สัญญาเลขที่ RMU4980031

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้สิ่งส่งตรวจที่ไม่ปรกติธรรมดา ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกี

ผู้วิจัย

รศ.นพ.วันล่า กุลวิชิต

สังกัด

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

หมายเหตุ โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนร่วมส่วนหนึ่ง จากมูลนิธิเกาหลีเพื่อการศึกษาชั้นสูง และจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ , เจ้าหน้าที่, และนักวิทยาศาสตร์ของ WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Chulalongkorn Medical Research Center, กลุ่มวิจัยของศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ , ศ.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร , และศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ , Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) และรศ.นพ.เกรียงศักดิ์ ลิมป์กิตติกุล คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล สำหรับข้อแนะนำและความอนุเคราะห์เกี่ยวกับงานวิจัยทั้งหมด ขอบพระคุณแพทย์ประจำบ้านและแพทย์ประจำบ้านต่อยอด ตลอดจนเจ้าหน้าที่พยาบาลและบุคลากรทางแพทย์ ของภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยเวชศาสตร์ฉุกเฉิน และแผนกผู้ป่วยนอก ที่ดูแลรักษาและช่วยเหลือประสานงาน เกี่ยวกับผู้ป่วยในโครงการวิจัย , เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยของคณะแพทยศาสตร์และของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และของสกว. สำหรับข้อแนะนำทางด้านเอกสาร และทางด้านการดำเนินการเกี่ยวกับทุนวิจัย

Abstract (บทคัดย่อ)

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของประเทศไทย การวินิจฉัยการติดเชื้อทางห้องปฏิบัติการ ยังมีข้อจำกัดอยู่ที่ความจำเป็นต้องเจาะเลือด ซึ่งเป็นความไม่สะดวกต่อผู้ป่วยจำนวนมาก โดยเฉพาะผู้ป่วยเด็ก คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้สิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือด ได้แก่ สิ่งส่งตรวจในช่องปาก (น้ำลาย และเยื่อบุกระพุ้งแก้ม) และ /หรือปัสสาวะของผู้ป่วย มาทำการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ โดยใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ทั้งในน้ำลาย เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ประมาณหนึ่งในสามของผู้ป่วย และตรวจพบไวรัสในปัสสาวะ ได้ใน 50-80% ของผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่ แม้จะเป็นการตรวจในระยะท้ายๆ ของไข้ หรือในระยะหลังไข้แล้ว

คณะผู้วิจัยยังพบว่า ไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในปัสสาวะของผู้ติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR นั้น เป็นไวรัสที่มีชีวิต สามารถเพาะเชื้อด้วยการฉีดเข้าในตัวยุงได้ จึงเป็นไวรัสที่มีศักยภาพในการแพร่เชื้อ และอาจมีความสำคัญในเชิงระบาดวิทยาได้ (ต้องการการศึกษาต่อเนื่อง) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังพบว่า ไวรัสที่ตรวจพบในเยื่อบุช่องปาก น้ำลาย และปัสสาวะนั้น อาจพบได้มากกว่า 1 ซีโรทัยป์พร้อมๆ กัน ในผู้ป่วยบางราย เช่นเดียวกับที่มีผู้รายงานแล้วในซีรั่มหรือพลาสมา ข้อมูลต่างๆ ดังกล่าว อาจนำไปสู่ความเข้าใจพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิดรุนแรงได้ดีขึ้น หากได้รับการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

คำหลัก – ไวรัสเดงกี ซีโรทัยป์ น้ำลาย ปัสสาวะ

Dengue viral infection is one of the most important public health problems in Thailand. Laboratory diagnosis is limited by a need to draw blood and pediatric patients are not happy to cooperate. Our group studied a feasibility of using oral specimens and/or urine for dengue diagnostics. We showed that the virus could be detected in approximately one-third of each type of oral specimens and 50-80% of urine. This is true even in late febrile and post-febrile specimens. Sensitivity was comparable or even slightly better than that of serum specimens in previous studies. Oral specimens and urine have a potential to be used for dengue diagnosis and deserve further research and development for clinical and epidemiological applications

In addition, we have also demonstrated that dengue virus detected in the urine specimen of acutely-infected patients is alive and culturable by the mosquito inoculation technique. The virus is thus potentially transmissible and may play a role epidemiologically (this needs further investigations.) Furthermore, we have found there could be more than one serotype presented concurrently in buccal cells, saliva, or urine of certain infected individuals. If studied in depth, this may lead to more understanding of pathogenesis of severe dengue infections.

Key workds – dengue virus, serotypes, saliva, urine

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของประเทศไทย ในปัจจุบัน การติดเชื้อนี้พบได้ตลอดทั้งปี และพบได้ชุกชุมในฤดูฝน ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน จะมีการดูแลรักษาที่ดีขึ้น ก็ยังพบมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อที่มีอาการรุนแรง คือ โรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever) และ dengue shock syndrome เกิดขึ้นทุกปี

ปัญหาสำคัญสองประการ ที่ทำให้คณะผู้วิจัยดำเนินการศึกษาตามโครงงานวิจัยชิ้นนี้ คือ

การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี อาศัยข้อมูลดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทางคลินิก (1997a) คือ อาการไข้สูงเฉียบพลัน ซึ่งมักจะมีระยะเวลาในช่วง 1-7 วัน ก่อนมาพบแพทย์อาจมีอาการออกผื่น ตรวจร่างกายพบหน้าแดง ตับโต อาจมีผื่น ตรวจ Tourniquet test ได้ผลบวก ประกอบกับการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ซึ่งอาจพบ ฮีมาโตคริตปกติหรือเพิ่มสูงขึ้น เม็ดเลือดขาวปกติหรือต่ำ ตรวจพบ atypical lymphocyte เพิ่มขึ้น เกร็ดเลือดต่ำ อาจพบเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ อาจมีอาการช็อคได้

2. การวินิจฉัยที่แน่นอน ได้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่จำเพาะ (1997b) ซึ่งจำแนกเป็นหมวดใหญ่ๆ ได้เป็น

2.1 การตรวจทางปฏิกริยาน้ำเหลือง (serologic diagnosis) ได้แก่ การตรวจเลือดเพื่อหา dengue specific antibody ด้วยวิธีการมาตรฐานต่างๆ ที่ใช้ในทางคลินิก ได้แก่ hemagglutination inhibition test (HAI), ELISA test, และ immunochromatographic test

2.2 การเพาะแยกเชื้อจากเลือดผู้ป่วย ซึ่งทำได้เฉพาะในสถาบันวิจัยบางแห่งเท่านั้น

2.3 การตรวจทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การทำ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ตรวจหาเชื้อ ซึ่งมักนิยมทำในซีรั่มหรือพลาสมา

2.4 การตรวจวิธีอื่นๆ ซึ่งไม่ใคร่นำมาใช้ในทางคลินิก เช่น การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ ในอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธี immunofluorescence เป็นต้น

ข้อจำกัดของวิธีการวินิจฉัยที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน คือความจำเป็นของการเจาะเลือดผู้ป่วย เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค ซึ่งอาจต้องเจาะมากกว่าหนึ่งครั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรณีการตรวจหาแอนติบอดี ซึ่งจะแปลผลได้แม่นยำขึ้น หากมีการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีสองครั้ง ในช่วงเวลาต่างกัน ในขณะที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวนมาก เป็นผู้ป่วยเด็ก ซึ่งอาจมีปัญหาและอุปสรรคในการเจาะเลือดเพื่อการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวหลายๆ ครั้ง หากสามารถนำสิ่งส่งตรวจอื่นๆ ที่น่าจะได้รับความร่วมมือจากผู้ป่วยมากกว่า มาตรวจวินิจฉัยได้ น่าจะเป็นตัวเลือกที่ดี ที่แพทย์จะพิจารณานำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค สิ่งส่งตรวจที่คณะผู้วิจัยสนใจนำมาศึกษา ได้แก่ ปัสสาวะ และสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) ซึ่งได้แก่ น้ำลาย (saliva) และน้ำคัดหลั่งจาก ร่องเหงือก (gingivocrevicular หรือ crevicular fluid)

การศึกษาในการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีในปัสสาวะและสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสได้หลายชนิด ด้วยความไวและความจำเพาะ ที่ไม่แตกต่างจากการตรวจซีรั่มหรือพลาสมา ไม่ว่าจะเป็นการตรวจปัสสาวะหาแอนติบอดีต่อไวรัสเอดส์ (Connell et al., 1993; Hashida et al., 1997; Martinez et al., 1999; Morgado de Moura Machedo et al., 2003; Oelemann et al., 2002; Urnovitz et al., 1999) ไวรัสหัดเยอรมัน (Takahashi et al., 1998; Terada et al., 2000) ไวรัสตับอักเสบเอ (Joshi et al., 2002; Rodriguez Lay Lde et al., 2003) ไวรัสตับอักเสบซี (Constantine et al., 1992; Elsana et al., 1998; Zhang et al., 1994) สำหรับสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) ซึ่งรวมถึงน้ำลาย (saliva) และน้ำคัดหลั่งจากร่องเหงือก (gingivocrevicular หรือ crevicular fluid) ก็สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสได้หลายชนิด นับตั้งแต่ไวรัสเอดส์ (Connell et al., 1993; Hashida et al., 1997; Martinez et al., 1999; Morgado de Moura Machedo et al., 2003) ไวรัสหัดเยอรมัน (Vyse et al., 2001)

และไวรัสตับอักเสบซี (Elsana et al., 1998; Judd et al., 2003) เป็นต้น ดังที่ได้เสนอตัวอย่างเฉพาะไวรัสที่เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA virus) ที่สำคัญบางชนิด และอ้างอิงเฉพาะการศึกษาบางชิ้นเท่านั้น ก็จะเห็นได้ว่า มีการนำประโยชน์ของปัสสาวะและ oral fluid มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส เป็นจำนวนมาก แต่เป็นที่น่าสนใจว่า สำหรับไวรัสเดงกีแล้ว นอกจากการศึกษา 2-3 ชิ้น ที่พยายามตรวจหาแอนติบอดีในน้ำลายแล้ว(Artimos de Oliveira et al., 1999; Balmaseda et al., 2003; Cuzzubbo et al., 1998) ไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกีใน crevicular fluid นอกจากนั้น การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกีในน้ำลาย ในการศึกษาที่ผ่านมา ยังมีจุดที่อาจปรับปรุงให้ดีขึ้นอีกได้ เช่น ความไวในการตรวจพบยังไม่ดีนัก (65-80% ในบางรายงาน) (Artimos de Oliveira et al., 1999) หรือใช้ชุดการตรวจสำเร็จรูปทางการค้า ซึ่งอาจมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง (Cuzzubbo et al., 1998) หรือตรวจหา IgM และพบว่ามีปัญหาในเรื่องของความจำเพาะ เนื่องจากสามารถตรวจได้ผลบวกได้ในผู้ที่แข็งแรงดีบางราย (Balmaseda et al., 2003) คณะผู้วิจัย จึงมีความสนใจ ที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ ที่จะนำการตรวจหาแอนติบอดี ในปัสสาวะ น้ำลาย และน้ำคัดหลั่งจากร่องเหงือก มาใช้ช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี

สำหรับการตรวจวินิจฉัย โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) นั้น เป็นที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน ว่าจะมีความไวและความจำเพาะเพียงพอ ที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกีได้หรือไม่ การตรวจ RT-PCR ดังกล่าว แม้จะมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการตรวจด้วยแอนติบอดีโดยทั่วๆ ไป แต่มีข้อได้เปรียบหลายประการดังนี้

1. <u>สามารถตรวจวินิจฉัยได้ในระยะแรกของโรค (early diagnosis)</u> เนื่องจากไวรัสปรากฏอยู่ในเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่างๆ ตลอดจนออกมาในปัสสาวะ ตั้งแต่ระยะไข้ ในขณะที่ร่างกายจะตอบสนองต่อการติดเชื้อ ด้วยการสร้างแอนติบอดี ต้องใช้ระยะเวลาพอควร ซึ่งมักจะเป็นระยะหลังไข้ไปแล้ว จึงจะสามารถวินิจฉัย จากการตรวจหาแอนติบอดีได้ ด้วยความแม่นยำสูง การที่สามารถบอกการวินิจฉัยได้ตั้งแต่วันแรกๆ ของโรค มีประโยชน์ทั้งในแง่ลดความกังวลของผู้ปกครอง กรณีที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสไข้เลือดออก หรือในด้านตรงข้าม หากตรวจพบว่าเป็นไข้เลือดออกตั้งแต่วันแรกๆ จะทำให้สามารถเฝ้าระวังผู้ป่วยเป้าหมาย (target patients) จำนวนน้อยลงอย่างมาก ความคุ้มค่าทั้งในด้านลดความกังวล และในการเฝ้าระวังผู้ป่วยเป้าหมายที่ถูกต้อง

น่าจะมีน้ำหนักเพียงพอ ที่จะทำการศึกษาวิจัย ถึงความเป็นไปได้ในการใช้การตรวจดังกล่าว ในการ ดูแลรักษาผู้ป่วย

2. การส่งตรวจแอนติบอดีเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกีที่แน่นอน มักต้องการการตรวจสองครั้ง ห่างกันหลายวันหรือเป็นสัปดาห์ ค่าใช้จ่ายทั้งหมด ซึ่งรวมถึงการเสียเวลาของผู้ป่วยและผู้ปกครอง (ขาดเรียนและขาดงาน) เพื่อมาติดตามการรักษาและเจาะเลือดครั้งที่สอง น่าจะมากกว่าการตรวจด้วย RT-PCR ในวันแรกๆ ของไข้

การนำสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก มาใช้ประโยชน์ในการตรวจด้วย PCR หรือ RT-PCR มีการศึกษาในไวรัสหลายชนิด นับตั้งแต่ไวรัสตับอักเสบซี (Roy et al., 1998) ไวรัสโรคหัด (Nigatu et al., 2001) ไวรัสจีบี (GB virus)(Chen et al., 1997; Eugenia et al., 2001) และไวรัสทีที (TT virus)(Deng et al., 2000) เป็นต้น แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในไวรัสไข้เลือดออก ส่วนการตรวจ PCR หรือ RT-PCR ในปัสสาวะนั้น มีการศึกษาจำนวนมากเช่นกัน เช่น ไวรัสโรคหัด (Rota et al., 1995) ไวรัสจีบี (Eugenia et al., 2001) ไวรัสพิษสุนัขบ้า (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2002) ไวรัสตับอักเสบบี (Knutsson and Kidd-Ljunggren, 2000) ไวรัสซีเอ็มวี (CMV)(Blank et al., 2000) เป็นต้น สำหรับไวรัสไข้เลือดออกนั้น กลุ่มคณะผู้วิจัยนี้ เป็นกลุ่มแรกและกลุ่มเดียวในโลกในขณะนี้ ที่ศึกษาการตรวจ RT-PCR ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกี โดยใช้ปัสสาวะ (ดังบทคัดย่อในงานประชุม Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases และ 41st Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America ที่แนบมาด้วย) และพบว่ามีความไวในการตรวจพบประมาณ 80% และความจำเพาะ 100% แม้จะเป็นการตรวจในช่วงท้ายๆ ของระยะไข้ หรือช่วงต้นของระยะหลังไข้แล้ว (ซึ่งโอกาสตรวจพบไวรัสน้อยลงมาก จากการที่ผู้ป่วยเริ่มสร้างแอนติบอดีขึ้นต่อต้านแล้ว) เป็นที่น่าสนใจว่า หากนำปัสสาวะมาตรวจตั้งแต่ระยะไข้วันแรกๆ จะมีความไวสูงขึ้นหรือไม่เพียงใด

ดังนั้น คณะผู้วิจัย จึงมีความสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ ที่จะตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยวิธี RT-PCR ตั้งแต่ในระยะไข้ แม้ว่าจะมีผู้ทำการศึกษาการใช้เทคนิคดังกล่าวมาแล้วเป็นจำนวนมากก็ตาม แต่เป็นการศึกษาในเลือดทั้งสิ้น โดยใช้ซีรั่ม /พลาสมาเป็นส่วนใหญ่ และศึกษาใน peripheral blood

mononuclear cells (PBMC) บ้าง โดยใช้เทคนิคแตกต่างกันไป ไม่ -ว่าจะเป็น single-step PCR(De Paula et al., 2001; Harris et al., 1998; Henchal et al., 1991; Seah et al., 1995; Sudiro et al., 1997) nested PCR(De Paula et al., 2002; Lanciotti et al., 1992; Meiyu et al., 1997; ter Meulen et al., 2000; Yenchitsomanus et al., 1996) การหา 'viral load' ด้วย quantitative RT-PCR(Murgue et al., 2000; Sudiro et al., 2001; Wang et al., 2000) real-time PCR(Callahan et al., 2001; Chen et al., 2001; Houng et al., 2000; Houng et al., 2001; Laue et al., 1999; Warrilow et al., 2002) หรือ NASBA (nucleic acid sequence-based analysis)(Wu et al., 2001) สิ่งที่คณะผู้วิจัยต้องการศึกษา คือความเป็นไปได้ที่จะใช้ปัสสาวะ และสิ่งคัดหลั่งในช่องปาก (oral fluid) มาตรวจด้วยวิธี RT-PCR เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อเดงกี ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก และหลีกเลี่ยงการเจาะเลือดเพื่อการวินิจฉัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ประเมินความเป็นไปได้ ในการตรวจหาไวรัสเดงกีในสิ่งส่งตรวจต่างๆ ทั้งที่เป็นเ ลือดและไม่ใช่เลือด (blood and non-blood specimens)

2. ตรวจหาความมีชีวิตของไวรัสเดงกี (viability) ในปัสสาวะ อันมีความหมายในแง่พยาธิกำ เนิดและระบาดวิทยา

3. ตรวจหาความหลากหลายของไวรัสต่างซีโรทัยป์ ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเฉียบพลัน (concurrent multi-serotype infection)

วิธีดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย ทำการ enroll อาสาสมัคร หลายกลุ่ม เพื่อตอบคำถามต่างๆ ตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย ดังต่อไปนี้

1. **ตรวจหาไวรัสจาก early specimens ในกลุ่มติดเชื้อเฉียบพลัน** ผู้ป่วยผู้ใหญ่ ที่มีอาการไข้เฉียบพลัน ไม่เกิน 3 วัน ได้รับการตรวจเลือด (แยกเป็น plasma และ peripheral blood mononuclear cells – PBMCs) ปัสสาวะ และ buccal brush กับ saliva โดยใช้ RT-nested PCR ที่ target ที่บริเวณ conserved area ของ 3' untranslated region (3' UTR) ของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยใช้ specimens จากไข้วันที่ 3, 4, และ 5 ของการเจ็บป่วย และตรวจยืนยันการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี ด้วยวิธี ELISA มาตรฐาน กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ใช่เดงกี ใช้เป็นกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control)

2. **ตรวจหา viability ของไวรัสในปัสสาวะ** เพื่อเป็นการวิจัยนำร่อง ปัสสาวะจากผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR 4 ราย และปัสสาวะ จากผู้ป่วยที่เป็นไข้จากสาเหตุอื่น และ ตรวจไม่พบไวรัสเดงกี ในปัสสาวะ (negative control) 3 ราย ถูกนำมาศึกษา viability ของไวรัส โดยการเพาะเชื้อในยุง (mosquito inoculation) ด้วยการฉีดปัสสาวะเข้าในตัวยุง *Aedes aegypti* และเพาะเลี้ยงยุงเป็นเวลา 14 วันแล้ว sacrifice ยุง หลังจากนั้นตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีใน tissue extract จากยุง ด้วยวิธี RT-nested PCR

3. **ตรวจหา concurrent multi-serotype infection ในผู้ป่วยติดเชื้อเฉียบพลัน** ผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่ ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีแบบเฉียบพลัน ถูก enrolled เข้ามาในการศึกษานี้ เพื่อรวบรวมสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ ได้แก่ ปัสสาวะ buccal brush และ saliva และนำสิ่งส่งตรวจเหล่านั้น มาตรวจหาไวรัสเดงกี ด้วยวิธี serotype-specific RT-PCR เพื่อศึกษาว่า สามารถพบไวรัสเดงกีมากกว่า 1 ซีโรทัยป์ ในสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือดหรือไม่

ผลการศึกษาทดลอง

1. **ตรวจหาไวรัสจาก early specimens ในกลุ่มติดเชื้อเฉียบพลัน** จากผู้ป่วยผู้ใหญ่ ที่มาด้วยอาการไข้เฉียบพลัน 30 ราย พบว่า 24 รายเข้าหลักเกณฑ์ของการศึกษา และหลังจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่า 12 รายเป็นไข้จากการติดเชื้อไวรัสเดงกีเฉียบพลัน และอีก 12 รายที่เป็นไข้จากสาเหตุอื่นนั้น ถูกจัดเข้าในกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control)

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกี ในสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ ของผู้ป่วย 24 รายดังกล่าว ได้ผลดังในตาราง ที่ 1 ดังนี้

Specimens	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Urine	6/12 cases (50%)	12/12 cases (100%)	6/6 cases (100%)	12/18 cases (66.7 %)
Saliva	4/12 cases (33.3%)	11/12 cases (91.7%)	4/5 cases (80%)	11/19 cases (57.9 %)
Buccal Brush	4/12 cases (33.3%)	11/12 cases (91.7%)	4/5 cases (80 %)	11/19 cases (57.9%)
Plasma	12/12 cases (100%)	11/12 cases (91.7%)	12/13 cases (92.3 %)	11/11 cases (100%)
PBMC	12/12 cases (100%)	11/12 cases (91.7%)	12/13 cases (92.3 %)	11/11 cases (100%)
Saliva + Buccal Brush	6/12 cases (50%)	11/12 cases (91.7%)	6/7 cases (85.7%)	11/17 cases (64.7%)
All Non-blood Specimens	9/12 cases (75%)	11/12 cases (91.7%)	9/10 cases (90%)	11/14 cases (91.7 %)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-nested PCR ในสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ ในผู้ป่วยที่มาด้วยอาการไข้ไม่เกิน 3 วัน

2. **ตรวจหา viability ของไวรัสในปัสสาวะ** ผลการเพาะเชื้อไวรัสเดงกีใน *Aedes aegypti* โดยใช้ปัสสาวะของผู้ป่วยเดงกี ที่ตรวจได้ผลบวกจาก dengue-specific RT-PCR เปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อ โดยใช้ปัสสาวะจากผู้ป่วยไข้เฉียบพลันจากสาเหตุอื่น ได้ผลดังตารางที่ 2

	# of cases with virus isolated/total # of cases		
	Urine pellets	**Urine supernatants**	
		Antimicrobials added	**Microfiltration (0.2 μ)**
Dengue - febrile urine	1/4 (25%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)
dengue - postfebrile urine	0/4 (0%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)
nondengue – febrile & postfebrile urine	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)

3. **ตรวจหา concurrent multi-serotype infection ในผู้ป่วยติดเชื้อเฉียบพลัน** สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งเด็กและผู้ใหญ่ ที่เก็บรวบรวมระหว่างปี 2003-2007 ที่ตรวจได้ผลบวกทั้ง dengue serology และ pan -dengue-specific RT-PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาส่วนนี้ ซึ่งมีทั้งหมด 95 ราย ที่นำมาตรวจด้วย serotype-specific RT-PCR ต่อ และพบว่าสามารถตรวจได้ผลบวกใน 85 ราย ซึ่งพบซีโรทัยป์ 4 (den-4) มากที่สุด คือกึ่งหนึ่งของทั้งหมด

เมื่อรวบรวมผลจากสิ่งส่งตรวจทั้งหมดแล้ว พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสมากกว่า 1 ซีโรทัยป์ ในผู้ป่วย 20 จาก 85 ราย (23.5%) ซึ่งพบ multi-serotype infection ดังกล่าวเพียงกึ่งหนึ่ง หากตรวจเฉพาะในซีรั่ม/พลาสมา และพบว่า multi-serotype infection นั้น ตรวจพบได้ทั้งใน urine pellets, buccal brush, และ saliva

ซีโรทัยป์ที่พบร่วมกันมากที่สุด คือ den-1 + den-4 และ den-2 + den-4 โดยพบอย่างละ 5 ราย และพบการติดเชื้อร่วมกันจากไวรัส 3 ซีโรทัยป์ คือ den-1 + den-2 + den-4 จำนวน 2 ราย และจากไวรัส den-1 + den-3 + den-4 จำนวน 1 ราย

บทวิจารณ์

โรคติดเชื้อไวรัสเดงกี ก่อให้เกิดลักษณะอาการทางคลินิกที่หลากหลาย และพบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ จึงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศ ที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆ ปัญหาที่สำคัญมาก 2 ประการคือ ข้อจำกัดในความเข้าใจเรื่องวิธีการแพร่ระบาดและการกลายพันธุ์ของเชื้อ และช่องว่างของความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของอาการที่รุนแรงในผู้ป่วยบางราย

ผลงานวิจัย 3 ชิ้นนี้ มีความหมายควรแก่การสนใจ เพื่อนำไปทำการศึกษาต่อเนื่อง

1. งานวิจัยตรวจหาไวรัสเดงกี ในเลือดและสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือด ในผู้ป่วยที่มาด้วยอาการไข้ไม่เกิน 3 วัน แสดงให้เห็นว่า การกระจายตัวของไวรัสเดงกี ในช่วงที่ติดเชื้ออย่างเฉียบพลันนั้น มิได้เกิดขึ้นเฉพาะใน intravascular compartment ของผู้ป่วยเท่านั้น แต่ยังพบได้ในสิ่งส่งตรวจอื่นๆ ทั้ง oral specimens อันได้แก่ buccal brush และ saliva ตลอดจนในปัสสาวะอีกด้วย แม้จะสามารถตรวจพบได้ในสัดส่วนที่น้อยกว่าการใช้ blood specimens โดยตรง แต่หากสามารถตรวจ non-blood sp ecimens หลายๆ ชนิดร่วมกัน (ตารางที่ 1) ก็สามารถตรวจพบไวรัสได้มากกว่า 90% เทียบเท่ากับการตรวจโดยใช้ blood specimens เช่นกัน

ผลการวิจัยชิ้นนี้ มีผลกระทบทั้งต่อ clinical diagnostics กล่าวคือความเป็นไปได้ที่จะตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกี โดยไม่ต้องเจาะเลือด และผลกระทบต่อทั้งพยาธิกำเนิดของโรคติดเชื้อชนิดนี้ การตรวจพบไวรัสในปัสสาวะและน้ำลาย ก่อนให้เกิดคำถามว่า สิ่งคัดหลั่งต่างๆ ของผู้ป่วยเดงกี เป็นช่องทางการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสนี้ในชุมชนได้หรือไม่ หากไวรัสที่ปลดปล่อยออกมาในสิ่งคัดหลั่งต่างๆ เหล่านี้ เป็นไวรัสที่มีชีวิต นั่นอาจหมายความว่า ไวรัสนี้มีช่องทางในการแพร่กระจายเชื้อ มากกว่าที่ทราบกันอยู่แต่เดิม

2. ข้อมูลที่สนับสนุนข้อที่ 1 ข้างต้น ได้มากจากผลงาน การเพาะเชื้อไวรัสเดงกี จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ เมื่อนำปัสสาวะที่ตรวจพบเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR ไปทำการเพาะเชื้อด้วย mosquito inoculation technique พบว่าเชื้อไวรัสที่รั่วออกมาในปัสสาวะนั้น เป็นไวรัสที่มีชีวิต และมี ศักยภาพในการติดต่อไปยังบุคคลอื่นๆได้ โดยอาจทำได้ผ่านทางยุง อาทิเช่น ยุงมาดื่มน้ำปัสสาวะดังกล่าว และไปกัดบุคคลอื่นต่อไป

หากการติดเชื้อในธรรมชาติ เกิดขึ้นผ่านทางปัสสาวะได้จริง มาตรการในการควบคุมการติดเชื้อ คงต้องรวมถึงสุขลักษณะของการขับถ่ายปัสสาวะ เพื่อป้องกันการติดเชื้อผ่านช่องทางนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จากหลักฐานที่ได้จากการวิจัยชิ้นนี้ ที่แสดงว่าสามารถตรวจพบไวรัสที่มีชีวิตได้ในปัสสาวะ ได้เป็นเวลานาน แม้ผู้ป่วยจะหายจากอาการไข้ไปแล้วเป็นเวลาหลายสัปดาห์ ย่อมหมายความว่า ปัสสาวะที่ปนเปื้อนไวรัสที่มีชีวิต มิได้ถูกจำกัดบริเวณอยู่ในสถานพยาบาลเท่านั้น

3. **Concurrent multi-serotype infections** ผลการวิจัยหลายๆ ชิ้น จากหลายๆ ประเทศ ยืนยันว่าสามารถตรวจพบไวรัสเดงกีมากกว่า 1 ซีโรทัยป์ได้พร้อมๆ กัน ในเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นในผลงานชิ้นนี้ว่า นอกจากในกระแสเลือดแล้ว สำหรับสิ่งส่งตรวจอื่นๆ เช่น ปัสสาวะ น้ำลาย และเยื่อบุกระพุ้งแก้มแล้ว ยังสามารถตรวจพบไวรัสเดงกีได้ 2-3 ซีโรทัยป์พร้อมๆ กัน เช่นเดียวกัน และตรวจพบได้ถึงกว่า 20% ซึ่งมากกว่าตัวเลขที่เคยรายงานปรากฏการณ์นี้ ใน blood specimens (มักรายงานอยู่ในช่วง 5-10% เป็นส่วนใหญ่)

การตรวจพบดังกล่าว เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการศึกษาในข้อ 1 และข้อ 2 ซึ่งมีความสอดคล้องกันนั้น เป็นการยืนยันซึ่งกันและกันว่า ในช่วงการติดเชื้อเฉียบพลันนั้น ไวรัสเดงกีมี ‘พฤติกรรม’ ในการกระจายตัวในร่างกายของผู้ติดเชื้อ โดยกระทำได้ทั่วถึงและครอบคลุมในหลายๆ ส่วน มากกว่าที่วงการแพทย์เคยทราบหรือเคยเข้าใจอยู่เดิม

ข้อมูลจากผลงานวิจัยทั้ง 3 ชิ้นดังกล่าว น่าจะเป็นจุดกระตุ้นความสนใจ ให้เกิดการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

(1997a). Clinical Diagnosis. In Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, treatment, prevention, and control, W.H. Organization, ed. (Geneva), pp. 12-23.

(1997b). Laboratory Diagnosis. In Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, treatment, prevention, and control, W.H. Organization, ed. (Geneva), pp. 34-47.

Artimos de Oliveira, S., Rodrigues, C.V., Camacho, L.A., Miagostovich, M.P., Araujo, E.S., and Nogueira, R.M. (1999). Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. J Virol Methods 77, 81-86.

Balmaseda, A., Guzman, M.G., Hammond, S., Robleto, G., Flores, C., Tellez, Y., Videa, E., Saborio, S., Perez, L., Sandoval, E.*, et al.* (2003). Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. Clin Diagn Lab Immunol 10, 317-322.

Blank, B.S., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Weverling, G.J., Putter, H., Pauw, W., van Dijk, W.C., Smits, P., Lie, A.L.S., Reiss, P.*, et al.* (2000). Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol 38, 563-569.

Callahan, J.D., Wu, S.J., Dion-Schultz, A., Mangold, B.E., Peruski, L.F., Watts, D.M., Porter, K.R., Murphy, G.R., Suharyono, W., King, C.C.*, et al.* (2001). Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. J Clin Microbiol 39, 4119-4124.

Chen, M., Sonnerborg, A., Johansson, B., and Sallberg, M. (1997). Detection of hepatitis G virus (GB virus C) RNA in human saliva. J Clin Microbiol 35, 973-975.

Chen, R.F., Yeh, W.T., Yang, M.Y., and Yang, K.D. (2001). A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. FEMS Immunol Med Microbiol 30, 1-7.

Connell, J.A., Parry, J.V., Mortimer, P.P., and Duncan, J. (1993). Novel assay for the detection of immunoglobulin G antihuman immunodeficiency virus in untreated saliva and urine. J Med Virol 41, 159-164.

Constantine, N.T., Zhang, X., Li, L., and Smialek, J.E. (1992). Detection of antibodies to hepatitis C virus in urine. Lancet 339, 1607-1608.

Cuzzubbo, A.J., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Suntayakorn, S., Aaskov, J., and Devine, P.L. (1998). Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. J Clin Microbiol 36, 3737-3739.

De Paula, S.O., Lima, D.M., and da Fonseca, B.A. (2002). Detection and identification of dengue-1 virus in clinical samples by a nested-PCR followed by restriction enzyme digestion of amplicons. J Med Virol 66, 529-534.

De Paula, S.O., Nunes, C., Matos, R., de Oliveira, Z.M., Lima, D.M., and da Fonseca, B.A. (2001). Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation- negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. J Virol Methods 98, 119-125.

Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., and Akahane, Y. (2000). Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. J Med Virol 62, 531-537.

Elsana, S., Sikuler, E., Yaari, A., Shemer-Avni, Y., Abu-Shakra, M., Buskila, D., Katzman, P., Naggan, L., and Margalith, M. (1998). HCV antibodies in saliva and urine. J Med Virol 55, 24-27.

Eugenia, Q.R., Ana, Q.R., and Carmen, M. (2001). Investigation of saliva, faeces, urine or semen samples for the presence of GBV-C RNA. Eur J Epidemiol 17, 271-274.

Harris, E., Roberts, T.G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L.D., Valle, S., Sandoval, E., and Balmaseda, A. (1998). Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single- tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol 36, 2634-2639.

Hashida, S., Hashinaka, K., Ishikawa, S., and Ishikawa, E. (1997). More reliable diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by detection of antibody IgGs to pol and gag proteins of HIV-1 and p24 antigen of HIV-1 in urine, saliva, and/or serum with highly sensitive and specific enzyme immunoassay (immune complex transfer enzyme immunoassay): a review. J Clin Lab Anal 11, 267-286.

Henchal, E.A., Polo, S.L., Vorndam, V., Yaemsiri, C., Innis, B.L., and Hoke, C.H. (1991). Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. Am J Trop Med Hyg 45, 418-428.

Houng, H.H., Hritz, D., and Kanesa-thasan, N. (2000). Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. J Virol Methods 86, 1-11.

Houng, H.S., Chung-Ming Chen, R., Vaughn, D.W., and Kanesa-thasan, N. (2001). Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. J Virol Methods 95, 19-32.

Joshi, M.S., Chitambar, S.D., Arankalle, V.A., and Chadha, M.S. (2002). Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis a. Clin Diagn Lab Immunol 9, 840-845.

Judd, A., Parry, J., Hickman, M., McDonald, T., Jordan, L., Lewis, K., Contreras, M., Dusheiko, G., Foster, G., Gill, N.*, et al.* (2003). Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. J Med Virol 71, 49-55.

Knutsson, M., and Kidd-Ljunggren, K. (2000). Urine from chronic hepatitis B virus carriers: implications for infectivity. J Med Virol 60, 17-20.

Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., and Vorndam, A.V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30, 545-551.

Laue, T., Emmerich, P., and Schmitz, H. (1999). Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. J Clin Microbiol 37, 2543-2547.

Martinez, P.M., Torres, A.R., Ortiz de Lejarazu, R., Montoya, A., Martin, J.F., and Eiros, J.M. (1999). Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingival-crevicular transudate, and urine samples. J Clin Microbiol 37, 1100-1106.

Meiyu, F., Huosheng, C., Cuihua, C., Xiaodong, T., Lianhua, J., Yifei, P., Weijun, C., and Huiyu, G. (1997). Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. Microbiol Immunol 41, 209-213.

Morgado de Moura Machedo, J.E., Kayita, J., Bakaki, P., Coulter, J.B., Ndugwa, C.M., Tindyebwa, D., and Hart, C.A. (2003). IgA antibodies to human immunodeficiency virus in serum, saliva and urine for early diagnosis of immunodeficiency virus infection in Ugandan infants. Pediatr Infect Dis J 22, 193-195.

Murgue, B., Roche, C., Chungue, E., and Deparis, X. (2000). Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. J Med Virol 60, 432-438.

Nigatu, W., Jin, L., Cohen, B.J., Nokes, D.J., Etana, M., Cutts, F.T., and Brown, D.W. (2001). Measles virus strains circulating in Ethiopia in 1998-1999: molecular characterisation using oral fluid samples and identification of a new genotype. J Med Virol 65, 373-380.

Oelemann, W.M., Lowndes, C.M., Verissimo Da Costa, G.C., Morgado, M.G., Castello-Branco, L.R., Grinsztejn, B., Alary, M., and Bastos, F.I. (2002). Diagnostic detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in urine: a brazilian study. J Clin Microbiol 40, 881-885.

Rodriguez Lay Lde, L., Larralde Diaz, O., Martinez Casanueva, R., and Gutierrez Moreno, A. (2003). Anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in urine samples for rapid diagnosis of outbreaks. Clin Diagn Lab Immunol 10, 492-494.

Rota, P.A., Khan, A.S., Durigon, E., Yuran, T., Villamarzo, Y.S., and Bellini, W.J. (1995). Detection of measles virus RNA in urine specimens from vaccine recipients. J Clin Microbiol 33, 2485-2488.

Roy, K.M., Bagg, J., McCarron, B., Good, T., Cameron, S., and Pithie, A. (1998). Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. J Med Virol 54, 271-275.

Seah, C.L., Chow, V.T., Tan, H.C., and Can, Y.C. (1995). Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. J Virol Methods 51, 193-200.

Sudiro, T.M., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Rothman, A.L., Raengsakulrach, B., Janus, J., Kurane, I*., et al.* (1997). Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. Am J Trop Med Hyg 56, 424-429.

Sudiro, T.M., Zivny, J., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nisalak, A., Norman, J.E., Ennis, F.A., and Rothman, A.L. (2001). Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. J Med Virol 63, 29-34.

Takahashi, S., Machikawa, F., Noda, A., Oda, T., and Tachikawa, T. (1998). Detection of immunoglobulin G and A antibodies to rubella virus in urine and antibody responses to vaccine-induced infection. Clin Diagn Lab Immunol 5, 24-27.

ter Meulen, J., Grau, M., Lenz, O., Emmerich, P., Schmitz, H., Oh, F., Jaspert, R., and Niedrig, M. (2000). Isolation and partial characterization of dengue virus type 2 and 4 strains from dengue fever and dengue haemorrhagic fever patients from Mindanao, Republic of the Philippines. Trop Med Int Health 5, 325-329.

Terada, K., Niizuma, T., Kataoka, N., and Niitani, Y. (2000). Testing for rubella-specific IgG antibody in urine. Pediatr Infect Dis J 19, 104-108.

Urnovitz, H.B., Sturge, J.C., Gottfried, T.D., and Murphy, W.H. (1999). Urine antibody tests: new insights into the dynamics of HIV-1 infection. Clin Chem 45, 1602-1613.

Vyse, A.J., Cohen, B.J., and Ramsay, M.E. (2001). A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children. Public Health 115, 201-207.

Wacharapluesadee, S., and Hemachudha, T. (2002). Urine samples for rabies RNA detection in the diagnosis of rabies in humans. Clin Infect Dis 34, 874-875.

Wang, W.K., Lee, C.N., Kao, C.L., Lin, Y.L., and King, C.C. (2000). Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. J Clin Microbiol 38, 3306-3310.

Warrilow, D., Northill, J.A., Pyke, A., and Smith, G.A. (2002). Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. J Med Virol 66, 524-528.

Wu, S.J., Lee, E.M., Putvatana, R., Shurtliff, R.N., Porter, K.R., Suharyono, W., Watts, D.M., King, C.C., Murphy, G.S., Hayes, C.G., *et al.* (2001). Detection of dengue viral rna using a nucleic acid sequence-based amplification assay. J Clin Microbiol 39, 2794-2798.

Yenchitsomanus, P.T., Sricharoen, P., Jaruthasana, I., Pattanakitsakul, S.N., Nitayaphan, S., Mongkolsapaya, J., and Malasit, P. (1996). Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). Southeast Asian J Trop Med Public Health 27, 228-236.

Zhang, X., Constantine, N.T., Li, L., Abdel-Hamid, M., Bansal, J., and Smialek, J.E. (1994). Application of commercial assays to detect IgG antibodies to hepatitis C virus in urine: a pilot study from autopsy cases. J Med Virol 44, 187-191.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

คณะผู้วิจัย กำลังเตรียมต้นฉบับผลงานวิจัย เพื่อส่งพิจารณาตีพิมพ์ โดยใช้ข้อมูลจากผลงานวิจัย ที่ได้นำเสนอในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ (ดูรายละเอียดในข้อที่ 3 ผลงานอื่นๆ)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)**

คณะผู้วิจัย ได้สร้างเครือข่ายความร่วมมือ กับสถาบันวิจัยชั้นนำในสหรัฐอเมริกา 3 แห่ง และได้ส่งนิสิตปริญญาโทและเอก เข้าดูงานและฝึกอบรมการทำวิจัยทางห้องปฏิบัติการ ในสถาบันต่างๆ ดังกล่าวแล้ว เป็นเวลาตั้งแต่ 1 เดือนจนถึง 1 ปี 3 เดือน สถาบันดังกล่าวได้แก่

Yale University School of Medicine, Connecticut, USA

Carolina Vaccine Institute, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina, USA

Center for Infectious Disease and Vaccine Research, University of Massachusetts, USA

- **เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)**

จากงานวิจัยดังกล่าว คณะผู้วิจัยเกิดความรู้ความเข้าใจ เกี่ยวกับ dengue diagnostics และ dengue pathogenesis มากขึ้นอย่างมาก ทำให้มีการพัฒนารูปแบบของการสอน ในหัว ข้อดังกล่าว ทั้งต่อนิสิตแพทย์ แพทย์ประจำบ้าน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด นิสิตปริญญาโท และนิสิตปริญญาเอกที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่ได้ ได้ถูกนำไปเสนอในที่ประชุมวิชาการนานาชาติหลายครั้ง ผลงานหลายชิ้นได้รับการคัดเลือกให้นำเสนอด้วยวาจา (oral presentation) และบางชิ้นได้รับรางวัลจากองค์กรในยุโรป (Travel Grant Awards)

แพทย์ประจำบ้านต่อยอด และนิสิตปริญญาโท นิสิตปริญญาเอก ที่สำเร็จการศึกษาและที่กำลังศึกษาวิจัย เกี่ยวข้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ มีดังนี้

-นพ.กำพล สุวรรณพิมลกุล จากงานวิจัยนำร่อง การตรวจหาไวรัสเดงกีใน oral specimens และ urine ในผู้ป่วยติดเชื้อเฉียบพลัน (แพทย์ประจำบ้านต่อยอดอายุรศาสตร์โรคติดเชื้อ และนิสิตปริญญาโท (พ.ศ. 2550-2552)

-พญ.ดนยา จันทร์สิงหกุล จากงานวิจัยนำร่อง การตรวจหาไวรัสเดงกีใน oral specimens และ urine ในผู้ป่วยเด็ก (แพทย์ประจำบ้านต่อยอด กุมารเวชศาสตร์โรคติดเชื้อ 2550-2552)

-น.ส.กุสุมา ไชโย นิสิตปริญญาโท ระหว่างปีพ.ศ. 2548-2550 งานวิจัยตรวจหาไวรัสเดงกีใน urine

-น.ส.พรสุรี พงษ์สุชาติ นิสิตปริญญาโท ระหว่างปีพ.ศ. 2548-2551 งานวิจัยตรวจหาไวรัสเดงกี จาก urine pellets & buccal cells ด้วยวิธี immunocytochemistry

-น.ส.วรพรรณ ยิ่งศิวะพัฒน์ นิสิตปริญญาเอก โครงการกาญจนาภิเษก (กำลังศึกษา) งานวิจัยเพาะเชื้อไวรัสเดงกีจาก urine ด้วยวิธี mosquito inoculation และศึกษา nucleotide variations ของไวรัสเดงกี ใน compartments ต่างๆ ของโฮสต์

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ สำหรับผลงานจากโครงการวิจัยนี้ มีดังนี้

3.1 Yingsiwaphat V, Siriyasatien P, Arunyingmongkol K, Krajiw S, Pupaibool J, Nisalak A, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Survival of dengue virus in the urine of acutely-infected patients – implications for pathogenesis and for a possible unrecognised mode of transmission for an arthropod-borne virus. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich, Germany. March 31-April 3, 2007.

(**Oral Presentation =** 8.2% of 2,920 submitted abstracts)

*** = principal investigator**

ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Travel Grant Award for qualified abstracts

3.2 Suwanpimolkul G, Pinyochotiwong C, Kittitrakul C, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W.*** Early diagnosis of dengue infection using blood and non-blood specimens: a pilot study. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, Spain. April 19-22, 2008.

*** = principal investigator**

3.3 **Kulwichit W*,** Krajiw S, Chansinghakul D, Suwanpimolkul G, Prommalikit O, Suandork P, Pupaibool J, Arunyingmongkol K, Pancharoen C, Thisyakorn U. Concurrent multi-serotypic dengue infections in various body fluids. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, Finland. May 16-19, 2009.

(**Oral presentation** – among 8.7% of about 2,600 submitted abstracts)

***principal investigator**

3.4 Laosakul C, Sriprapun M, Chaiyo K, Krajiw S, Chansinghakul D, Suwanpimolkul G, Pupaibool J, Arunyingmongkol K, Pancharoen C, Thisyakorn U, **Kulwichit W*.** Prolonged survival of dengue virus in blood and excretion in urine after clinical recovery. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, Finland. May 16-19, 2009.

(**Oral presentation** – among 8.7% of about 2,600 submitted abstracts)

***principal investigator**

needed to completely eliminate parasite from blood in surviving mice did not differ between groups. Parasitaemia in TLR2/4 –/– and TLR9 –/– mice and in controls was similar. MyD88 –/– mice had significantly lower levels of IL-12 and IFN-γ. T cell proliferation as well as T-cell activation was not altered.
Conclusion: MyD88 plays an important role in eliminating blood stage parasites. This is reflected by reduced levels of co-stimulatory as well as pro-inflammatory cytokines.

O61 TLR2, but not TLR4 mediates *Onchocerca volvulus* induced corneal inflammation

K. Daehnel, E. Pearlman (Cleveland, US)

Objectives: This study was designed to identify the role of TLR2 and TLR4 in the development of *Onchocerca volvulus* induced keratitis.
Methods: Bone-marrow derived dendritic cell cultures were obtained from C57Bl/6, TLR2 –/–, TLR4 –/– and TLR2/4 –/– mice and stimulated in vitro with *O. volvulus* extract. Dendritic cell activation was measured by IL-6 and RANTES production and by CD40 expression by flow cytometry.
C57Bl/6 and TLR2 –/– mice were then immunised with *O. volvulus* extract and soluble antigen was injected into the corneal stroma. Neutrophil and eosinophil migration into the corneal stroma was determined by immunohistochemistry, and filaria-specific IL-5 and IFN-γ production by splenocytes was measured by ELISA.
Results: Incubation of dendritic cells with filarial extracts induced production of IL-6 and RANTES and up-regulation of CD40. In contrast, there was no elevation of any of these factors in dendritic cells obtained from TLR2 –/– or TLR2/4 –/– mice, but dendritic cells from TLR4 –/– mice responded similar to C57Bl/6 dendritic cells.
Immunisation of C57Bl/6 and TLR2 –/– mice caused increased filaria-specific IL-5 production by splenocytes. In contrast, IFN-γ production was only increased in splenocyte cultures from C57Bl/6 mice, but not in cultures from TLR2 –/– mice. In the C57Bl/6 corneas, injection of filarial antigens induced neutrophil and eosinophil infiltration. In TLR2 –/– mice, neutrophil migration into the corneal stroma was completely abrogated, whereas eosinophil migration remained unaffected.
Conclusion: We conclude that TLR2 plays an important role in early recognition of filarial antigens, the induction of filaria-specific T cells and neutrophil migration to the corneal stroma.
Ongoing studies are examining the role of IL-6 and IFN-γ in the development of adaptive immune responses and corneal inflammation.

O62 Prevalence of *Hymenolepis nana* and other intestinal parasites as mixed infection among children in Ilam, and impact of single-dose praziquantel against *H. nana*

A. Khosravi, A. Dalimi Asl, A. Kaikhavandi (Ilam, IR)

Objective of study: This study was designed to evaluate the prevalence of intestinal parasitic infections in primary and secondary School children in relation to some individual and social risk factors such as the parent's job, the water supply source, raw vegetable consumption, area of living, gender, etc., in Ilam and assess the impact of two different doses of Praziquantel against *H. nana* infection.
Methods: The mixed infection of *Hymenolepis nana* and other intestinal parasites were studied in a 3 years prospective study using 1140 stool samples that were randomly collected from 5 regions of the city, the North, the East, the West, the South and the City Centre. Samples were tested using microscopy, direct examination, and then Formalin Ether diagnose tests were carried out to compare the results. Three groups each of 30 infected individuals were selected randomly and they were given Praziquantel 15 mg/kg, 20 mg/kg and Placebo respectively.
Results: The overall prevalence of *H. nana* was 13.4% with no significant difference for males and females. The parent's jobs, age of children and source of water supply had no significant correlation with the prevalence of infection while a strong correlation was found with raw vegetable consumption. 46.96 percent of all children were shown to have parasitic infection with the highest prevalence reported for Trichuriasis and Giardiasis, 26% and 25.30% respectively. Amongst 34 percent of individuals who had *H. nana* infection Giardia Lamblia were also diagnosed as a mixed infection; 3% of individuals who had *H. nana* infection were diagnosed with Taenia Saginata infection too. Abdominal disorders, lack of appetite, dizziness, vomiting and diarrhoea were the main reported symptoms. The cure rate of Praziquantel against *Hymenolepis nana* infection was about 100% using both doses of drug.
Discussion: There is a high rate of parasitic infection, some with mixed infection, in children of primary and secondary schools in Iran with higher prevalence for those living in poor parts of country like Ilam. *H. nana* is a worldwide parasitic infection distributed amongst children affecting their growth and also their quality of study. The high prevalence and also the mixed infection reported in this study suggested that the Health Services should work more effectively and promote their impact on the knowledge, attitude and practice of children. Praziquantel cured the infection using single dose appropriately which is in agreement with other studies.

O63 Chagas' disease: a growing problem in Spain

A. Salinas, M. De Górgolas, M. Fernández-Guerrero (Madrid, ES)

Background: Chagas' disease is a parasitic infection caused by *Trypanosoma cruzi*. It is endemic in Central and South America and, during the last few years, a large number of migrants from these areas have settle in Spain. Therefore the diagnosis of Chagas'disease has become a common event in our clinical practice.
Methods: We have reviewed all cases of Chagas' disease during the last 2 years. Specific serology (ELISA) was the diagnostic procedure. Epidemiological, clinical, cardiac ultrasound, serological and therapeutic aspects were analysed.
Results: During 2004 and 2005 we studied 7 patients with Chagas' disease. 3 men and 4 women with a mean age of 38.8 y (24–51 y). 85% were from rural areas of Bolivia (Cochabamba and Valle del Potosí) and one patient came from the North of Argentina. All patients had positive antibodies against *T. cruzi* performed in their countries. The main clinical complaints were: dizziness (1p), dyspnea (2p), palpitations (1p) or asymptomatic screening (3p). 2 cases had positive xenodiagnosis. All cases but 2 were asymptomatic, having normal ECG and cardiac ultrasound. 2 women had arrhythmia: one atrial fibrillation and ventricular tachycardia requiring a DAI and the other had ventricular dysfunction and constipation. All cases but one previously treated received therapy with benznidazole for 30–60 days with good tolerance. A pregnant woman did not receive treatment.
Conclusions: The new entry of immigrants to Spain, coming from rural endemic areas of Chagas' disease of Bolivia and other Southamerican countries should make us suspect this entity in young people with cardiac or gastro-intestinal disturbances.

oral presentation & ESCMID award

O64 Survival of dengue virus in the urine of acutely-infected patients – implications for pathogenesis and for a possible unrecognized mode of transmission for an arthropod-borne virus

V. Yingsiwaphat, P. Siriyasatien, K. Arunyingmongkol, S. Krajiw, J. Pupaibool, A. Nisalak, C. Pancharoen, U. Thisyakorn, W. Kulwichit (Bangkok, TH)

Objectives: Dengue virus infection is considered the world's most important arthropod-borne disease. We have earlier reported a pilot study that dengue, like some other viruses, can be detected by RT-PCR in urine from a number of patients, even in an early postfebrile period. Here we wish to report a follow-up study with more cases and with our success in isolating the virus from early and late urine specimens of acutely-infected patients.
Methods: Hospitalised patients suspected of dengue infection were enrolled. Diagnosis was confirmed by standard criteria of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and/or haemagglutination inhibition test (HI). Patients with negative dengue serologies served as negative

controls. Dengue-specific PCR, with primers targeting conserved sequences in the 3′-untranslated region, was performed in urine specimens with a strict and properly-evaluated protocol. Pairs of febrile and postfebrile urine specimens from 1 adult and 3 paediatric dengue cases with positive dengue-specific PCR in urine, together with those of 1 adult and 2 paediatric negative controls, were processed and then employed for Aedes aegypti intrathoracic inoculation. To minimise urinary toxicity to mosquitoes, 3 forms of processed urine were used: diluted urine pellets, diluted urine supernatants filtered though 0.2-μm membrane, and diluted urine supernatants mixed with antimicrobials. Each form of each specimen was inoculated into 20 mosquitoes. Surviving mosquitoes were dissected 14 days after inoculation. Dengue-specific PCR was performed on extracts from the body parts of all injected mosquitoes.

Results: Of 237 dengue patients enrolled, the virus was detected in 122/189 paediatric and 20/48 adult urine specimens by PCR (64.55% and 41.67% respectively). Live dengue viruses were detected in all febrile and postfebrile urine specimens of dengue cases but in none of negative controls (Table). The virus was isolated as late as 14 days after defervescence. Filtered urine supernatants served as the best specimen type, with the least urinary toxic effects to mosquitoes.

Specimens	# cases with virus isolated/total # cases		
	urine pellets	urine supernatants	
		Antimicrobials added	Microfiltration (0.2 μ)
Dengue			
febrile urine	1/4 (25%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)
postfebrile urine	0/4 (0%)	3/4 (75%)	4/4 (100%)
Nondengue			
febrile urine	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
postfebrile urine	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)

Conclusion: Dengue virus is not only excreted in urine in at least half of the patients, but it is also live and culturable. These findings have implications for dengue pathogenesis and for public health. Urine is implicated as a potential mode of transmission for certain viruses. Whether the arthropod-borne dengue will be added to the list is subject to further investigation.

O65 Spatiotemporal variations of malaria incidence and protective efficacy of intermittent preventive antimalarial treatment of infants

J. May, R. Kobbe, B. Kreuels, S. Adjei, O. Adjei on behalf of the Agona IPTi Trial Team

Background: Intermittent preventive antimalarial treatment of infants (IPTi) is considered a promising malaria control strategy. Among the factors that influence the extent of protection provided by IPTi are malaria endemicity, seasonality, drug resistance patterns and the IPTi application schedule. Studies modeling the effect of malaria incidences on IPTi are scarce. The aim of this study was to describe how far protective efficacy of IPTi depends on the incidence rate of clinical malaria.

Methods: One-thousand seventy infants were enrolled in a registered controlled trial on the efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine based IPTi in the Ashanti Region, Ghana. In an ecological analysis, malaria incidence rates in the first year following IPTi were stratified by the village of residence and month of birth of participants and the spatiotemporal variation of the malaria incidence on the protective efficacy of IPTi was analysed.

Findings: The rate of malaria attacks during the first year of follow-up was highly dependent on the month of birth and on the village of residence of the children. Protective efficacy of the first IPTi administration (IPTi-1) correlated with malaria incidences in children living in a particular village or born in a particular month (r2 0.48, $p < 0.04$ and r2 0.63, $p < 0.003$, respectively). A corresponding trend was seen after the second (IPTi-2) and third (IPTi-3) drug administration.

Interpretation: Correlations between IPTi efficacy and malaria incidences may have implications on IPTi implementation strategies and, most likely, on that of other malaria control measures.

Influenza A: update on epidemiology, virology and pandemic preparedness planning

S83 The role of mathematical modelling in pandemic preparedness

S. Cauchemez, N.M. Ferguson (London, UK)

I will discuss the role mathematical modelling in pandemic planning and response. Recent research examining whether antiviral prophylaxis and social distance measures could be used to contain a nascent pandemic at its point of origin will then be reviewed. Containment is potentially feasible, but requires rapid detection of the initial transmissible case cluster and a rapid and organised response to each new case. These may be demanding criteria for much of SE Asia. If containment fails, slowing spread becomes a policy priority and in that context I will discuss the potential impact of restrictions on international travel. To conclude, I will discuss pandemic mitigation strategies which make best use of limited vaccine and antiviral supplies.

Infection in cancer patients (jointly arranged with the International Immunocompromised Host Society)

S84 Update on the epidemiology of infections in cancer patients

G. Maschmeyer (Potsdam, DE)

Infections are among the most frequent complications occurring in cancer patients undergoing antineoplastic chemo- or immunotherapy. Invasive fungal infections today represent the main causes of fatal outcome. Early diagnosis of probable or proven invasive aspergillosis is therefore one of the most important objectives of supportive care in patients with profound and prolonged neutropenia. With the advent of more effective and well-tolerated antifungals active against aspergillosis, the incidence of other mould infections such as zygomycosis is on the rise.

The use of highly aggressive chemotherapy induces severe mucosal damage in many cancer patients. Apart from neutropaenic enterocolitis, a broad spectrum of infections associated with impairment of mucosal barriers may be clinically important, e.g., streptococcal bacteraemia, septic enterococcal infection, or candidaemia. The widely spread use of multi-lumen central venous catheters causes a considerable number of bloodstream infections caused by coagulase-negative staphylococci, *S. aureus*, Gram-negative bacilli, or *Candida* spp. Primary removal of foreign material may be important for the successful management of these catheter-related infections.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning has become more common also for treatment of aggressive haematologic malignancies in elderly patients as well as in patients with severe co-morbidity, who formerly have not been taken into consideration for myeloablative transplant procedures. Despite a marked reduction of complications related to pancytopenia combined with acute graft-versus-host reaction, the rate of severe and life-threatening fungal infections and cytomegalovirus diseases has turned out to be comparable to conventional allogeneic transplantation. Most importantly, more than half of these infectious complications emerge after more than 90 days post transplant, i.e., in patients already managed on an outpatient basis.

C. guilliermondii, and *T. mucoides*), 100% were correctly classified for POS and only 7.7% were M for FLU (*T. mucoides*) and VM for VRC (*C. glabrata*). The % of strains with MIC discrepancies of no more than ±2-fold dilutions between both methods were 76.7, 68.6, 70.9, 54.6, and 81.2 for POS, FLU, VRC, AMB, and CAS, respectively.
Conclusions: Overall, ET correctly classified >97% of strains for azoles, and 85% of species with low susceptibility to FLU. ET is rapid, easy, and can determine the antifungal susceptibility of azoles against isolates from pts with fungaemia. J. Guinea is contracted by the Fondo de Investigación Sanitaria (contract number CM05/00171). This study was financed by grants from CIBER RES CD06/06/0058.

P2182 Comparison of *Candida* susceptibility testing between CLSI broth micro-dilution and Vitek AST-YS01 card

B.W.F. de Koning, M.W.H. Wulf, B. Janssen, C.M. Verduin (Veldhoven, NL)

Objective: To compare yeast susceptibility testing between CLSI broth micro dilution method with the VITEK 2 using the AST-YS01card (bioMerieux, Baumes-Les Grotte, France).
Materials and Methods: 82 clinical isolates were tested, among which 21 *Candida albicans*, 23 *C. glabrata*, and *Candida* sp. other than *albicans* or *glabrata*. CLSI Broth micro dilution method (M27-A) was performed in the following way. Micro dilution plates containing 100 µl of the twofold serial dilutions of the antifungal drugs in standard RPMI 1640 medium were inoculated with 100 µl of yeast suspension containing between 1.0×10^3 and 5×10^3 CFU/ml. Plates were incubated at 35ºC, and MICs were determined after 24 and 48 h. Reference MICs corresponded to the lowest drug dilution that showed prominent growth inhibition (50% or more). The VITEK 2 ST-YS01 card was used according to the manufacturers guidelines. The AST-YS01 card contains the antifungal agents Amphotericin B, Fluconazole, Flucytosine and Voriconazole in four dilutions Each card also contains an growth control. The total incubation time is maximal 36 hours.
Results: A total of 82 clinical isolates of 12 different *Candida* species were tested. For *Candida albicans* all isolates had similar values for all antifungals. For other *Candida* species, all isolates had identical MIC's for amphothericin B. 11 (13.4%) isolates had different MIC levels for fluconazol and in six (7.3%) instances this lead to a different interpretation of susceptibility. Five of these 11 isolates were *Candida glabrata* but only in one case this resulted in a major interpretation error (R > S). For flucytosine 2 of 82 (2.4%) isolates had discrepant values (2.4%) leading to different interpretation For voriconazole for 12 (14.6%) isolates different values were found but only in one instance this lead to a different interpretation.
Conclusions: The VITEK 2 is a reliable method for determining the susceptibility of *C. albicans*. For other yeast species the results for amphothericin B, flucytosine and voriconazole appear to be reliable but for fluconazol and *C. glabrata* have to be interpreted with caution.

Viral and fungal emerging infectious diseases

P2183 Preliminary evaluation of a commercially available rapid immunochromatographic method for the detection of IgM antibody response to chikungunya and dengue viruses

G. Rossini, F. Cavrini, L. Luconi, A. Pierro, N. Spataro, R. Angelini, F. Benini, V. Sambri (Bologna, Ravenna, IT)

Objectives: Chikungunya virus (CHIKV) belongs to the family of arthropod-borne viruses and it's transmitted to humans by Aedes mosquitoes in tropical and sub-tropical areas. In August 2007, the first epidemic outbreak within the territory of the EU has started in the province of Ravenna in North-Eastern Italy. Up to today more than 200 laboratory confirmed cases have been reported and more than 1000 patients underwent laboratory investigation. The large diffusion of Aedes albopictus (the tiger mosquito) in Northern and Central Italy was the condition that allowed the epidemic diffusion of CHIKV. The laboratory diagnosis is performed by detecting the viral RNA in blood by RT-PCR within the first 6 days after onset and by serological evaluation immediately after this period.
Methods: The presence of an IgM specific response to CHIKV and Dengue was evaluated by two different methods: immunofluorescence (IIFT) test (Euroimmun) and a newly available immunochromatographic (IC) method (CTK OnSite Duo) that is designed to distinguish between IgM response to CHIKV and Dengue. The samples used were obtained, during the recent outbreak, from 67 different patients with clinical and epidemiological evidence of suspected acute CHIKV infection (high fever and multiple arthralgia) living in the area of Ravenna.
Results: 45 samples were detected negative for IgM against CHIKV and Dengue by using IIFT and 50 specimens were scored as negative by IC. No IgM reaction against Dengue were detected. The use of IIFT allowed to identify as positive for CHIKV 22 samples but only 17 were confirmed with the IC method. The relative sensitivity of IC (versus IIFT chosen as the reference method) is 90%. The relative specificity of IC is 100%.
Conclusion: The use of a quick and simple test, like the IC evaluated in this study, could be proposed as a "field" method to rapidly discriminate the true CHIKV infections during epidemic outbreaks. The availability of a rapid response is useful for the appropriate targeting of the environmental interventions devoted to the control of vector mosquitoes. A correct environmental intervention has been demonstrated as the most efficacious methods to stop the spread of CHIKV during the recent outbreak in Italy. The use of "field" tests is not sufficient to achieve a correct diagnosis of CHIKV infection and the use of more sensitive laboratory tests such as IIFT is mandatory to confirm the clinical suspect.

P2184 Early diagnosis of dengue infection using blood and non-blood specimens: a pilot study

G. Suwanpimolkul, C. Pinyochotiwong, C. Kittitrakul, S. Krajiw, K. Arunyingmongkol, C. Pancharoen, U. Thisyakorn, W. Kulwichit (Bangkok, TH)

Objectives: Dengue infection is the most wide-spread mosquito-borne disease worldwide. Serologic diagnosis is often made retrospectively upon clinical recovery. Our group has demonstrated the value of late febrile and early postfebrile urine and oral specimens in dengue virologic and serologic diagnoses. In this study, we sought to determine clinical utility of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using early febrile blood and non-blood specimens for virologic diagnosis of dengue infection.
Methods: Adults with acute fever of no more than 3 days and without obvious organ-specific symptoms during June 2006 to October 2007 entered the study. Saliva, buccal brush, urine, plasma, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected and tested by dengue-specific RT-nested PCR with primers targeting conserved regions of the 3′ untranslated region of the virus. Where available, 3 consecutive specimens from febrile days 3, 4, and 5 were tested. Diagnosis of dengue infection was based on positive standard ELISA assay on paired serum/plasma specimens. Those with negative dengue ELISA tests served as a control group.

Specimens	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Urine	6/12 cases (50%)	12/12 cases (100%)	6/6 cases (100%)	12/18 cases (66.7%)
Saliva	4/12 cases (33.3%)	11/12 cases (91.7%)	4/5 cases (80%)	11/19 cases (57.9%)
Buccal brush	4/12 cases (33.3%)	11/12 cases (91.7%)	4/5 cases (80%)	11/19 cases (57.9%)
Plasma	12/12 cases (100%)	11/12 cases (91.7%)	12/13 cases (92.3%)	11/11 cases (100%)
PBMC	12/12 cases (100%)	11/12 cases (91.7%)	12/13 cases (92.3%)	11/11 cases (100%)
Saliva + Buccal brush	6/12 cases (50%)	11/12 cases (91.7%)	6/7 cases (85.7%)	11/17 cases (64.7%)
All non-blood specimens	9/12 cases (75%)	11/12 cases (91.7%)	9/10 cases (90%)	11/14 cases (91.7%)

Results: Of over 30 enrolled patients, 24 were eligible for analysis. Secondary dengue infection was diagnosed in 12 patients, leaving the other 12 as negative controls. The virus was detected in urine in half of the patients. The results were the same using both saliva and the buccal brush. With all non-blood specimens combined, three-fourths of the patients were detected. Plasma and PBMC both provided perfect yields (Table).
Conclusion: This is the first study demonstrating utility of both blood and non-blood specimens for early dengue virologic diagnosis. Even though this is only a pilot study, the results are promising. We are further performing the study in more patients. A similar study in paediatric patients is also under way.

P2185 Serum TNF-alpha and interleukin-4 (IL-4) levels in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever

S. Kinikli, N. Yilmaz, S. Cesur, C. Bulut, A. Aydemir, H. Irmak, A. Pekcan Demiroz, G. Kinikli (Ankara, TR)

Objectives: Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a zoonotic infection mainly transmitted by ticks. In Turkey, spordic and endemic CCHF cases have been reported.
The aim of this study is to compare serum TNF-alpha and interleukin-4 (IL-4) levels in patients diagnosed with CCHF with those in healthy controls.
Methods: Forty-two adult patients diagnosed with CCHF based upon clinical and laboratory findings and 40 healthy adult volunteeers were included in the study. The diagnosis of CCHF was made with IgM positivity or 4 fold increase in IgG titration and/or Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) positivity. In the sera of patient and control groups, TNF-alpha and IL-4 levels were measured according to recommendations of the manufacturer.
Serum TNF-alpha and IL-4 levels in patient and control groups were compared statistically by using Student's t test.
Results: Serum TNF-alpha and IL-4 levels were found to be significantly higher in patients with CCHF than those found in healthy controls (p:000, $p < 0.05$ significant). Results are shown in the Table.

Table. Serum TNF-α and IL-4 levels in patients with CCHF and healthy subjects

	Number	TNF-α (μg/ml)		IL-4 (μg/ml)	
		Median	Range (min–max)	Median	Range (min–max)
CCHF	42	15.01	6.98–70.86	1.07	0–5.6
Control	40	7.69	4.06–11.87	0.00	0.00–7.14

Conclusion: Tha fact that serum TNF-alpha, a proinflammatory cytokine, and IL-4, an anti-inflammatory cytokine, levels were found to be significantly higher in patients with CCHF than those in control group suggests that cellular immune response (Th1 and Th2) may play an important role in this disease. In order to determine the role of cytokines in the pathogenesis of CCHF, further studies with larger samples are required.

P2186 A survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in tick populations and wild-life animals in Turkey

A. Gargili, K. Midilli, Z. Vatansever, S. Ergin, A. Deniz, N. Selek Aysul, G. Yilmaz, K. Altas (Istanbul, Kars, Ankara, Aydin, TR)

Objectives: CCHF epidemic which was recognised in 2002 is still expanding regarding both of the clinical cases and geographical distribution in Turkey. The role of the vector ticks and wild-life animals was not studied nationwide. In this study, we aimed to clarify these aspects of the CCHF in Turkey.
Methods: A total of 3236 tick samples from the domestic and wild animals, and ground were collected from epidemic and non-epidemic centres from all of geographic regions of Turkey. The study was conducted between April through October 2006 and 2007. Blood samples were collected from 89 hunted wild boars and hares from exclusively epidemic regions throughout the year. Collected ticks were pooled as 5–20 samples according to their species and collection sites and screened for the presence of CCHF virus. Viral RNA was extracted from ticks and animal blood samples using commercial blood or/ tissue RNA extraction kits. Following reverse transcription, a part of CCHF virus S segment were amplified with specific primer sets by nested PCR amplification. PCR products of the positive samples were sequenced using ABI 310.
Results: Three of wild-boar blood samples, 2 of wild hare blood samples, 13 pools of ticks collected from hunted animals and 6 pools of ticks collected from domestic animals were found as positive for CCHF virus. Positive pools were encountered in both endemic and non-endemic sampling sites. Viral RNA was detected in Hyalomma marginatum, Rhipicephalus bursa, Boophilus annulatus and *Dermacentor marginatus* pools. In this study we obtained some interesting results; One of the wild boars hunted in early spring harboured CCHF virus, and we found viral RNA in an unfed *D. marginatus* sample which has not been previously shown to be involved in CCHF epidemiology in Turkey. Sequenced isolates were similar to those encountered previously, namely Europe II clade.
Conclusions: Based on the results of this study, CCHF virus is widely distributed in Turkey, including epidemic and non-epidemic centres. Although the role of migratory birds can not be excluded; wild-life animals and their ticks may play a major role for the propagation and spreading of the virus between domestic and wild animals and human populations. The positiviy of wild boars in early spring, and a tick species, *D. marginatus*, which is active throughout the year suggests that CCHF virus may maintained in wild-life also during the winter season in which the major vector ticks is non-active.

P2187 2007 outbreak of viral meningitis in Romania: cases managed in a national institute of infectious diseases

C. Popescu, V. Arama, R. Bacruban, A. Streinu-Cercel, A. Hristea, A. Abagiu, D. Antonica, N. Irimescu, M. Iosipenco, I. Badicut (Bucharest, RO)

In 1996 in south-eastern part of Romania a meningitis epidemic due to West Nile virus affected 863 persons. Therefore, in June 2007 when a new meningitis epidemic occurred we decided to perform a prospective analysis of these cases. We made a descriptive study about the cases admitted in our Institute.
Objective: to analyse the cases of meningitis in order to identify a possible aetiological agent.
Methods: we excluded the cases of bacterial meningitis (tuberculosis included). We analysed 132 cases of meningitis and the case definition was: fever, meningian syndrome and CSF with more than 7 leukocytes/mm3.
Results: Mean age was 23.8 years (between 14 and 72 years), the predominance of male, equivalent distribution regarding rural versus urban provenience and water distribution were described. Most of cases were admitted in August (40.15%) and in July (28.7%). Clinical description: moderate cases, without encephalitis syndrome, with moderate meningian syndrome in 46% of cases. 56 patients associated sinusitis, 65.9% had moderate increased level of fibrinogen and 15.9% had more than 12000 leucocytes /mmc. CSF examination showed in 95.3% of cases – less than 500 cells/mm3. CSF protein was increased but the value was below 2.5g/l for all patients (below 1g/l for 81.8% of cases). For 23 patients we isolated ECHO 4 virus from CSF. All the patients received pathogenic and symptomatic medication and the outcome was favourable in all the cases. This epidemic was different than that due to West Nile, which associated encephalitis, affected old people and had unfavourable outcome in 20% of cases.
Conclusions: 2007 viral meningitis epidemic affected young people, male, and outcome were favourable in all the cases.

Conclusions: This study contributes to the elucidation of the environmental distribution of *B. pseudomallei* in endemic tropical Australia and to the clarification of environmental factors influencing its occurrence. It also raises concerns that *B. pseudomallei* are spreading due to changes in land management.

O82 Concurrent multi-serotypic dengue infections in various body fluids

W. Kulwichit, S. Krajiw, D. Chansinghakul, G. Suwanpimolkul, O. Prommalikit, P. Suandork, J. Pupaibool, K. Arunyingmongkol, C. Pancharoen, U. Thisyakorn (Bangkok, TH)*

Objectives: Dengue virus infection is one of the rapidly-spreading emerging diseases worldwide. The virus is divided into 4 distinct serotypes with limited cross-protective immunity; therefore, one can be reinfected with different serotypes. While each episode is usually caused by a single serotype, an individual can occasionally be infected by concurrent multiple ones. Our group has previously detected dengue virus from urine and oral specimens of some patients. In this study, we sought to determine the characteristics of multi-serotype infections when analysing beyond the patients' blood compartments.
Methods: During 2003–2007, paediatric and adult patients suspected of dengue infections were enrolled. Plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), urine pellets, buccal brushes, and saliva were collected during and after the febrile episode. Only specimens from patients with both positive dengue serology and pan-dengue-specific RT-PCR were included. Serotype-specific RT-PCR was then performed on the aforementioned various specimens of each patient.
Results: 95 patients met the above criteria. Serotyping was successful in 85 patients. DEN-4 was the most common serotype, accounting for half of the cases. 20 of these 85 (23.5%) demonstrated multi-serotypic infections when combining data from all specimen types in each individual. Serotyping using single, conventional serum/plasma specimens, however, would detect only half of the cases. The phenomenon of concurrent multi-serotypic infections was present in all examined specimen types, including urine pellets, buccal brushes, and saliva. The most frequent combinations were DEN-1 + DEN-4 and DEN-2 + DEN-4 (5 cases each). Two patients were simultaneously infected by serotypes 1, 2, and 4 and one by serotypes 1, 3, and 4. There was no demonstrable significant difference in clinical severity between single- and multi-serotypic infections.
Conclusion: In a dengue-hyperendemic country with simultaneous circulation of all four serotypes, the phenomenon of concurrent multi-serotypic infections are more common than previously demonstrated by traditional serotyping on single serum/plasma specimens. This may be explained by the sensitivity limitation of the detection method or by biological behaviour of the virus. Our findings have an implication for potentially more accurate epidemiologic studies in the future, and for further exploratory investigations regarding dengue virus in various secretions and excretions.

O83 Emerging concepts about the evolutionary history of hantaviruses

H.J. Kang, S.N. Bennett, L. Sumibcay, S. Arai, A.G. Hope, J.A. Cook, J.W. Song, R. Yanagihara (Honolulu, Albuquerque, US; Tokyo, JP; Seoul, KR)*

Objective: Recent discovery of genetically distinct hantaviruses in shrews (family Soricidae), captured in widely separated geographic regions, challenges the conventional view that rodents are the principal and progenitor reservoir hosts of hantaviruses, and raises the possibility that other soricomorphs, notably moles (family Talpidae), harbour hantaviruses.
Methods: Using oligonucleotide primers based on conserved genomic regions of rodent- and soricid-borne hantaviruses, RNA extracts from tissues of the Japanese shrew mole (Urotrichus talpoides), American shrew mole (Neurotrichus gibbsii) and European common mole (Talpa europaea) were analyzed for hantavirus sequences by RT-PCR. Newfound S-, M- and L-segment sequences were aligned using Clustal W and were analyzed phylogenetically by the maximum-likelihood and Markov Chain Monte Carlo tree-sampling methods, with the GTR+I+G model of evolution.
Results: Novel hantavirus genomes, designated Asama virus (ASAV), Oxbow virus (OXBV) and Nova virus (NVAV), were detected in tissues of Urotrichus talpoides, Neurotrichus gibbsii and Talpa europaea, respectively. Sequence and phylogenetic analyses indicated that ASAV and OXBV were related to hantaviruses harboured by soricine shrews in Eurasia and North America, respectively. By contrast, phylogenetic analyses of full-length S- and L-segment sequences showed that NVAV formed a unique clade, clearly distinct and evolutionarily distant from all other hantaviruses. Despite the high degree of sequence divergence at the nucleotide and amino acid levels, the secondary structures of the nucleocapsid proteins, as well as the L-segment motifs, of the mole-associated hantaviruses were well conserved.
Conclusions: While cross-species transmission has influenced the course of hantavirus evolution, such host-switching events alone do not satisfactorily explain the co-existence and distribution of genetically distinct hantaviruses among species in two taxonomic orders of small mammals spanning four continents. When viewed within the context of molecular phylogeny and zoogeography, the close association between distinct hantavirus clades and specific subfamilies of rodents, shrews and moles is likely the result of alternating and variable periodic co-divergence at certain taxonomic levels through evolutionary time. Thus, the primeval hantavirus might have arisen from an insect-borne virus, with ancestral soricomorphs, rather than rodents, serving as the original mammalian hosts.

O84 High transmission of hepatitis E virus among piglets in farms from south-eastern France

M. Kaba, B. Davoust, J.L. Marié, M. Barthet, M. Henry, C. Tamalet, J.M. Rolain, D. Raoult, P. Colson (Marseille, Toulon, FR)*

Objectives: Autochthonous hepatitis E is currently considered as an emerging disease in industrialised countries and several studies suggest that hepatitis E is a zoonosis, especially in pigs, boars and deer. We aimed to study whether hepatitis E virus (HEV) is commonly present in domestic pigs in southern France, and to determine the relationship between HEV sequences detected from pigs and those described in human hepatitis E cases.
Methods: Serum and stools samples were collected from 207 three or six-month-old pigs from different regions of southern France. 107 six-month-old pigs were from a slaughterhouse, and 100 three-month-old pigs were from a pig farm. Swine IgG anti-HEV antibodies testing was performed using a commercial ELISA kit for clinical diagnosis with minor modifications. Swine HEV RNA detection was conducted by real-time PCR and amplification/sequencing assays using in house protocols targeting the 5′ORF2 region of the HEV genome.
Results: 40% of pigs were seropositive, and 65% of three-month-old pigs were HEV RNA-positive, whereas none of the six-month-old pigs were HEV RNA-positive. HEV RNA was significantly more frequently detected from stools than from serum (65% versus 22%; $p < 0.001$). Phylogenetic analysis showed that swine HEV sequences belong to genotype 3f or 3e and formed two clusters within which sequences showed high nucleotide homology (>97%). These clusters were correlated with the geographical origin of pigs as well as with their repartition into pens and buildings in the pig farm where samples were collected. Swine HEV sequences from the present study were genetically close to HEV sequences found from humans or swine in Europe, although no strong phylogenetic link could be observed neither with these latter sequences nor with those from human hepatitis E cases diagnosed in the laboratory.
Conclusion: Our data indicate that three-month-old farm pigs from southern France might represent a potential source of contamination to humans, and they underscore the great potential of HEV to cause epizootic infections in populations of farm pigs.

specific for VP7 and VP4 genes, using pools of G and P type specific primers. All strains (NIV/BRV/68, NIV/BRV/79, and NIV/BRV/86) were not typeable for the VP4 and VP7 genes.
After purification by "Qiaquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Germany), the VP4, VP6, VP7, and NSP4 first amplicons of the BoRV-A strains were subjected to sequence analysis with automated sequencer ABI 3130 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). Phylogenetic analysis was performed using MEGA version 4.0.
Results: The NIV/BRV/68, NIV/BRV/79, and NIV/BRV/86 strains exhibited long e-type, G8 and P[14] specificities for VP7 and VP4 genes respectively. By sequence analysis, the VP7 genes displayed high nucleotide (nt) and amino acid (aa) identities to Indian bovine B17 (nt-94.5–98.2% and aa-97.5–99.2%) and Egyptian human EGY2295 (nt-94.2–95.1% and aa-96.8–97.9%) strains, while the VP4 sequences were closely related to the Hungarian human Hun5 strain (nt-94.7–95.4% and aa-97.8–98.2%). The VP6 sequences were found to contain subgroup-I specificity and showed maximum identity with Indian porcine HP140 strain, while NSP4 belonged to genotype-A.
Phylogenetic analysis revealed human and porcine origin of VP4 and VP6 genes respectively, while bovine origin was confirmed by VP7 and NSP4 sequence analysis.
Conclusion: The Indian NIV/BRV/68, NIV/BRV/79, and NIV/BRV/86 strains could be the result of a reassortment between a Hun5-like human strain with P[14] specificity, long e-type and subgroup I, already circulating in Hungary, Italy, and a G8 bovine strain. The genetic relatedness of NIV/BRV strains to Hun5 provides direct evidence for the bovine origin of the VP4 and VP7 genes of human G8P[14] strains.

O508 Prolonged survival of dengue virus in blood and excretion in urine after clinical recovery

C. Laosakul, M. Sriprapun, K. Chaiyo, S. Krajiw, D. Chansinghakul, G. Suwanpimolkul, J. Pupaibool, K. Arunyingmongkol, C. Pancharoen, U. Thisyakorn, W. Kulwichit (Bangkok, TH)*

Objectives: Dengue is a flavivirus and is among the most widely-spread viral diseases. Our previous report demonstrates existence of live dengue virus in blood and urine even in the convalescent postfebrile period. In some cases, excretion in the patient's urine can be detected as late as 28 days after the onset of illness. This goes along with the model of West Nile virus, another type of flavivirus, which can be excreted in the urine for months after acute infection in both animal studies and human case report. Here we report a pilot study to address a magnitude of such findings.
Methods: Between April 2007 and October 2008, paediatric and adult febrile patients suspected of dengue infection were enrolled. Diagnosis of dengue was based on standard specific serology on paired sera. Patients with negative serology served as controls. Blood and urine specimens were collected at several time points. Whole blood was separated into plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). These have been aliquoted and used for earlier studies and some stored in freezers. Available plasma, PBMC, and urine were processed and inoculated into *Aedes aegypti*. Surviving mosquitoes at 14 days after inoculation were employed for viral detection by dengue-specific RT-PCR. Indirect fluorescence antibody (IFA) staining of mosquito heads was performed on all positive RT-PCR specimens, except for the one from PBMC (awaiting IFA result).
Results: 5 and 45 cases of primary and secondary infections, respectively, and 4 negative controls were included. These translated into 55 and 59 early and late dengue specimens, and 6 and 4 early and late negative-control counterparts, respectively. Dengue virus were isolated in some blood and urine specimens as late as 46 days after the onset of illness. No virus was isolated from control specimens. All but 5 positive RT-PCR specimens also demonstrated positive IFA. 4 out of 5 negatives were from early-phase specimens.
Conclusion: Our study demonstrates prolonged survival of dengue virus after clinical recovery. This finding has pathologic and epidemiologic significance, adding a potential role of urine in the transmission of the disease. Spread of the virus to humans might occur through infectious urine with help from arthropod vectors. This research could provide new insights into our understanding of the pathogenesis of DENV infection.

Isolation of dengue virus from blood and urine specimens during early (days 1–7 after onset of illness) and late (days 8–46) phases of infection (specimens with dengue isolated/total specimens for mosquito inoculation)

	Early phase	Late phase
Plasma	16/25 (64%)	0/13 (0%)
PBMC	not performed	1/2 (50%)
Urine	8/29 (28%)	12/44 (27%)
All specimens	24/54 (44%)	13/59 (22%)