้เลือดออกเดงกีเป็นโรคติดต่อที่มีอยู่กลายเป็นพาหะที่สำคัญที่สุดในโลก⁽¹⁾ ในประเทศไทยมีการระบาดของโรคไข้เลือดออกเดงกีโดยพบว่ามีผู้ป่วยทั่วประเทศในปี พ.ศ. 2556 จำนวน 54,042 ราย และเสียชีวิต 62 ราย โดยพบผู้ป่วยมากที่สุดในภาคใต้ รองลงมา คือ ภาคเหนือ ภาคอีสาน และภาคกลาง รวมทั้งผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นทารกหรือเด็กเล็ก จึงจัดว่าโรคไข้เลือดออกเดงกีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ โรคไข้เลือดออกเดงกีเกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus)⁽²⁾ ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Flaviviridae ตระกูล Flavivirus⁽³⁾ สามารถแบ่งโดยอาศัยความแตกต่างของแอนติเจนออกเป็น 4 ซีโรไทป์ (serotype) คือ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4⁽⁴⁾ ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันการเกิดโรคไข้เลือดออกเดงกีที่มีประสิทธิภาพ⁽⁵⁾ ดังนั้นวิธีการป้องกันและควบคุมโรคที่ดีที่สุด คือ การป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีโดยการเฝ้าระวังการติดเชื้อและควบคุมปริมาณยุงพาหะของโรค⁽⁶⁾ ซึ่งการเฝ้าระวังไวรัสเดงกีในยุงสามารถนำมาใช้ในการติดตามซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีที่ส่งผ่านมาสู่ผู้ป่วยได้⁽²⁾ และยังเป็นสัญญาณเตือนลำดับแรกในการคาดคะเนทางด้านระบาดวิทยา^(7, 8)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจไวรัสเดงกีในยุง เช่น วิธี indirect immunofluorescent assay (IFA) ซึ่งใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีติดสลาด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ มาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในยุง แล้วตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์⁽⁹⁾ วิธีนี้มีความถูกต้องของการตรวจอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงได้ดี แต่มีข้อเสีย คือ

ต้องใช้เวลาในการทดสอบ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในงานประจำวันที่ต้องตรวจคัดกรองยุงในพื้นที่ต่างๆ ตามช่วงฤดูกาล เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อ ต่อมามีการพัฒนาการตรวจไวรัสเดงกีในยุงโดยใช้เทคนิค indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) วิธีนี้สามารถตรวจได้เร็วและใช้ตรวจตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากต่อครั้ง จึงเหมาะที่จะนำมาใช้กับงานทางด้านระบาดวิทยา อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังมีปัญหาด้านความไว ความจำเพาะ และการเกิดผลบวกปลอมกับไวรัสในกลุ่ม flavivirus อื่นๆ เช่น Yellow fever virus และ Japanese encephalitis virus เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีข้อเสียของการตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา คือ ไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเดงกีได้^(9, 10) จนได้มีการนำเทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอคชัน (polymerase chain reaction; PCR) ที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเดงกี แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้ตรวจในเลือดผู้ป่วย หรือตรวจโดยการนำเชื้อจากยุงเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงก่อนทดสอบโดยวิธีพอลิเมอร์เชนรีแอคชัน⁽¹¹⁾ ปัจจุบันมีชุดตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีในยุงที่ผลิตทางการค้าออกมามากมาย แต่มีราคาแพง ทำให้การตรวจด้วยชุดตรวจดังกล่าวไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีในยุงสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาการทดสอบเพื่อตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีด้วยวิธี one-step multiplex fluorogenic TaqMan real-time PCR เพื่อนำไปใช้ในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีในยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต และใช้ในการศึกษาความชุก รวมทั้งการระบาดของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ต่างๆ ในยุงจากแหล่งต่างๆ นอกจากนี้ ยังสามารถใช้ทดแทนชุดตรวจนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง ซึ่งจะช่วยให้การป้องกันและควบคุมโรคมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

1) สารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี

สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี (dengue viral RNA) สกัดจากเชื้อไวรัสเดงกีมาตรฐานซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 ที่ผ่านการยืนยันซีโรไทป์ด้วยวิธี indirect immunofluorescence โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีใช้ชุดสกัด Nucleospin[®] RNA (Macherey-Nagel, Germany) ซึ่งมีหลักการคร่าวๆ คือ หลังจากทำให้อนุภาคไวรัสแตก สารพันธุกรรม RNA ของไวรัสจะถูกจับไว้ด้วยซิลิกา DNA ที่ปนเปื้อนกำจัดด้วยเอนไซม์ DNase แล้วชะ RNA ออกมาด้วย RNase-free H₂O สารละลาย RNA ที่สกัดได้นำมาวัดปริมาณด้วยเครื่อง Colibri Microvolume Spectrometer (Titertek Berthold, Germany) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) แล้วเก็บสารละลาย RNA ที่ได้ไว้ที่ -80°C จนกว่าจะใช้ทดสอบ

2) การออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกี

ออกแบบไพรเมอร์และโพรบโดยใช้โปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.0 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, U.S.A.) โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวแทนของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ต่างๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วนทั้งจีโนมจาก Genbank ได้แก่ accession number EF025110, KJ918750, AY496879 และ KC333651 ซึ่งเป็นตัวแทนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำมาเปรียบเทียบเพื่อหาส่วนที่แตกต่างกันของแต่ละซีโรไทป์ หลังจากนั้นนำส่วนที่แตกต่างกันมาเปรียบเทียบอีกครั้งกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์เดียวกันจากแหล่งต่างๆ เพื่อการเปลี่ยนแปลงภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนนำมาออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่ครอบคลุมส่วน nonstructural protein 3 (NS3) และ NS2A ส่วนต่อระหว่างยีน premembrane กับยีน envelope และยีน RNA-dependent RNA polymerase ดังรายละเอียดใน Table 1 และ 2 ส่วน

Table 1 Characteristics of dengue virus amplicons generating primers

Type and primer sequence (5'-3')		Specificity	Genomic location	Tm (C°)	Size (bp)
Forward primer	CGCCACTTTCCTATGCGTCTC	DENV-1	5308 - 5327	61.9	149
Reverse primer	TCGCAGCTGCTTCACCCATA		5456 - 5475	61.9	
Forward primer	TGCTTAGGACCCGAGTAGGA	DENV-2	3542 - 3561	59.4	126
Reverse primer	TAGTGGCGCCTACCATAACC		3667 - 3686	59.3	
Forward primer	CACTTCCCTGACCCAGAAGGT	DENV-3	871 - 891	61.4	217
Reverse primer	GGTGGCCTCGGTCTTCTGA		1087 - 1105	61.3	
Forward primer	TACATGCCAACAGTCATAGAAGAG	DENV-4	8118 - 8141	58.3	154
Reverse primer	TTGATGTTGTTCACAGAGCT		8271 - 8292	58.5	
Forward primer	ATATGGTACATGTGGTTGGGAGC	DENV (all)	8990 - 9012	62.1	190
Reverse primer	CGGCTGTGTCATCTGCATACAT		9179 - 9200	63.3	

Table 2 Characteristics of dengue virus detection probes

Probe sequence (5'-3')	Specificity	5' Reporter	3' Quancher	Tm (C°)
CCAGCCAGCATAGCAGCCAGAGGG	DENV-1	HEX	BHQ1	70.2
GGGAACATGTCCTTTAGAGACCTGGG	DENV-2	Texas Red	BHQ2	65.4
CGTGGTGCTCGAGCACGGGGG	DENV-3	Cy5	BHQ3	71
GCCCCGTGTCCAGGAACTCCAC	DENV-4	Cy5.5	BHQ3	68.5
AGTGGAGTGGAAGGAGAAGGACTCC	DENV (all)	6-FAM	BHQ1	66.4

ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ ทำโดยเลือกตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในทุกซีโรไทป์ แล้วจึงนำมาออกแบบไพรเมอร์และโพรบ โดยมีความจำเพาะกับยีน RNA-dependent RNA polymerase (Table 1 และ 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ได้รับการออกแบบแล้วนำเสนอส่งบริษัท Biobasic ประเทศแคนาดา เพื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบสำหรับการวิจัยต่อไป

3) การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีมาตรฐานแต่ละซีโรไทป์⁽¹⁻⁴⁾ ถูกเปลี่ยนเป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA; cDNA) ด้วยน้ำยา Tetra cDNA Synthesis kit (Bioline, U.S.A.) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด random hexamer ร่วมกับเอนไซม์ MMLV reverse transcriptase อุณหภูมิและเวลาของการเกิดปฏิกิริยา reverse transcription คือ 45°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้ cDNA ที่ได้เป็น cDNA ต้นแบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ โดยปฏิกิริยา

พีซีอาร์มีปริมาตรรวมทั้งหมด 50 µL ประกอบด้วย 2x MyTaqTM HS Red Mix (Bioline, U.S.A.) 25 µL ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) อย่างละ 20 µM และ cDNA ต้นแบบ 200 ng อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที 57°C เป็นเวลา 30 วินาที ต่อด้วย 72°C เป็นเวลา 15 วินาที จำนวนทั้งหมด 30 รอบ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้นำมาตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

4) การทดสอบการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีด้วยวิธี Fluorogenic TaqMan Real-time RT-PCR

สารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีมาตรฐานถูกนำมาทดสอบความสามารถในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีโดยวิธี singleplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR ด้วยชุด Thunderbird[®] Probe One-step qRT-PCR kit (TOYOBO, Japan) ร่วมกับไพรเมอร์และโพรบที่ได้ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ และโพรบที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ สำหรับปฏิกิริยาในปริมาตรรวมทั้งหมด 20 µL ประกอบด้วย 2x reaction buffer ปริมาตร 10 µL เอนไซม์ DNA polymerase 0.5 ยูนิต (U) เอนไซม์ RT enzyme

mix 0.5 ยูนิต ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและไพรเมอร์รีเวิร์ส อย่างละ 0.5 μM โพรบ 0.2 μM และสารพันธุกรรมของไวรัสแดงที่มาตรฐาน 100 ng โดยอุณหภูมิและเวลาของการเกิดปฏิกิริยา reverse transcription คือ 50°C เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที และ 58°C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต real-time PCR ที่เกิดขึ้นโดยวัดการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากตัว reporter ในโพรบด้วยเครื่อง Real-time PCR CFX96TM (Biorad, U.S.A.) โดยกำหนด baseline ของการอ่านผล amplification curve เท่ากับ 300 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

นอกจากนี้ยังได้นำไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อไวรัสแดงแต่ละซีโรไทป์มาผสมรวมในปฏิกิริยาเดียวกัน แล้วนำมาทดสอบความจำเพาะโดยวิธี multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR กับสารพันธุกรรมของไวรัสแดงแต่ละซีโรไทป์

5) การเปรียบเทียบวิธี In-house Multiplex Fluorogenic TaqMan Real-time RT-PCR กับชุดตรวจ AmpliSens[®] Dengue Virus Type-FRT PCR Kit ในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสแดง

สารพันธุกรรมของไวรัสแดงแต่ละซีโรไทป์ 100 ng ถูกนำมาตรวจไวรัสแดงและจำแนกซีโรไทป์โดยวิธี multiplex RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น (in-house fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR) ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ได้ออกแบบมา (Table 1 และ 2) แล้วนำผลการตรวจมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลตรวจโดยใช้ชุดน้ำยา AmpliSens[®]

Dengue virus type-FRT PCR kit (Ecoli s.r.o., Slovakia) ซึ่งมีรายละเอียดวิธีการทดสอบดังนี้ ปฏิกิริยาปริมาตรรวมทั้งหมด 25 μL ประกอบด้วย reaction buffer 12.5 μL เอนไซม์ DNA polymerase 0.5 ยูนิต เอนไซม์ TM-RT enzyme mix 0.5 ยูนิต ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและไพรเมอร์รีเวิร์สอย่างละ 0.5 μM โพรบ 0.2 μM และสารพันธุกรรมของไวรัสแดงที่มาตรฐาน 100 ng โดยอุณหภูมิและเวลาของการเกิดปฏิกิริยา reverse transcription คือ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยอุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที 54 °C เป็นเวลา 35 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต real-time PCR ที่เกิดขึ้นโดยวัดการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ชนิด FAM, JOE, ROX และ Cy5 จากตัว reporter ในโพรบที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสแดงที่ซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ด้วยเครื่อง Real-time PCR CFX96TM (Biorad, U.S.A.) โดยกำหนด baseline ของการอ่านผล amplification curve เท่ากับ 300 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับ negative control ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

ผลการวิจัย

1) การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการนำสารพันธุกรรมของไวรัสแดงที่มาตรฐานแต่ละซีโรไทป์มาทำปฏิกิริยา reverse transcription เป็น cDNA แล้วนำมาเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสแดงแต่ละซีโรไทป์ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

พบว่าผลิตภัณฑ์ซีอาร์จากการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 มีขนาด 149, 126, 217 และ 154 bp ตามลำดับ (Fig. 1A) ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่คาดไว้จากการออกแบบไพรเมอร์ (Table 1) และพบว่าผลิตภัณฑ์ซีอาร์จากการทำ

ปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์กับสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีมาตรฐานทุกซีโรไทป์มีขนาดของผลิตภัณฑ์ซีอาร์เท่ากับ 190 bp (Fig. 1B) ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่คาดไว้จากการออกแบบไพรเมอร์เช่นเดียวกัน (Table 1)

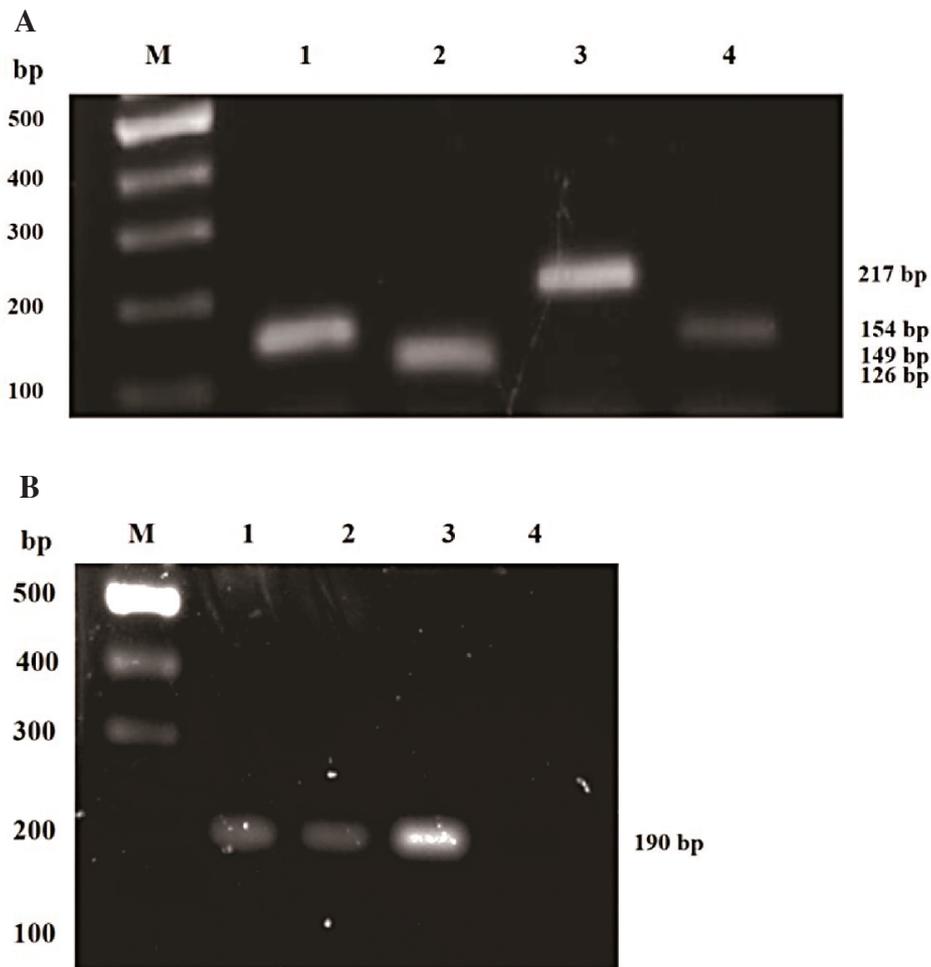


Fig. 1 EtBr stained agarose gel of PCR products amplified from specific primers for dengue serotype 1, 2, 3 and 4 subsequently. (A) Lane M, 100 bp DNA marker (Elpis-Biotech, Korea), lane 1, DEN-1 PCR product, 149 bp, lane 2, DEN-2 PCR product, 126 bp, lane 3, DEN-3 PCR product, 217 bp, lane 4, DEN-4 PCR product, 154 bp. EtBr stained agarose gel of PCR products amplified from specific primers for all four dengue serotypes. (B) Lane M, 100 bp DNA marker, lane 1-4, DEN-1 to 4 PCR products, 190 bp.

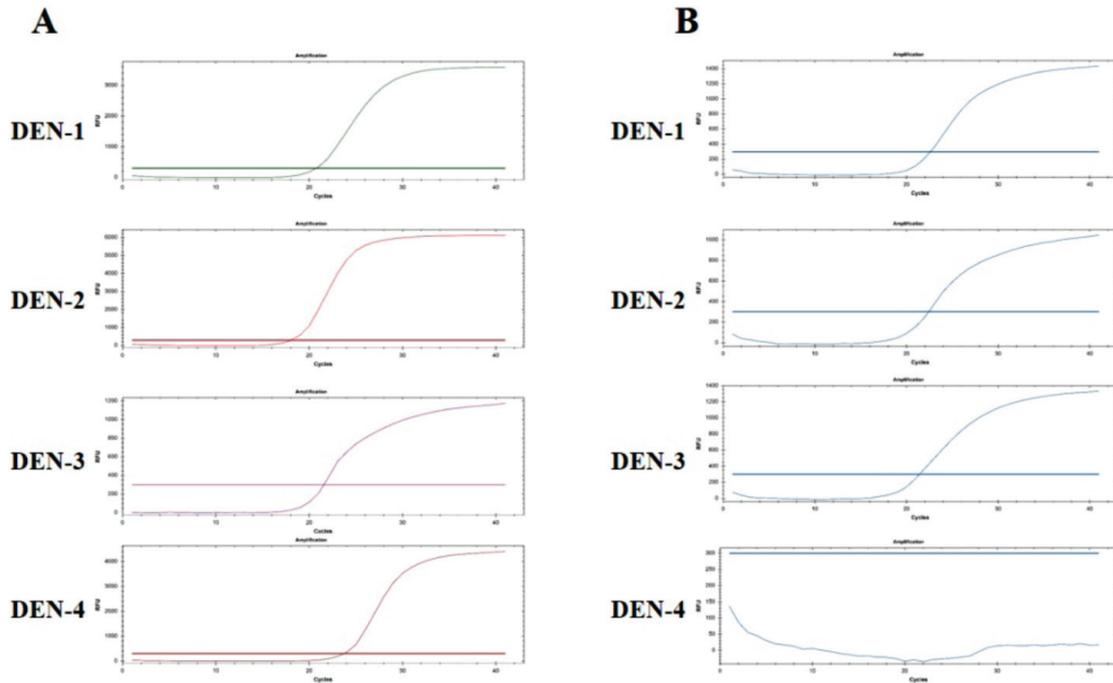


Fig. 2 Amplification curve of fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR for dengue viral RNA with designed primers and probes. The y-axis represents the emission of fluorophore in RFU unit. The X-axis represents the number of PCR cycles. Baseline of amplification curve is set at 300. (A) Detection of DENV-1 to 4 viral RNA with designed primers specific for each serotype of dengue virus; (B) Detection of DENV-1 to 4 viral RNA with designed primers specific for all four serotypes of dengue virus.

2) การตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี โดยการทดสอบด้วยวิธี Fluorogenic TaqMan Real-time RT-PCR

การทดสอบวิธี Fluorogenic TaqMan Real-time RT-PCR ในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบมาทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีมาตรฐานแต่ละซีโรไทป์ พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของ HEX, Texas Red, Cy5 และ Cy5.5 ในหลอดที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ (Fig. 2A) ซึ่งสอดคล้องกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ติดอยู่กับ

โพรบที่มีความจำเพาะกับไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ (Table 2) ส่วนไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ เมื่อทดสอบกับสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2, 3 และ 4 พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของ FAM จากโพรบในหลอดที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2 และ 3 แต่ไม่พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของ FAM จากโพรบในหลอดที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 (Fig. 2B)

นอกจากนี้ ได้นำไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ทั้งหมดมารวมกัน ก่อนนำไปทดสอบความจำเพาะกับสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีมาตรฐาน

แต่ละซีโรไทป์ พบว่าในตัวอย่างที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2 และ 3 สามารถตรวจพบสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ HEX, Texas Red และ Cy5 ตามลำดับ (Fig. 3) ซึ่งสอดคล้องกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดอยู่กับโพรบที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ นอกจากนี้ทั้ง 3 ตัวอย่าง ยังสามารถพบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ FAM ซึ่งเป็นสารเรืองแสง

ที่ติดกับโพรบที่ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ อย่างไรก็ตาม ในตัวอย่างที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 พบเพียงสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ Cy5.5 ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ติดกับโพรบที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 เท่านั้น แต่ไม่พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ FAM ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ติดอยู่กับโพรบที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ (Fig. 3)

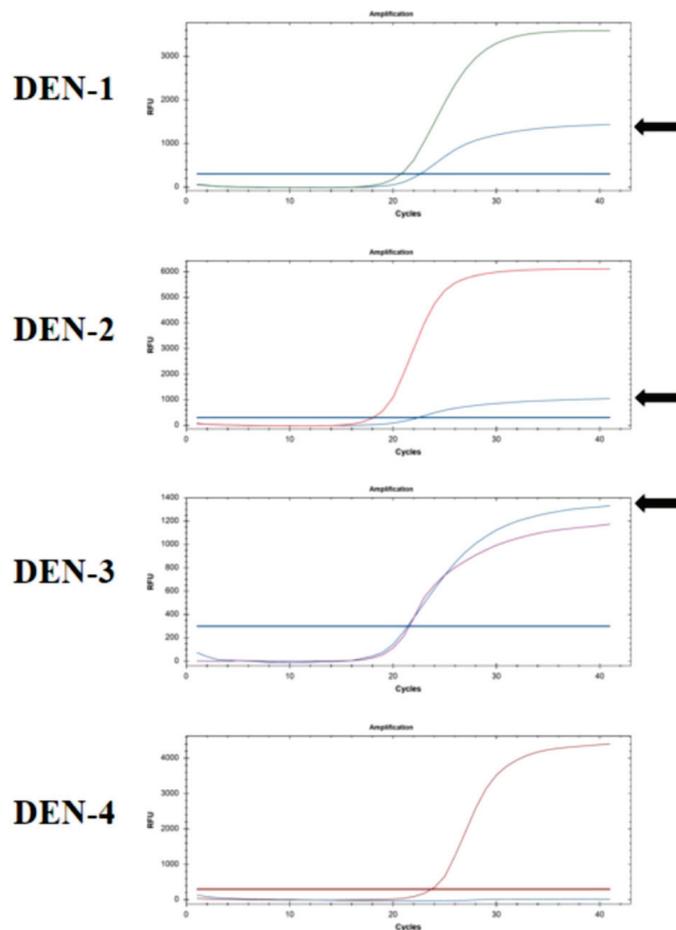


Fig. 3 Amplification curve of in-house multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR with designed serotype-specific and all four serotype specific primers and probes for distinguishing each serotype of dengue virus. The y-axis represents the emission of fluorophore in RFU unit. The X-axis represents the number of PCR cycles. Baseline of amplification curve is set at 300. Arrow indicates fluorescent signal of a probe specific for all serotypes of dengue virus.

3) การเปรียบเทียบวิธี In-house Multiplex Fluorogenic TaqMan Real-time RT-PCR กับชุดตรวจ AmpliSens® Dengue Virus Type-FRT PCR Kit ในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี

ผลการเปรียบเทียบวิธี In-house multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR กับชุดตรวจ AmpliSens® Dengue Virus Type-FRT

PCR Kit ในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี พบว่าปฏิกิริยาที่ตรวจโดยวิธี In-house multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR มีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ที่สอดคล้องกับผลการตรวจโดยใช้ชุดตรวจ AmpliSens® Dengue virus type-FRT PCR Kit เมื่อตรวจกับสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรไทป์ (Fig. 4)

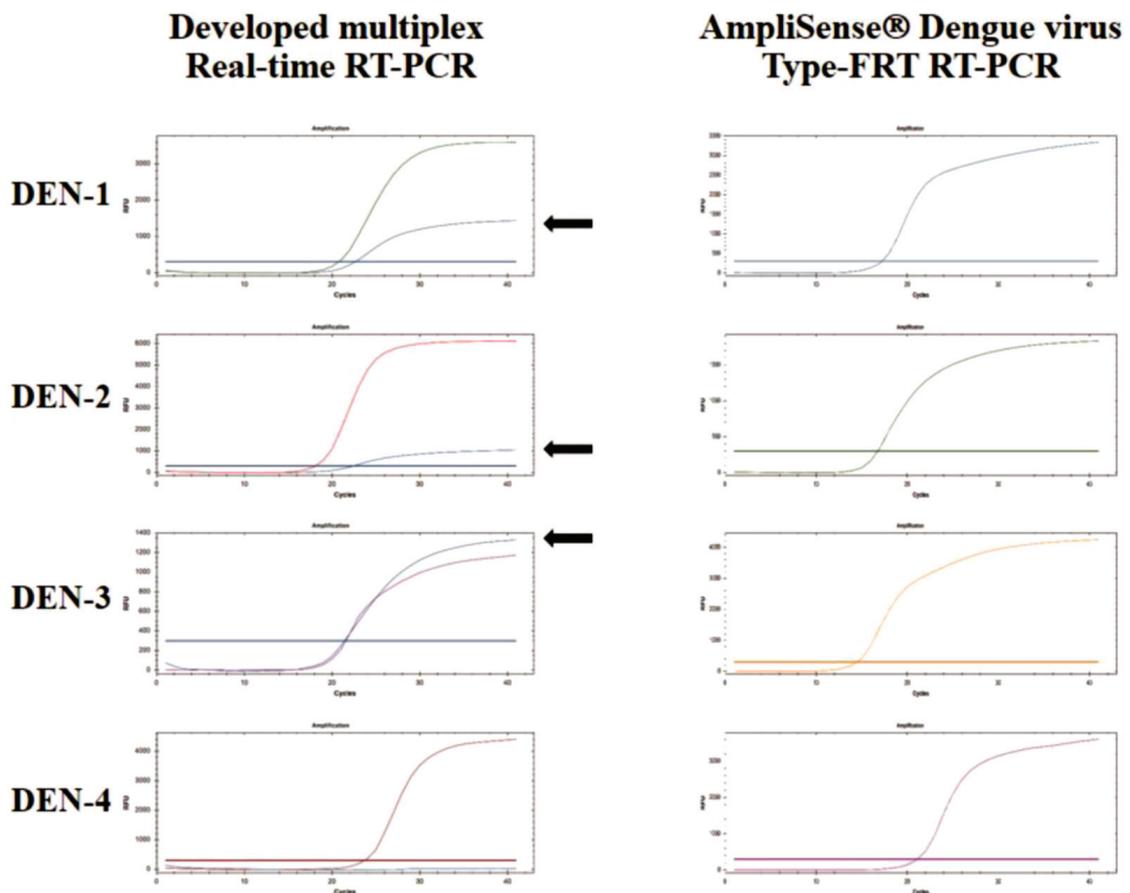


Fig. 4 Comparison of in-house multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR with AmpliSens® Dengue virus type-FRT PCR kit for detection and serotype identification of dengue virus. The y-axis represents the emission of fluorophore in RFU unit. The X-axis represents the number of PCR cycles. Baseline of amplification curve is set at 300. Arrow indicates fluorescent signal of a probe specific for all serotypes of dengue virus.

วิจารณ์

จากผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ออกแบบโดยเทคนิค RT-PCR พบว่าไพรเมอร์ 4 คู่ ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ให้ผลิตผลพีซีอาร์ที่มีขนาดตามที่คาดการณ์ไว้ ส่วนไพรเมอร์อีกหนึ่งคู่ที่ได้ออกแบบให้จำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ พบว่าหลังจากนำไพรเมอร์คู่ดังกล่าวมาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าได้ผลิตผลพีซีอาร์ของไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ที่มีขนาดเท่ากัน แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบทั้ง 5 คู่ น่าจะมีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกี

ในการทดสอบความจำเพาะของโพรบ ที่ได้ออกแบบไว้ทั้งหมด 5 เส้น พบว่าโพรบ 4 เส้นมีความสามารถในการตรวจไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ โดยเมื่อได้ทดสอบความจำเพาะของโพรบแต่ละเส้นร่วมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค fluorogenic TaqMan Real-time RT-PCR สามารถตรวจพบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบในความยาวคลื่นต่าง ๆ ตรงกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดอยู่กับโพรบแต่ละเส้น แสดงว่าไพรเมอร์และโพรบที่ได้ออกแบบไว้มีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์จริง

อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพของสารพันธุกรรมที่ได้จากขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากไวรัสเดงกีและใช้ในการควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา real-time RT-PCR ว่ามีตัวยับยั้งที่ปนเปื้อนจากขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมหรือไม่ พบว่าสามารถตรวจพบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบได้ในหลอดที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1, 2 และ 3 แต่ไม่พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

ของโพรบในหลอดที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากโพรบดังกล่าวไม่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 เนื่องจากผลการทำ RT-PCR พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ ซึ่งปัญหาดังกล่าวมักเกิดกับการตรวจไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ เนื่องจากมีความแปรปรวนของสารพันธุกรรมสูง⁽¹²⁾ จึงเป็นไปได้ว่าโพรบที่ออกแบบไว้ไม่สามารถจับกับผลิตผลพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรบ พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ไม่มีการจับกันระหว่างโพรบกับผลิตผลพีซีอาร์ ทำให้ไม่พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบ เมื่อตรวจสอบกับไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 ซึ่งคาดว่าควรใช้ degenerate probe เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

แม้ผลการทำ RT-PCR พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีทุกซีโรไทป์ แต่จาก Fig. 1B แสดงให้เห็นว่าผลิตผลพีซีอาร์ของไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 มีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลพีซีอาร์จากไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่น ซึ่งอาจเกิดจากไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 ต่ำกว่าไวรัสเดงกีซีโรไทป์อื่น จึงน่าจะเป็นไปได้ที่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการที่ไม่สามารถตรวจพบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบในหลอดที่มีสารพันธุกรรมไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 4 ดังนั้น คาดว่าควรมีการปรับสถานะการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้เหมาะสมเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

เมื่อนำการทดสอบ multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR ที่ได้พัฒนา มาตรวจและจำแนกชนิดของไวรัสเดงกีเปรียบเทียบกับผลการทดสอบกับชุดตรวจทางการค้า AmpliSens® Dengue virus type-FRT PCR Kit พบว่าให้ผลการ

ตรวจที่สอดคล้องกัน แสดงว่าการทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้น่าจะมีประสิทธิภาพในการตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้วิธีการทดสอบดังกล่าวตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสในตระกูล Flavivirus อื่นๆ อาทิ ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี ไวรัสเวสต์ไนล์ หรือไวรัสชิคุนกุนยา เพื่อทดสอบความจำเพาะและความไวของวิธีนี้ นอกจากนี้ยังควรต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยนำวิธีที่พัฒนาไปตรวจตัวอย่างอื่นๆ เช่น เลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี หรือยุงลายที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นต้น

สรุป

การทดสอบ one-step multiplex fluorogenic TaqMan real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจและจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีได้ อย่างไรก็ตาม ควรนำไปทดสอบความจำเพาะกับไวรัสตระกูล Flavivirus อื่นๆ เพิ่มเติม รวมทั้งนำไปศึกษาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี หรือยุงลายที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2559 ของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

- Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology* 2013; 5: 299-309.
- Tewari SC, Thenmozhi V, Katholi CR, Manavalan R, Munirathinam A, Gajanana A. Dengue vector prevalence and virus infection in a rural area in south India. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 2004; 9: 499-507.
- Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008; 371: 500-9.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *The New England journal of medicine* 2012; 366: 1423-32.
- WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012-2020. Geneva: WHO; 2012.
- Knudsen AB, Slooff R. Vector-borne disease problems in rapid urbanization: new approaches to vector control. *Bulletin of the World Health Organization*. 1992; 70: 1-6.
- Rosen L, Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1974; 23: 1153-60.
- Ilkal MA, Dhanda V, Hassan MM, *et al.* Entomological investigations during outbreaks of dengue fever in certain villages in Maharashtra state. *The Indian journal of medical research* 1991; 93: 174-8.
- Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1996; 3: 621-7.

10. De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 2004; 8: 390-8.
11. Conceicao TM, Da Poian AT, Sorgine MH. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *Journal of virological methods* 2010; 163: 1-9.
12. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44: 1295-304.