วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 24 ฉบับที่ 5 กันยายน - ตุลาคม 2558

Journal of Health Science
Vol. 24 No. 5, September - October 2015

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การตรวจเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้สมองอักเสบจากไวรัส พ.ศ.2550-2556

สุมาลี ชะนะมา วท.บ., วท.ม.*
ศิริรัตน์ แนมขุนทด วท.บ., วท.ม.*
สุรภี อนันตปรีชา วท.บ.*
อารีรัตน์ สง่าแสง วท.บ., วท.ม., ปร.ด.*
Ichiro Kurane, M.D., Ph.D.**
สมชาย แสงกิจพร พ.บ., ป.ชั้นสูง, ว.ว.*
** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*
*** National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan*

บทคัดย่อ เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile virus, WNV) จัดอยู่ใน Flaviviridae family ติดต่อสู่คนโดยมียุงรำคาญ (*Culex sp.*) เป็นพาหะนำโรค ส่วนใหญ่ผู้ติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ไม่แสดงอาการ ผู้ป่วยน้อย กว่าร้อยละ 1.0 แสดงอาการรุนแรง เนื่องจากเชื้อแพร่กระจายเข้าสู่สมอง ได้แก่อาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบ ไขสันหลังอักเสบ และเสียชีวิตได้ มีอัตราป่วยตายร้อยละ 4.0-14.0 ตามข้อกำหนดของกฎอนามัยระหว่างประเทศ พ.ศ. 2548 (IHR 2005) โรคติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์เป็นโรคที่ต้องแจ้งเหตุการณ์ระบาดแก่องค์การอนามัยโลก การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบสถานการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในประเทศไทย จึงได้สำรวจหาการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์โดยคัดเลือกตัวอย่างน้ำไขสันหลังและซีรั่มที่เก็บภายใน 5 วันหลังเริ่มป่วยของผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้สมองอักเสบที่ส่งตรวจหาสาเหตุการติดเชื้อไวรัสก่อโรคที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขในช่วงปี พ.ศ. 2550-2556 โดยเป็นน้ำไขสันหลัง 368 ตัวอย่าง และซีรั่ม 478 ตัวอย่าง นำมาสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์และตรวจสารพันธุกรรมของไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยวิธี RT-PCR จำนวน 245 ตัวอย่าง และวิธี Real-time RT-PCR จำนวน 601 ตัวอย่าง ผลการตรวจได้ผลลบทั้งหมด 846 ตัวอย่าง การตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสเวสต์ไนล์ชนิด IgM และ IgG ทั้งวิธี ELISA และ Indirect immuno-fluorescence test พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสเจอีและเดงกี ผลการศึกษาสรุปว่าไม่พบการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่างของผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้สมองอักเสบในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2550-2556

คำสำคัญ: **ไวรัสเวสต์ไนล์, ไข้สมองอักเสบจากไวรัส, อาร์ที-พีซีอาร์, เรียลไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์**

บทนำ

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile virus, WNV) จัดอยู่ใน Flaviviridae family และ Flavivirus genus เช่นเดียวกับไวรัสเจอี (Japanese encephalitis virus, JEV) และไวรัสเดงกี (Dengue virus) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศยูกันดาเมื่อปี พ.ศ. 2480 ต่อมาเกิดการระบาดอย่างต่อเนื่องทั่วทวีปแอฟริกา เอเชีย ยุโรปกลาง และตะวันออก

ในปีพ.ศ. 2542 พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์เป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาที่กรุงนิวยอร์ค และแพร่กระจายไปทั่วทั้งทวีปอเมริกาเหนือ มีการระบาดครั้งใหญ่ในปี พ.ศ. 2555 พบผู้ป่วยจาก 48 รัฐของสหรัฐอเมริการวม 5,674 ราย เสียชีวิต 286 ราย[1] ตามข้อกำหนดของกฎอนามัยระหว่างประเทศ พ.ศ. 2548 (IHR 2005) กำหนดให้โรคติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์เป็นโรคที่ต้องแจ้งเหตุการณ์ระบาดต่อองค์การอนามัยโลก เนื่องจากอาจเกิดผลกระทบด้านสาธารณสุขที่รุนแรง และแพร่กระจายระหว่างประเทศได้[2]

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ติดต่อมาสู่คนโดยมียุงรำคาญ (*Culex sp.*) เป็นพาหะนำโรค แหล่งรังโรคที่สำคัญคือ นก อย่างไรก็ตามมีรายงานพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดได้แก่ นก ค้างคาว สุนัข แมว กระรอก กระต่ายและม้า ผู้ติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการ ส่วนน้อยแสดงอาการไม่รุนแรงได้แก่ มีไข้ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ มีผื่นตามผิวหนัง ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ ผู้ติดเชื้อน้อยกว่าร้อยละ 1.0 แสดงอาการรุนแรงเนื่องจากเชื้อแพร่กระจายเข้าสู่สมองจะมีอาการปวดศีรษะมาก ไข้สูง คอแข็ง มึนงง เสียความรู้สึกตัว ชัก เป็นอัมพาต เยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบ ไขสันหลังอักเสบ และเสียชีวิตได้ มีอัตราป่วยตายร้อยละ 4.0-14.0[3] ปัจจุบันมีวัคซีนป้องกันโรคสำหรับม้าเท่านั้น ยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันโรคในมนุษย์ ไม่มีการรักษาจำเพาะเป็นเพียงการรักษาตามอาการเท่านั้น การวินิจฉัยโรคนิยมใช้การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสร่วมกับการตรวจแอนติบอดีชนิด IgM ในตัวอย่างซีรั่มและน้ำไขสันหลัง สำหรับประเทศไทยยังไม่พบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ แต่มีปัจจัยเสี่ยงที่เชื้อจะแพร่กระจายได้เนื่องจากมียุงรำคาญที่เป็นพาหะนำโรคอยู่ทั่วไป มีนกหลายชนิดบินอพยพจากประเทศที่มีอากาศหนาวเย็นมาอยู่ในเขตอบอุ่นของประเทศไทยเป็นประจำทุกปี และการคมนาคมที่สะดวกรวดเร็ว มีประชาชนเดินทางข้ามประเทศมากมาย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีหน้าที่รับผิดชอบในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบเจอี โดยได้รับตัวอย่างซีรั่มและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่แสดงอาการไข้สมองอักเสบจากทั่วประเทศ ประมาณปีละ 500 ราย โดยพบผลบวกต่อไวรัสเจอีประมาณร้อยละ 20.0 ผลบวกต่อไวรัสเดงกีร้อยละ 1.0-2.0 ผลบวกต่อเชื้อฟลาวิไวรัสประมาณร้อยละ 6.0 ผลลบต่อไวรัสเจอีประมาณร้อยละ 20.0 สรุปผลไม่ได้ (ไม่ทราบสาเหตุเชื้อก่อโรค) มากกว่าร้อยละ 50.0 ในจำนวนนี้อาจมีสาเหตุป่วยจากไวรัสเวสต์ไนล์ ในการนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่างผู้ป่วยอาการไข้สมองอักเสบ ด้วยวิธี RT-PCR และ/หรือ real-time RT-PCR ในช่วงปี พ.ศ. 2550-2556 เพื่อได้ข้อมูลสาเหตุการเกิดโรคไข้สมองอักเสบเพิ่มขึ้น เพื่อประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา อีกทั้งเป็นการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขให้มีความพร้อมในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์รองรับการปฏิบัติตามกฎอนามัยระหว่างประเทศ พ.ศ. 2548 (IHR 2005)

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างตรวจสารพันธุกรรมคัดเลือกตัวอย่างน้ำไขสันหลังและซีรั่มจากผู้ป่วยไข้สมองอักเสบที่ส่งมาตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ในช่วงปี พ.ศ. 2550-2556 โดยเลือกตัวอย่างที่เก็บภายใน 5 วันหลังวันเริ่มป่วย นำตัวอย่างน้ำไขสันหลังและน้ำเหลือง 100 ไมโครลิตรมาสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยชุดสกัด QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) ได้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 40 ไมโครลิตร

สารควบคุม

สารควบคุมลบสำหรับการตรวจวิธี RT-PCR และ Real-time RT-PCR เป็นอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากซีรั่มคนปกติ ปราศจากเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์และไวรัสอื่น ๆ (Equitech Enterprises Inc., TX, USA)

สารควบคุมบวกสำหรับการตรวจวิธี RT-PCR เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งประกอบด้วยชิ้นยีนของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ส่วน envelope และ NS 3 สารควบคุมบวกนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Ichiro Kurane สถาบัน National Institute of Infectious Diseases (NIID) ประเทศญี่ปุ่น

สารควบคุมบวกสำหรับการตรวจวิธี Real-time RT-PCR ได้จากการผลิตอาร์เอ็นเอของไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยวิธียีนโคลนนิ่ง (gene cloning) ด้วยชุดน้ำยา TOPO TA Cloning (Invitrogen Inc., CA, USA) โดยเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วน capsid ของไวรัสเวสต์ไนล์ขนาด 75 bp กับพลาสมิด pCR2.1-TOPO (Invitrogen Inc., CA, USA) จากนั้นทำ transformation เข้าเซลล์แบคทีเรีย TOP10 แล้วสกัดดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้ นำมาทำเป็นอาร์เอ็นเอด้วยชุดน้ำยา *In vitro* transcription Maxiscript (Ambion Inc., TXs, USA) สุดท้ายวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., DE, USA)

วิธีการตรวจ

การตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยวิธี RT-PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรมาตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยวิธี RT-PCR ตามวิธีของ Kurane I สถาบัน National Institute of Infectious Diseases (NIID) ประเทศญี่ปุ่น[4] โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 2 ชุดเพื่อตรวจจับยีนส่วน envelope (E) และ nonstructural 3 (NS3) รายละเอียดไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1 ใช้ชุดน้ำยา SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Inc., CA, USA) และใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Bio-Rad Inc., CA, USA) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสี ethidium bromide ถ่ายรูปเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูขนาดของ specific band เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas Inc., Ontario, Canada) ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์โดยเพิ่มไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน β-actin ในทุกตัวอย่างตรวจ

การตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์วิธี Real-time RT-PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตรมาตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ตามวิธีของ Shirato K และคณะ, 2005[5] ใช้น้ำยา TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems, CA, USA) รายละเอียดของไพรเมอร์และโพรบ (probe) แสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดไพรเมอร์ และโพรบสำหรับการตรวจวิธี RT-PCR และ real-time RT-PCR

วิธี	ชื่อไพรเมอร์/โพรบ	ลำดับเบส 5'-3'	ยีนเป้าหมาย	ขนาดของ PCR product
RT-PCR	WNY514	CGG CGC CTT CAT ACA CW	E	408 bp
RT-PCR	WNY904	GCC TTT GAA CAG ACG CCA TA	E	
RT-PCR	FlaU5004	GGA ACD TCM GGH TCN CCH AT	NS3	471 bp
RT-PCR	FlaU5457	GTG AAR TGD GCY TCR TCC AT	NS3	
Real-time RT-PCR	WN_F primer	GCA CGA AGA TCT CGA TGT CTA AG	Capsid	96 bp
Real-time RT-PCR	WN_R primer	ATT CCG CGT TTT AGC ATA TTG AC	Capsid	
Real-time RT-PCR	WN_JE probe	(FAM) ACC AGG AGG GCC CGG (MGB NFQ)	Capsid	

โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง ABI7500 (Applied Biosystems, CA, USA) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผล โดยตัดสินเป็นผลบวกเมื่อพบค่า Cycle threshold (CT) น้อยกว่า 40 และค่า delta RN มากกว่า 0.5

ผลการศึกษา

ผลการตรวจตัวอย่างของผู้ป่วยไข้สมองอักเสบด้วยวิธี RT-PCR จำนวน 245 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ.2550 ถึงมิถุนายน พ.ศ.2553 โดยเป็นน้ำไขสันหลังและน้ำเหลือง จำนวน 47 และ 198 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบเป็นผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 2) ในขณะที่สารควบคุมบวกพบ specific band ของยีน E และ NS3 ขนาด 408 และ 471 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และ 2) ผลการตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR ซึ่งเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนสิงหาคม 2553 ถึงพฤษภาคม 2556 จำนวน 601 ตัวอย่าง โดยเป็นน้ำไขสันหลังและน้ำเหลือง จำนวน 321 และ 280 ตัวอย่างตามลำดับ พบผลลบทั้งหมด สารควบคุมบวกให้ผลบวกดังภาพที่ 3

นอกจากนี้ยังได้ตรวจแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อไวรัสเวสต์ไนล์ ด้วยวิธี ELISA และวิธี Indirect immuno-fluorescence test ผลการตรวจโดยวิธี ELISA

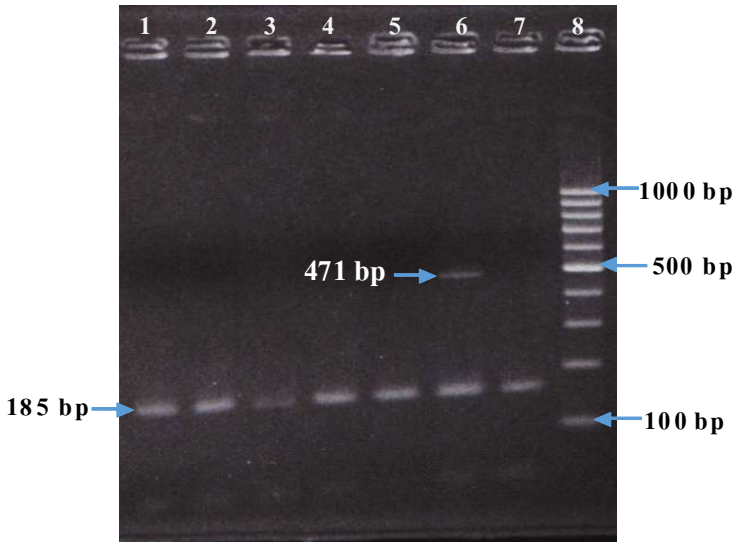
ตารางที่ 2 ผลตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์ (846 ตัวอย่าง)

พ.ศ.	วิธี	จำนวนตัวอย่าง			ผลการตรวจ	
		น้ำไขสันหลัง	น้ำเหลือง	รวม	ผลบวก	ผลลบ
2550-2553	RT-PCR	47	198	245	0	245
2553-2556	Real-time RT-PCR	321	280	601	0	601

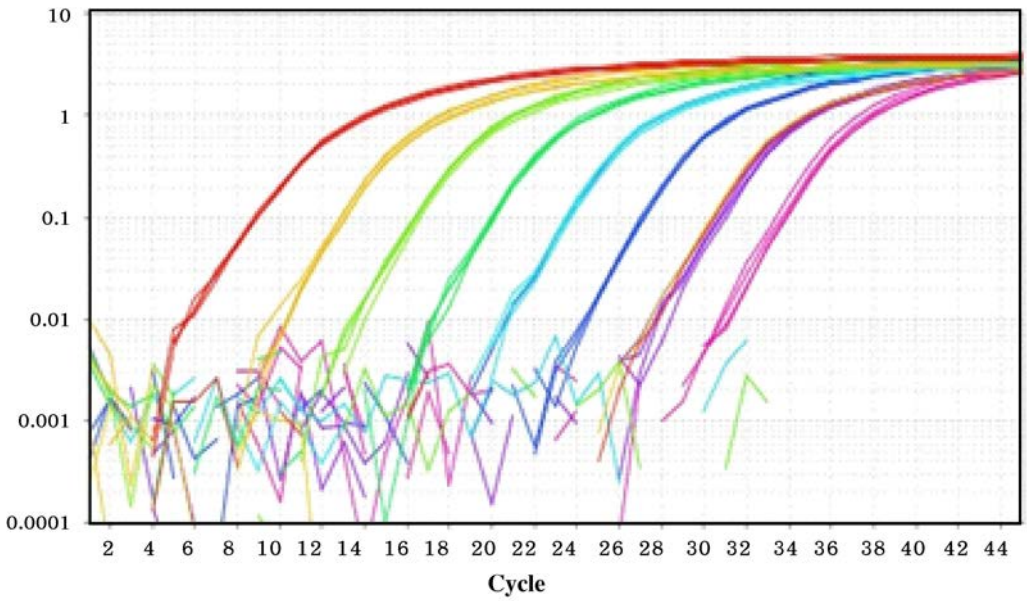
ภาพที่ 1 ผลตรวจไวรัสเวสต์ไนล์ยีนส่วน E วิธี RT-PCR แสดง specific band ขนาด 408 bp ของไวรัสเวสต์ไนล์ในช่อง 2 และขนาด 185 bp ของยีน β-actin; ช่อง 1 = 100 bp DNA marker ช่อง 2 = สารควบคุมบวก ช่อง 3 = สารควบคุมลบ ช่อง 4-8 = ตัวอย่างตรวจ

ด้วยชุดน้ำยา West Nile IgM Capture ELISA และ West Nile virus IgG Indirect ELISA (Inverness Medical Innovation Australia Pty. Ltd., QLD, Australia) จำนวน 300 ตัวอย่าง พบผลบวก IgM และ IgG จำนวน 74 และ 84 ตัวอย่างตามลำดับ ส่วนผลการตรวจโดยวิธี Indirect immuno-fluorescence test (EUROIMMUN, Luebeck, Germany) จำนวน 44 ตัวอย่างพบผลบวก IgM และ IgG จำนวน 1 ตัวอย่างและ 20 ตัวอย่างตามลำดับ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเวสต์ไนล์ทั้งชนิด IgM และ IgG เหล่านี้พบว่าเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจไวรัส-เจอีและไวรัสเดงกีด้วย

ภาพที่ 2 ผลตรวจไวรัสเวสต์ไนล์ยีนส่วน NS3 วิธี RT-PCR แสดง specific band ขนาด 471 bp ของไวรัสเวสต์ไนล์ในช่อง 6 และขนาด 185 bp ของยีน β-actin; ช่อง 1-5 = ตัวอย่างตรวจ ช่อง 6 = สารควบคุมบวก ช่อง 7 = สารควบคุมลบ ช่อง 8 = 100 bp DNA marker



ภาพที่ 3 ผลตรวจไวรัสเวสต์ไนล์วิธี Real-time RT-PCR ของอาร์เอ็นเอคอนโทรลที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-8} เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา แกนตั้งแสดงค่า DRN แกนนอนแสดง cycle



วิจารณ์

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงชีวภาพระดับ 3 ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องทำในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิดอันตราย ในการศึกษาครั้งนี้จึงผลิตสารควบคุมบวกโดยวิธียีนโคลนนิ่ง นำชิ้นส่วนยีนของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ใส่เข้าในพลาสมิดและผ่านขั้นตอน *In vitro* transcription เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นอาร์เอ็นเอเหมือนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้กับเชื้ออื่นๆ ได้เช่นเดียวกัน การตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์ในปัจจุบันมีการพัฒนาใช้วิธี Real-time RT-PCR มากขึ้นตามลำดับทั้งการตรวจตัวอย่าง[6-11] เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบวิธี RT-PCR กับวิธี Real-time RT-PCR พบว่าวิธี Real-time RT-PCR มีความไวสูงกว่า ใช้เวลาตรวจและโอกาสเกิดการปนเปื้อนน้อยกว่า และสามารถตรวจสอบผลการตรวจจากหน้าจอคอมพิวเตอร์ได้ทันทีหลังจบขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือและน้ำยาตรวจที่มีราคาสูงกว่ามาก การศึกษานี้พบว่าวิธี Real-time RT-PCR สามารถตรวจสารควบคุมบวกได้ตั้งแต่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-9} ปริมาณสารควบคุมบวกที่น้อยที่สุดที่ตรวจได้เทียบเท่ากับ 36 โมเลกุลต่อไมโครลิตร ซึ่งน่าจะเป็นปริมาณสูงกว่าการศึกษาของ Shirato K และคณะ[5] ซึ่งใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดเดียวกัน ที่สามารถตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์ได้ปริมาณน้อยที่สุดคือ 0.1 PFU ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถเปรียบเทียบเป็นหน่วยโมเลกุลของไวรัสได้โดยตรง ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความแตกต่างของน้ำยา และเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ สำหรับวิธี RT-PCR ไม่ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารควบคุมที่น้อยที่สุดที่ตรวจได้ เนื่องจากสารควบคุมบวกที่ได้รับจากสถาบัน NIID ประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณจำกัด อย่างไรก็ตามผลลบที่ตรวจพบโดยวิธี RT-PCR ไม่ใช่ผลลบปลอม เนื่องจากมีการควบคุมคุณภาพ การตรวจวิเคราะห์โดยเพิ่มไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน β-actin ในทุกตัวอย่างตรวจได้ specific band ขนาด 185 bp แสดงในภาพที่ 1 และ 2

ผลการตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์ พบผลลบในตัวอย่างผู้ป่วยทั้งหมด 846 ตัวอย่าง สอดคล้องกับรายงานการตรวจที่ไม่พบแอนติเจนไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่างยุงรำคาญ นก และม้า ของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ.2548-2549[12] เช่นเดียวกับในปี พ.ศ.2551-2553 ที่มีผู้วิจัยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่างยุงที่เก็บจากจังหวัดนครปฐมและเพชรบุรี[13] สำหรับการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ทั้งวิธี ELISA และ Indirect immuno-fluorescence test พบว่ามีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อไวรัสเจอีและเดงกี ไม่สามารถใช้ตรวจยืนยันการติดเชื้อได้ สอดคล้องกับรายงานที่พบผลบวกร้อยละ 6.0 ของแอนติบอดีต่อไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่างเลือดม้าที่จังหวัดกาญจนบุรี[12] ซึ่งไม่สามารถยืนยันได้ว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์จริงหรือไม่ การตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จำเป็นต้องตรวจยืนยันต่อด้วยวิธี Plaque reduction neutralization (PRNT)[14-15] การตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่เป็นที่ยอมรับในขณะนี้คือ การตรวจสารพันธุกรรม ซึ่งถ้าพบผลบวกจึงตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมเปรียบเทียบกับตัวเชื้อต่อไป อย่างไรก็ตามการตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสเวสต์ไนล์ ทำให้มีความกังวลว่าอาจมีเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์แพร่กระจายในประเทศไทย รวมทั้งประเทศไทยมียุงรำคาญที่เป็นพาหะนำโรคชุกชุม จึงควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ทั้งในสัตว์ ยุง-พาหะและผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง

สรุป

ห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีศักยภาพในการตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์ เพื่อรองรับการใช้กฎอนามัยระหว่างประเทศ พ.ศ. 2548 (IHR 2005) การตรวจสารพันธุกรรมไวรัสเวสต์ไนล์จำนวน 846 ตัวอย่าง

ไม่พบการติดเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่างของผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้สมองอักเสบในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2550-2556 การตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสเวสต์ไนล์ทั้งวิธี ELISA และ Indirect immuno-fluorescence test พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสเจอีและเดงกี การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต์ไนล์ในผู้ป่วยจึงควรใช้วิธีตรวจสารพันธุกรรมร่วมกับการตรวจแอนติบอดี ซึ่งถ้าพบผลบวกจึงตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมและตรวจแอนติบอดีวิธี PRNT เพื่อยืนยันผลบวกต่อไป และถึงแม้ว่าไม่พบเหตุการณ์ระบาดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในประเทศไทยในช่วงเวลาดังกล่าว ควรมีระบบเฝ้าระวังโรคทั้งในสัตว์ ยุงพาหะและผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณนางวลัยลักษณ์ สุขประเสริฐ สำหรับการตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสเวสต์ไนล์วิธี ELISA ขอบคุณนายภัทรวงษ์เจริญ ที่ช่วยตรวจแก้ไขบทคัดย่อภาษาอังกฤษ และขอบคุณนายเกรียงศักดิ์ ฤชุศาศวัต สำหรับการตรวจแก้นิพนธ์ต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. Centers for Diseases Control and Prevention. Final 2012 West Nile virus human infection in the United States [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 10]. Available from: http://www.cdc.gov/media/releases/2013/a0513-west-nile.html
2. World Health Organization. Annex 2: Decision instrument for the assessment and notification of events that may constitute a public health emergency of international concern. In: World Health Organization. International Health Regulations (2005). 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2008. p. 43.
3. Public Health Agency of Canada. Fact sheet: West Nile virus: pathogen safety data sheet-Infectious substances [Internet]. 2011 [cited 2015 Apr 10]. Available from: http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/wnv-vno-eng.php
4. Kurane I. Manuals for West Nile virus laboratory test (PCR). Tokyo: National Institute of Infectious Diseases; 2002.
5. Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I. Detection of West Nile virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. J Virol Methods 2005;126:119-25.
6. Laciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse Transcriptase-PCR assay. J Clin Microbiol 2000;38:4066-71.
7. Shi PY, Kauffman EB, Ren P, Felton A, Tai JH, Dupuis II AP, et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. J Clin Microbiol 2001;39:1264-71.
8. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. J Virol Methods 2007;146:355-8.
9. Chao DY, Davis BS, Chang GJ. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. J Clin Microbiol 2007;45:584-9.
10. Li-Jun S, Mao-Min L, Gang L, Cheng-Yao L, Jin-Gang Z. Establishment and evaluation of real-time PCR for for West Nile virus detection. Chin J Agric Biotechol 2009;6:55-9.
11. Eiden M, Vina-Rodriguez A, Hoffmann B, Ziegler U, Groschup MH. Two new real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile virus strains. J Vet Diagn Invest 2010;22:748-53.
12. สุวิช ธรรมปาโล, กอบกาญจน์ กาญจนโนภาศ, ณรงค์ นิทัศน์-พัฒนา, กษมะ กระต่ายทอง, อนุสรณ์ ภวภูตานันท์, เดชาธรวงศ์หิรัญ, และคณะ. West Nile virus surveillance project in Thailand. วารสารโรคติดต่อนำโดยแมลง 2007;4:12-9.

13. Kraingkrai W, Nuananong S, Rungroj J, Khongsak T, Thaweesak S. Detection of West Nile virus in mosquitoes in Nakhon-pathom and Phetchaburi Province, Thailand. Thai J Vet Med 2011;41:377-81.
14. Paramasivan R, Mishra AC, Mourya DT, West Nile virus: the Indian scenario. Indian J Med Res 2003;118:101-8.
15. Pezzotti P, Piovesan C, Barzon L, Cusinato R, Cattai M, Pacenti M, et al. Prevalence of IgM and IgG antibodies to West Nile virus among blood donors in an affected area of north-eastern Italy, summer 2009. Euro Surveill [Internet]. 2011 [cited 2015 Apr 10];16:pii=19814. Available from: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19814

Abstract: West Nile Viral Detection in Thai Patients with Viral Encephalitis during 2007-2013

Sumalee Chanama, B.Sc., M.Sc.*; Sirirat Naemkhunthot, B.Sc., M.Sc.*; Surapee Anantapreecha, B.Sc.*; Areerat Sa-ngasang, B.Sc., M.Sc., Ph.D.*; Ichiro Kurane, M.D., Ph.D.; Somchai Sangkitporn, M.D., Dipl. Board in Clinical Pathology***

** National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand; ** National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan*

Journal of Health Science 2015;24:967-74.

West Nile virus (WNV) is belonged to the Flaviviridae family. It was transmitted to humans through *Culex* mosquitoes. Humans infected with WNV are usually asymptomatic. Less than 1.0% of symptomatic patients develop severe neurological diseases including meningitis and encephalitis. The case fatality rate is 4.0-14.0%. According to the International Health Regulations 2005 (IHR), WNV infection is a disease that member states must report its outbreaks to the World Health Organization. The purpose of this study was to determine the WNV infection case in Thailand. We performed WNV detection in samples collected from viral encephalitis patients sending to National Institute of Health during 2007-2013. The samples were collected within 5 days after onset. The viral RNA was extracted from 368 CSF samples and 478 serum samples. The RT-PCR and Real-time RT-PCR in CSF were performed to detect WNV RNA from 245 and 601 samples, respectively. All 846 samples were negative. The detection of antibody either IgM or IgG against WNV by ELISA and indirect immuno-fluorescence test were shown the cross reaction with JEV and dengue antibodies. In conclusion, there was no evidence of WNV infection in Thailand during 2007 to 2013.

Key words: **West Nile virus, viral encephalitis, RT-PCR, real-time RT-PCR**