การสำรวจหาเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบในยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งนก และแหล่งชุมชน

นางสาว สวรรยา ศรีภัทรานุสรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The surveys of Japanese encephalitis virus in mosquitoes from pig farms, bird colonies and human community

Miss Sawanya Sripatranusorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสำรวจหาเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบในยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งนก และแหล่งชุมชน
โดย	นางสาว สวรรยา ศรีภัทรานุสรณ์
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สนธยา เตียวศิริทรัพย์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉริยา ไศละสูต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สนธยา เตียวศิริทรัพย์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สวรรยา ศรีภัทรานุสรณ์ : การสำรวจหาเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบในยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งนก และแหล่งชุมชน. (The surveys of Japanese encephalitis virus in mosquitoes from pig farms, bird colonies and human community) **อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.น.สพ. ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.น.สพ. ดร. สนธยา เตียวศิริทรัพย์,** 76 หน้า.

ศึกษาการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ Japanese encephalitis (เจอี) ในตัวอย่างยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งนกธรรมชาติ และแหล่งชุมชน ในเขตจังหวัดนครสวรรค์โดยทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มสุกร จำนวน 100 pools จากแหล่งนกธรรมชาติ จำนวน 100 pools และจากแหล่งชุมชน จำนวน 24 pools (pool ละไม่เกิน 50 ตัว) ตรวจหาไวรัสเจอีโดยตรงด้วยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งตรวจพบเชื้อในตัวอย่างยุงจำนวน 1 ตัวอย่าง จากยุงในกลุ่ม *Culex vishnui* subgroup ที่ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งนกธรรมชาติเท่านั้น เมื่อนำตัวอย่างยุงที่ให้ผลลบด้วยวิธี RT-PCR มาทดสอบต่อด้วยการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงยุง C6/36 และเซลล์เพาะเลี้ยง vero cells และพิสูจน์เชื้อโดยวิธี immunocytochemistry staining ผลการทดสอบพบว่าให้ผลบวกจากแหล่งชุมชน แหล่งนก และฟาร์มสุกร เป็น 5/17, 5/37 และ 4/26 pools (pool ละไม่เกิน 250 ตัว) ตามลำดับจากยุง *Culex spp.* และ *Mansonia spp.* ในแหล่งชุมชน จากยุง *Mansonia spp.* ในแหล่งนก และจากยุง *Culex spp.* ในฟาร์มสุกร จากการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในตัวอย่างซีรั่มลูกสุกรยืนยันได้ว่าฟาร์มสุกรที่ทำการศึกษามี หลักฐานการติดเชื้อไวรัสเจอี

การติดเชื้อไวรัสเจอีในยุงจากแหล่งชุมชน แหล่งนก และฟาร์มสุกรพบจำนวนของยุง *Culex* spp. สูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Culex visnui* subgroup ที่พบว่าเป็นพาหะหลักในการนำเชื้อไวรัสเจอี จากแหล่งที่เกี่ยวข้องจากวงจร เชื้อไวรัสเจอีทั้งสามแหล่งการศึกษา รองลงมาคือ *Mansonia* spp., *Anopheles* spp. และ *Armigeres* spp. นอกจากนั้นยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเจอีได้จากยุง *Culex* spp. และ *Mansonia* spp. ในแหล่งชุมชน จากยุง *Mansonia* spp. ในแหล่งนกธรรมชาติ และจากยุง *Culex* spp. ในฟาร์มสุกร ในช่วงเดือนที่ทำการศึกษา และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเจอีในยุงจากช่วงเดือนต่างๆทั้งก่อน และ/หรือ ระหว่าง ฤดูฝน จากแหล่งต่างๆที่เกี่ยวข้องกับวงจรไวรัสเจอี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พยาธิวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....สวรรยา ศรีภัทรานุสรณ์.....

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....สนธยา เตียวศิริทรัพย์.....

4875570631 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEY WORD: Japanese encephalitis virus / mosquitoes / RT-PCR / immunocytochemistry staining

SAWANYA SRIPATRANUSORN : THE SURVEYS OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS IN MOSQUITOES FROM PIG FARMS, BIRD COLONIES AND HUMAN COMMUNITY. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC.PROF. KANISAK ORAVEERAKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST.PROF SONTHAYA TIAWSIRISUP, Ph.D., 76 pp.

Japanese Encephalitis virus (JEV) infection was investigated in mosquitoes collected from pig farms, bird colony, and human community in Nakornsawan province. A hundred pools of mosquitoes collected from pig farms, 100 pools collected from bird colony area and 24 pools collected from human community area were tested for JEV by using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ($\leq$ 50 mosquitoes per pool). Only one pool of *Culex vishnui* subgroup collected from the bird colony was positive for JEV. Negative samples were pooled ($\leq$ 250 same mosquitoes species collected from the same place at the same time) and were further tested by virus isolation and identification. Virus isolation were performed by using mosquito cell line (C6/36) with secondary passage in African green monkey kidney cell line (Vero cells). Specific virus antigen was identified by immunocytochemistry staining with JEV-specific monoclonal antibody. We identified five (5/17), five (5/37) and four (4/26) positive pools from human community, bird colony and pig farms, respectively. It appeared that *Culex* spp. and *Mansonia* spp. pools collected from the human community, *Mansonia* spp. collected from the bird colony and *Culex* spp. collected from pig farms were the species of mosquitoes with positive results for JEV. In addition, the JE seroprevalence by haemagglutination inhibition test was confirmed among the swine farms studied.

In conclusion, the most collected mosquitoe species from the 3 study areas were *Culex* spp. particularly *Culex vishnui* subgroup which is known as the main vector of JEV. The positive mosquito samples found in this study were *Culex* spp. and *Mansonia* spp. from human community, *Mansonia* spp. from bird colony area and *Culex* spp. from pig farms. These positive mosquito samples were collected before and/or between Thailand's rainy season.

Department : Veterinary Pathology
Field of study: Veterinary Pathobiology
Academic year 2008

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานต่างๆดังนี้

รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. คณิศักดิ์ อรวีระกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สนธยา เตียวศิริทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ประวีณา กิตติคุณ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือความรู้คำปรึกษาและคำแนะนำในงานวิจัยนี้

อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง จุฑาทิพย์ เขียวเจริญ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำในงานวิจัยนี้

คณาจารย์ทุกท่านในคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

คุณสุมิตรา วัฒโนดร และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ตลอดจนคำแนะนำในการวิจัยนี้

หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ในการทำการวิจัย

เจ้าหน้าที่จากฟาร์มสุกรในเขตจังหวัดนครสวรรค์ ที่กรุณาช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง

เพื่อนนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆตลอดการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....4
- สมมติฐานงานวิจัย.....4
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
- แนวคิดงานวิจัย.....5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

- เชื้อไวรัส..... 7
- ระบาดวิทยา.....12
- การติดต่อของโรค.....16
- พยาธิกำเนิด.....22
- อาการของโรค.....23
- การวินิจฉัยโรค.....24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ..... 25

- เซลล์เพาะเลี้ยง.....25
- เชื้อไวรัส.....25
- ตัวอย่างยุง.....26
- ตัวอย่างเลือดสุกร.....26
- การตรวจหาระดับแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบด้วย วิธีฮีแมกลูติเนชั่นอินฮิบิชั่น (Haemagglutination inhibition test).....26
- Viral extraction.....27
- การสกัด RNA จากตัวอย่าง.....27
- Reverse transcriptase polymerase chain reaction.....28

หน้า

- การตรวจหา RT-PCR product……..29
- ทดสอบความไวของ primer C/preM ต่อ JE โดย RT-PCR……..29
- Viral isolation……29
- Immunocytochemistry staining……..30
- การวิเคราะห์ข้อมูล……..30

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 31
- การแยกชนิดยุง……31
- การตรวจหาไวรัสเจอีจากยุงโดยตรง……...37
- ความไวของ primer C/pre M โดย RT-PCR……..41
- การตรวจหาระดับแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบด้วย วิธีฮีแมกลูติเนชั่นอินฮิบิชั่น (Haemagglutination inhibition test)……..42
- ผลการแยกพิสูจน์เชื้อไวรัสเจอีในเซลส์เพาะเลี้ยงและ Immunocytochemistry staining……45

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....51

รายการอ้างอิง..... 57

ภาคผนวก..... 70

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตาราง 1 แสดงเชื้อในกลุ่ม flavivirus ที่มีการติดต่อผ่านทางยุง
ของโรคในสัตว์และโรคที่ติดต่อสู่คน.....8
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนยุง (เปอร์เซ็นต์) ชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งชุมชน
ในเดือน เมษายน – ตุลาคม พ.ศ. 2550 ในเขตจังหวัดนครสวรรค์ 32
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนยุง (เปอร์เซ็นต์) ชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งนก
ในเดือน มีนาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2550 ในเขตจังหวัดนครสวรรค์.....33
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนยุง (เปอร์เซ็นต์) ชนิดต่างๆที่ดักได้จากฟาร์มสุกร 2 แห่ง
ในเดือน เมษายน – ตุลาคม พ.ศ. 2550 ในเขตจังหวัดนครสวรรค์.....34
ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเจอีจากตัวอย่างยุงโดยตรง
ที่ดักได้จากแหล่งชุมชนด้วยวิธี RT-PCR (จำนวน 24 pools).....38
ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเจอีจากตัวอย่างยุงโดยตรง
ที่ดักได้จากแหล่งนกด้วยวิธี RT-PCR (จำนวน 100 pools).....39
ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเจอีจากตัวอย่างยุงโดยตรง
ที่ดักได้จากฟาร์มสุกรด้วยวิธี RT-PCR (จำนวน 100 pools).....40
ตารางที่ 8 แสดงระดับภูมิคุ้มกันต่อ HI ของเชื้อไวรัสเจอีในลูกสุกร
จากฟาร์มสุกรพันธุ์ ที่ทำการศึกษาจำนวน 2 ฟาร์มในจังหวัดนครสวรรค์ 43
ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อ และย้อมพิสูจน์ไวรัสเจอีด้วย
Immunocytochemistry staining ในยุงจากแหล่งชุมชน จำนวน 17 pools.....46
ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อ และย้อมพิสูจน์ไวรัสเจอีด้วย
Immunocytochemistry staining ในยุงจากแหล่งนก จำนวน 37 pools.....47
ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อ และย้อมพิสูจน์ไวรัสเจอีด้วย
Immunocytochemistry staining ในยุงจากฟาร์มสุกร จำนวน 26 pools.....48

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

ภาพที่ 1 แสดงแบบจำลองการจัดเรียงต่อและแสดงการสร้างโปรตีนของ Flavivirus……...10

ภาพที่ 2 แสดงการแพร่กระจายของ genotype ของเชื้อเจอีในประเทศต่างๆ ……...11

ภาพที่ 3 แสดงวงจรการติดต่อของเชื้อเจอีโดยมียุงเป็นพาหะ……...16

ภาพที่ 4 แสดงรูปแบบการย้ายถิ่นของนกใน East Asian-Australasian region……..20

ภาพที่ 5 แสดงร้อยละปริมาณยุงชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งชุมชนแยกตามสกุล
ในเดือน เมษายน – ตุลาคม……..……35

ภาพที่ 6 แสดงร้อยละปริมาณยุงชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งนกธรรมชาติแยกตามสกุล
ในเดือนมีนาคม – ตุลาคม……35

ภาพที่ 7 แสดงร้อยละปริมาณยุงชนิดต่างๆที่ดักได้จากฟาร์มสุกรแยกตามสกุล
ในเดือน เมษายน – ตุลาคม……..36

ภาพที่ 8 แสดงร้อยละปริมาณยุงเปรียบเทียบจาก 3 แหล่งการศึกษา โดยแยกตามสกุล…….36

ภาพที่ 9 แสดงความไวของ primer C/pre M ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเจอี โดยวิธี RT-PCR……41

ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอี โดยวิธี haemagglutination
inhibition test ในลูกสุกร จาก ฟาร์มสุกร 2 ฟาร์มในจังหวัดนครสวรรค์……..….44

ภาพที่ 11 แสดงการติดสีของเชื้อไวรัสเจอีในการทำ Immunocytochemistry staining……..49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้สมองอักเสบเกิดจากเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus : JEV) โรคไข้สมองอักเสบเป็นโรคที่สร้างความเสียหายทางระบบประสาทในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมทั้งในคนด้วย ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีเป็น single stranded RNA virus สายบวก จัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* เชื้อนี้อยู่ในกลุ่ม Japanese encephalitis sero-complex ซึ่งไวรัสอื่นในกลุ่มนี้ได้แก่เชื้อ West Nile virus (WNV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), Usutu virus (USUV), Koutango virus (KOUV), Cacipacore virus (CPCV), Alfuy virus (ALFV) และ Yaounde virus (YAOV) (Campbell et al., 2002) โรคไข้สมองอักเสบเจอีนี้เป็นปัญหาหลักทางสุขภาพของแถบเอเชียที่สำคัญ เป็นโรคที่มีการแพร่กระจายในแถบเอเชียและถือเป็นโรคติดต่อเฉพาะถิ่น (endemic) ในแถบเอเชียตะวันออก (ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (พม่า ไทย ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์) และเอเชียใต้ (เนปาล อินเดีย ศรีลังกา) พบได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด มักแสดงอาการในคนและม้า แต่เมื่อเกิดการติดเชื้อไม่สามารถแพร่กระจายโรคต่อไปได้ (Mackenzie et al., 2001)

การระบาดครั้งแรกของโรคไข้สมองอักเสบในประเทศไทยเกิดขึ้นทางตอนเหนือของประเทศในปี ค.ศ. 1964 จากนั้นมีการระบาดใหญ่ในปี ค.ศ. 1969 (Yamada et al., 1971) โดยในช่วงปี ค.ศ. 1969 - 1988 พบการติดเชื้อโรคสมองอักเสบในคน (encephalitis) 1,500 - 2,500 รายต่อปี คิดเป็นอัตรา 3 - 5 คนต่อประชากร 100,000 คน โดยพบผู้ป่วยสมองอักเสบทางตอนเหนือของประเทศมากที่สุด ในปี ค.ศ. 1987 ได้ทำการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มพบว่าระดับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยจำนวน 50 % ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ ซึ่งผู้ป่วยจำนวน 74 % เป็นเด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปี และจำนวน 20% เป็นเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี ในขณะที่ 4% เป็นเด็กอ่อน (Chunsuttiwat, 1989) ในปี ค.ศ. 2004 มีรายงานการเกิด encephalitis ในประเทศไทยจำนวน 297 ราย เสียชีวิต 14 ราย พบว่าเกิดจากไข้สมองอักเสบเจอี เป็นจำนวน 258 ราย เสียชีวิต 13 ราย และในปี ค.ศ. 2005 มีผู้ป่วยจาก encephalitis 346 ราย เสียชีวิต 24 ราย เกิดจาก Japanese encephalitis เป็นจำนวน 78 ราย แต่ไม่มีผู้เสียชีวิต (กรมควบคุมโรค, 2005)

โรคไข้สมองอักเสบเจอีสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วผ่านทางยุง โดยยุงถือว่าเป็นพาหะที่สำคัญ (vector) ซึ่งยุงที่เป็นพาหะหลักที่นำเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในประเทศไทยคือยุง *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus* และ *Culex fuscocephala* (Chunsuttiwat, 1989) โดยยุงเหล่านี้สามารถพบได้ทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2515 มีรายงานการแยกเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีจากยุง *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* เป็นครั้งแรกจากทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย (Simasathien et al., 1972)

สุกรถือว่าเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญ โดยสุกรจะเป็นตัวเก็บกักและเพิ่มจำนวนของเชื้อ (amplifying host) ในลูกสุกรพบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในในช่วง 2-3 วันหลังการติดเชื้อ และจะยังปรากฏไวรัสในกระแสเลือด (viremia) อยู่ปริมาณสูงนานกว่า 2-4 วัน ยุงจะได้รับเชื้อจากการดูดเลือดสุกรที่มีเชื้อในกระแสเลือด และมีการเพิ่มจำนวนไวรัสในตัวยุง (biological vector) ซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังสุกรหรือโฮสต์อื่นๆได้ (Joo and Chu, 1999) โดยในประเทศไทย มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นในแถบภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ซึ่งพบว่าการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีจากฟาร์มในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมทั้งจังหวัดชลบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์มีระดับค่อนข้างสูงคือ 91.67 - 99.25 % ส่วนในสุกรสาวพบมีอัตราการติดเชื้อ 76.92 % ในช่วงฤดูหนาว และจะเพิ่มขึ้นในฤดูร้อนเป็น 92.11 % และ ฤดูฝนเป็น 100 % สำหรับอัตราความชุกของการติดเชื้อในกลุ่มสุกรพ่อแม่พันธุ์ในแต่ละฟาร์มพบได้ตั้งแต่ 73.34 – 100 % ซึ่งกระจายอยู่ตามพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ (คณิศักดิ์ และคณะ, 1998)

นกถือว่าเป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติที่สามารถกระจายเชื้อรวมถึงเพิ่มจำนวนเชื้อได้เช่นกัน โดยเฉพาะนกน้ำ (ardeid birds) (Thenmozhi et al., 2006) ชนิด heron และ egret (Family *Ardeidae*) พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับวงจรการติดเชื้อตามธรรมชาติของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในประเทศญี่ปุ่น (Rosenberg et al., 1953) Buescher และคณะ (1959b) ได้รายงานการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบในนกป่า โดยการสำรวจระดับ neutralizing antibody ในปี ค.ศ. 1952 - 1956 โดยพบว่านกในตระกูล *Ardeidae* มีการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีแฝงอยู่ รวมถึงมีการติดเชื้อในลูกนกที่อยู่ในรังอีกด้วย นอกจากนั้นยังพบว่ายุง *Culex tritaeniorhynchus* ที่ติดเชื้อสามารถแพร่เชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีไปสู่นกได้ ซึ่งการติดเชื้อจะพบในช่วงปลายเดือนมิถุนายนถึงต้นเดือนสิงหาคม และ Solomon และคณะ (2003) พบว่านกเหล่านี้เป็นตัวการสำคัญในการนำเชื้อไวรัสไปสู่แหล่งอื่นๆ ร่วมกับการที่นก Asiatic cattle egret (*Bubulcus ibis coromandus*) ได้แพร่กระจายทั่วเอเชียเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางเกษตรกรรมในช่วงศตวรรษที่ 19 ร่วมกับการระบาดของเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีที่เกิดขึ้นในแถบเอเชีย ในประเทศอินเดียเมื่อทำการตรวจทางซีรั่มวิทยาจากการดักนกป่า จากเมือง Krishna-Godavari Delta ของรัฐ Andhra

Pradesh พบว่า มีระดับ neutralizing antibody ต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ 188 ตัวอย่าง จาก 866 ตัวอย่าง และยังพบว่านกที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบนั้น 35.1% และ 35.4 % เป็นนกในตระกูล *Ardeidae* คือ *Ardeola grayii* (pond heron) และ *Bubulcus ibis* (cattle egret) ตามลำดับ (Rodrigues et al., 1981)

ในขณะที่คนและม้าถือว่าเป็น dead-end host คือ เมื่อเกิดการติดเชื้อแล้วจะไม่แพร่กระจายเชื้อตามวงจรของโรค เมื่อยุงกัดคนหรือม้าที่ติดเชื้อ ยุงนั้นจะไม่เกิดการติดเชื้อ เนื่องจากในคนหรือม้านั้น มีระยะการติดเชื้อในกระแสเลือดสั้นและมีปริมาณเชื้อในกระแสเลือดในระดับต่ำ เมื่อคนและม้าได้รับเชื้อส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการของโรค ในขณะที่บางส่วนจะพัฒนาอาการจนถึงขั้นรุนแรงและอาจตายได้ พบอัตราการตายในม้าคือ 5 % โดยม้าจะ มีไข้ เบื่ออาหาร และแสดงอาการทางระบบประสาท เช่น อาการอ่อนแรง ชัก และอาจตายได้ (Yamanaka et al., 2006)

อัตราการตายของผู้ป่วยด้วยโรคไข้สมองอักเสบเจอีคือ 30 % แต่มีผู้ที่เกิดความผิดปกติระยะยาวจากการติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอี (Solomon, 2003, , 2004) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้แก่ ความผิดปกติทางพฤติกรรม ความสามารถในการเรียนรู้ลดลง ซึ่งอาการดังกล่าวอาจต้องใช้เวลาหลายปีจึงจะสังเกตเห็นได้ (Lam et al., 2005) พบว่าในแถบที่มีโรคไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีแพร่กระจายอยู่เป็น endemic ผู้ที่ติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีมักจะไม่แสดงอาการ (asymptomatic) ส่วนอาการแสดงของการติดเชื้อโดยทั่วไปคือ มีอาการไข้ (โดยทั่วไปจะมากกว่า 41°C) ปวดศีรษะ และอาการสับสน (confusion) (Miyake, 1964; Solomon et al., 2000) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีนี้มักแสดงอาการในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปี

ในปัจจุบันเริ่มมีการอุบัติซ้ำของโรคไข้สมองอักเสบเจอีในประเทศต่างๆ เช่น อินเดีย (Thenmozhi et al., 2006) ญี่ปุ่น (Yamanaka et al., 2006) ออสเตรเลีย (Van Den Hurk et al., 2006) เวียดนาม (Bryant et al., 2005) กัมพูชา (Srey et al., 2002) มาเลเซียและอินโดนีเซีย (Nga et al., 2004; Pyke et al., 2001) ประเทศไทยจึงมีโอกาสที่จะมีการระบาดซ้ำได้เช่นเดียวกันกับประเทศอื่นๆ เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคที่ติดต่อผ่านทางยุงซึ่งสามารถติดต่อได้ง่าย ประกอบกับการที่ในประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่ร้อนชื้นซึ่งเหมาะแก่การแพร่พันธุ์ของยุง มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่นแตกต่างกันกระจายอยู่ทั่วประเทศ รวมทั้งยังมีนกอพยพจากแหล่งต่างๆ เข้ามา อาจเป็นการแพร่เชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบใหม่หรือทำให้มีตัวเชื้อวนเวียนอยู่ทำให้มีการอุบัติซ้ำของโรคนี้ได้ เนื่องจากการศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีในยุงในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อยทำให้ไม่ทราบถึงการกระจายของโรค ส่งผลให้การทำโปรแกรมการควบคุมโรคไข้สมองอักเสบ

เจอีค่อนข้างลำบาก นอกจากการให้ความรู้ในเรื่องโรค สุขภาพ และคำแนะนำในการกำจัดแมลงโดยใช้ยากำจัดแมลง

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีจากยุงที่พบใน ฟาร์มสุกร แหล่งชุมชน และแหล่งนกธรรมชาติ โดยเลือกพื้นที่ จังหวัด นครสวรรค์ ซึ่งมีองค์ประกอบของสถานที่ครบทั้ง 3 แหล่ง ในการศึกษา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสำรวจการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งชุมชน และจากแหล่งนกธรรมชาติในเขตจังหวัดนครสวรรค์

สมมติฐานงานวิจัย

ยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งชุมชน และแหล่งนกในเขตจังหวัดนครสวรรค์ มีการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงอัตราการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในยุงชนิดต่างๆ ในจังหวัดนครสวรรค์
2. ทำให้ทราบบทบาทของฟาร์มสุกร แหล่งนกธรรมชาติ ต่อการติดต่อแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในแหล่งชุมชนในพื้นที่ใกล้เคียง
3. เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังหรือวางแผนป้องกันการระบาดไปถึงประชากรกลุ่มเสี่ยง

แนวคิดงานวิจัย

เก็บตัวอย่างยุงจากฟาร์มสุกร แหล่งนกธรรมชาติและ แหล่งชุมชนในจังหวัดนครสวรรค์ โดยใช้เครื่องจับยุงที่มีหลอดไฟ และคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำแข็งแห้ง เป็นตัวล่อ

นำตัวอย่างยุงมาทำการแยกชนิด (species) และเพศของยุง โดยการดูลักษณะภายนอก (morphology) เลือกแต่เพศเมีย จากนั้นแบ่งยุงออกเป็นกลุ่ม (Pool) ตามชนิดของยุงโดยกำหนดขนาดตัวอย่างจากฟาร์มสุกร และแหล่งนกแหล่งละ 100 pools และแหล่งชุมชนจำนวน 24 pool ซึ่งแต่ละ pool ประกอบด้วยยุงไม่เกิน 50 ตัว

กลุ่มตัวอย่างยุงถูกนำมาหาเชื้อไวรัสเจอี โดย RT-PCR

ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะถูกนำมาเพิ่มจำนวน ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 cell (passage I) และ Vero cells (passage II) แล้วทำการทดสอบโดย Immunocytochemistry staining

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของชนิดยุงและอัตราการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในฟาร์มสุกร แหล่งนก และแหล่งชุมชน

** และทำการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรเพื่อตรวจทาง serology โดยวิธี Hemagglutination inhibition test (HI) เพื่อยืนยันการติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีในฟาร์มสุกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเกิดโรคไข้สมองอักเสบจากเชื้อไวรัสมักมีการนำโดย Arthropod จึงมีการจัดกลุ่มเรียกไวรัสที่เป็นสาเหตุนี้ว่า Arbovirus ซึ่งโรคไข้สมองอักเสบจากเชื้อไวรัส Japanese encephalitis (JE) เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อ viral encephalitis ในแถบเขตร้อนชื้น (tropical region) ของเอเชีย เป็นรูปแบบการระบาดทั้งแบบ epidemic และ endemic encephalitis พบได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด ได้แก่ ม้า โค กระบือ แกะ แพะ และ สุกร เป็นต้น (Mackenzie et al., 2001) และยังเชื่อว่าโรคไข้สมองอักเสบจากเชื้อเจอีนี้เป็นสาเหตุการเกิดไข้สมองอักเสบในคนทุกปีปีละกว่า 40,000 รายอีกด้วย ซึ่งพบว่ามีอย่างน้อย 10,000 รายที่เสียชีวิต (Tsai, 2000) ปัจจุบันยังพบว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดการติดเชื้อทางระบบประสาทในเด็กแถบเอเชียอีกด้วย (Halstead and Jacobson, 2003)

ในอดีตการระบาดของ Japanese encephalitis virus (เชื้อไวรัสเจอี) ครั้งใหญ่ครั้งแรกเกิดขึ้นที่ประเทศญี่ปุ่นในช่วงปี ค.ศ. 1924 พบว่ามีการติดเชื้อกว่า 6,000 รายและมีอัตราการตายถึง 60 % สามารถแยกเชื้อเจอีสายพันธุ์ Nagayama ได้เป็นครั้งแรกจากสมองคนที่ประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1934 จากนั้นในปีเดียวกันสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากยุง *Culex tritaeniorhynchus* (Burke and Leake,1988; Monath, 1988) ในปี ค.ศ. 1954 พบการติดเชื้อของไวรัสนี้ได้ในสุกร โค สุนัข และแกะ (Pond et al., 1954) จากนั้นมีรายงานการพบการติดเชื้อที่มากขึ้นในม้าในประเทศจีน และการติดเชื้อในคนที่ประเทศ อินเดีย เนปาล ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ทางตอนเหนือของประเทศไทย เวียดนาม และ พม่า นอกจากนั้นยังพบการระบาดของเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีในประเทศออสเตรเลียด้วย (Hanna et al., 1999; Hanna et al., 1996) พบว่าเชื้อเจอีเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคสมองอักเสบในประเทศเวียดนาม (Bryant et al., 2005) และกัมพูชา อีกด้วย (Srey et al., 2002) โดยในแถบเอเชียนั้น โรคไข้สมองอักเสบเจอีนี้ ถือว่าเป็นโรคติดต่อเฉพาะถิ่น (endemic) ในแถบเอเชียตะวันออก (ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (พม่า ไทย ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์) และเอเชียใต้ (เนปาล อินเดีย ศรีลังกา)

โรคไข้สมองอักเสบจากเชื้อไวรัสเจอี นี้เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonotic disease) ซึ่งเชื้อไวรัสเจอีคงอยู่ในธรรมชาติโดยผ่านวงจร นก-ยุง-นก หรือ สุกร-ยุง-สุกร ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าสุกรและนกนั้นเป็นสัตว์รังโรคหลักที่สำคัญของเชื้อไวรัสเจอี ซึ่งเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในตัวสัตว์

ได้ สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นเช่น ม้า และโดยเฉพาะคนนั้นถือเป็น Dead-end host คือตัวเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้โฮสต์เหล่านี้ในระดับต่ำหรือไม่เพิ่มจำนวนเชื้อเลย และการติดเชื้อมีระยะเวลาที่สั้นจึงไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่สัตว์อื่นได้ ส่วนยุงนั้นถือว่าเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญที่เป็นตัวช่วยการแพร่กระจายของเชื้อให้เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นเชื้อยังสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อได้ที่ต่อมน้ำลายของยุงอีกด้วย (Kabilan et al., 2004)

เชื้อไวรัส

โรค Japanese encephalitis เป็นโรคไข้สมองอักเสบ มีสาเหตุมาจากเชื้อ Japanese encephalitis virus (JEV:เจอี) ซึ่งเชื้อไวรัสนี้จัดอยู่ในสกุล Flavivirus ตระกูล *Flaviviridae* ซึ่งเชื้อนี้อยู่ในกลุ่ม Japanese encephalitis sero-complex ไวรัสอื่นในกลุ่มนี้ได้แก่ West Nile virus (WNV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), Usutu virus (USUV), Koutango virus (KOUV), Cacipacore virus (CPCV), Alfuy virus (ALFV) และ Yaounde virus (YAOV) (Campbell et al., 2002; Cao et al., 1995; Mackenzie et al., 2002) ไวรัสในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่แพร่กระจายผ่านทางยุง (ตารางที่ 1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

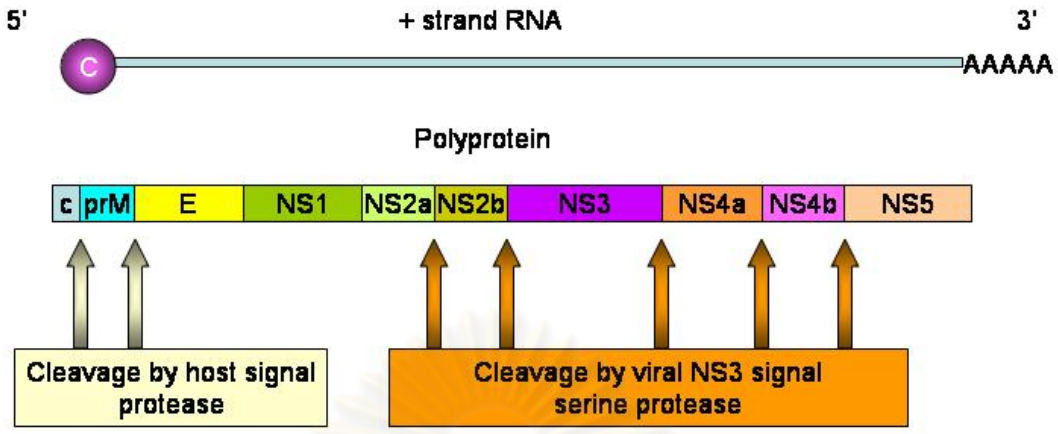
ตารางที่ 1 แสดงเชื้อในกลุ่ม flavivirus ในสัตว์และโรคที่ติดต่อสู่คนที่มีการติดต่อผ่านทางยุง (ดัดแปลงจาก Burke et al., 2001)

Virus	Reservoir Host	Mode of Transmission	Disease in Domestic Animals (or Humans)	Geographic Distribution
Japanese encephalitis virus	Swine, humans, Birds	Mosquitoes : Culex tritaeniorhyncus	Abortion, neonatal disease(encephalitis)	Asia
Murray Vally Encephalitis virus	Humans, birds	Mosquitoes : Culex annulirostris	Encephalitis	Australia, New Guinea
St. Louis encephalitis virus	Humans, birds	Mosquitoes : Culex tarsalis, Culex pipiens, Culex nigripalpus, Culex spp.	Encephalitis	United States, Canada, Central and South America
West Nile virus	Humans, birds	Mosquitoes : Culex pipiens Culex spp., Aedes spp., Ochlerotatus spp.	Fever with rash, rarely Arthralgia or encephalitis	Mediteranean,France, Asia, Portugal, United States, Africa, CIS, Russia
Denge 1, 2, 3, 4 viruses	Humans, Primates	Mosquitoes : Aedes aegypti, Aedes albopictus	Fever and rash, Arthralgia myalgia or Encephalitis	Tropics worldwide
Wesselsbron virus	Sheep	Mosquitoes	Generalized infection, Abortion	Africa
Yellow fever virus	Humans, Primates	Mosquitoes : Aedes aegypti, Aedes africanus, Aedes spp.	Hepatitis, Haemorrhagic Fever	Tropical Africa and America

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อไวรัสเจอี มีลักษณะสายพันธุกรรมเป็นแบบ single-stranded RNA สายบวกที่มี cap ที่ ปลายด้าน 5' และที่ปลายด้าน 3' ไม่มี polyadenylation ตัวเชื้อประกอบด้วยยีโนมที่มีขนาดประมาณ 11 กิโลเบส ประกอบด้วย 1 open reading frame ที่สร้าง polyprotein ที่มีขนาดประมาณ 3,400 กรดอะมิโน โดย polyprotein นี้จะถูกตัด (cleaved) และผ่านกระบวนการการ co- และ post-translation โดยอาศัยเอนไซม์ protease จากโฮสต์และจากไวรัสเอง ได้เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural proteins) ดังต่อไปนี้ โปรตีนโครงสร้างสามชนิด (capsid, C; membrane, M; และ envelope; E) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง 7 ชนิด (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5) โดยโปรตีนของเชื้อไวรัสเจอีนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ flavivirus อื่นๆทั้งในแง่ของรูปร่างและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (Hashimoto et al., 1988; Kaur and Vrati, 2003; Sumiyoshi et al., 1987)

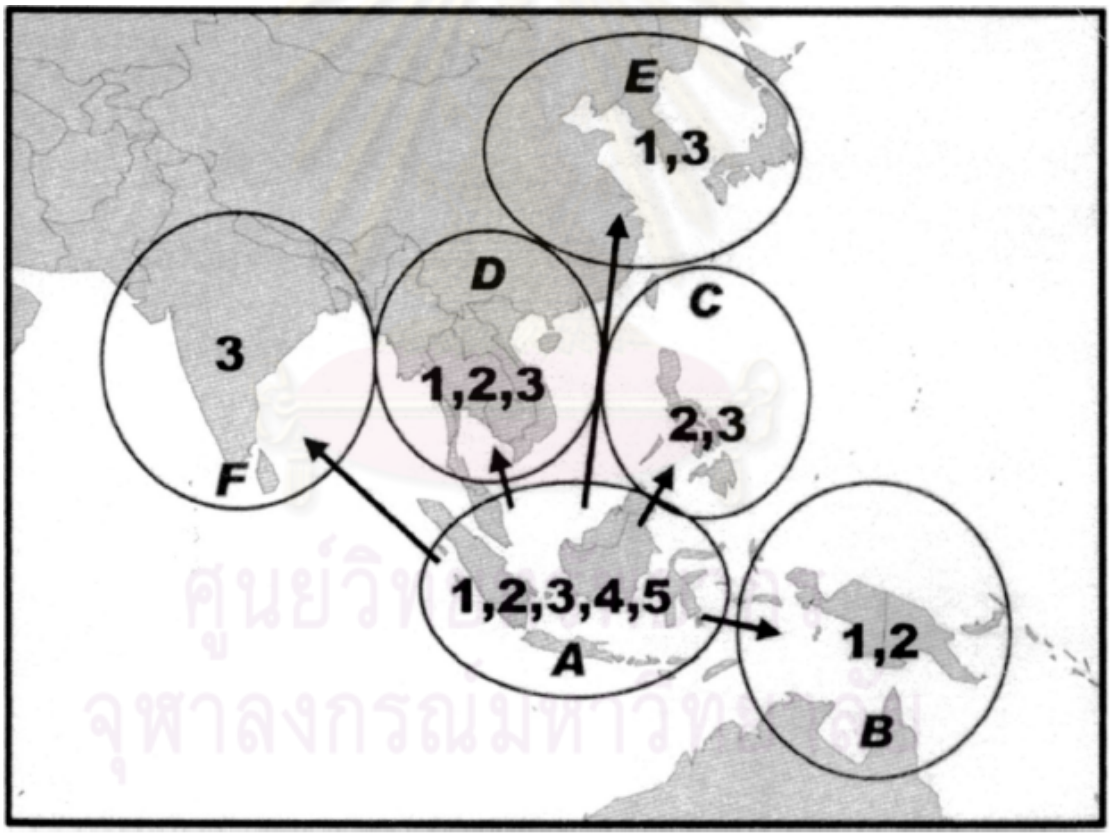
โปรตีนที่พื้นผิว E, pr M/M และ nucleocapsid C protein จะเป็นปลอกหุ้มยีโนมของเชื้อไวรัส Capsid เป็นโปรตีนโครงสร้างที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง nucleocapsid ของเชื้อไวรัส ในขณะที่ envelope จะประกอบด้วย prM และ โปรตีน E (Lindenbach and Rice, 2003) โปรตีนโครงสร้างในส่วนของ prM มีขนาดประมาณ 165 กรดอะมิโน จะถูกสร้างขึ้นใน endoplasmic reticulum โดย signal peptidase ของโฮสต์ เป็น ไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วย 2 transmembrane helices ทำหน้าที่คล้ายเป็นตัวหลักในการ folding และ assembly ของโปรตีน E สำหรับโปรตีนโครงสร้างในส่วน โปรตีน E มีรูปแบบเป็น icosahedral protein shell มีขนาดประมาณ 495 กรดอะมิโน ที่ประกอบด้วย cellular receptor-binding site และ fusion peptide (Mukhopadhyay et al., 2005) มีความเกี่ยวข้องในขั้นตอนการ attachment และการเชื่อม (fusion) ของไวรัส envelope เข้ากับ plasma membrance ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (Heinz et al., 2004) สำหรับในส่วนของโปรตีนที่ไม่ใช่โครงร่าง NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS5 เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ในขณะที่ขั้นตอน translation และ polyprotein processing นั้นเกี่ยวข้องกับ NS2B, NS3, NS4 และ NS5 ส่วน NS3 เป็นส่วนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับสองของเชื้อ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ protease, helicase และ RNA triphosphatase (McMinn, 1997) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงแบบจำลองการจัดเรียงต่อและแสดงโครงสร้างโปรตีนของ Flavivirus

เชื้อไวรัสเจอีสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 genotypes ตามภูมิศาสตร์ที่แยกเชื้อได้ โดยยึดตามความแตกต่างทางนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันมากกว่า 12% ของตำแหน่งของ Capsid/pre-membrane (*C/prM*) gene และ E gene เมื่อใช้เชื้อไวรัสเจอี ที่แยกได้ในช่วงปี ค.ศ. 1935 - 1987 (Ali and Igarashi, 1997; Chen et al., 1992; Chen et al., 1990; Huong et al., 1993) โดย genotype I ประกอบด้วย สเตรนจากทางเหนือของประเทศไทย กัมพูชา และเกาหลี genotype II ประกอบด้วยสเตรนจาก อินโดนีเซีย (ซาราวักและจาวา) มาเลเซีย ทางใต้ของประเทศไทย และทางตอนเหนือของออสเตรเลีย ส่วน genotype III นั้นประกอบด้วยสเตรนจากทางตอนเหนือของเอเชีย (ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน) เวียดนาม ฟิลิปปินส์ เนปาล อินเดีย และ ศรีลังกา และ genotype IV ประกอบด้วยสเตรนจากทางตะวันออกของอินโดนีเซีย (จาวา บาหลี และฟลอเรส) ที่ถือว่าเป็น genotype ที่เก่าแก่ที่สุด และในปัจจุบันได้มีการแยก genotype เพิ่มขึ้นอีกหนึ่ง genotype คือ genotype V ที่ได้มาจากการแยกเชื้อไวรัสที่พบในประเทศสิงคโปร์ คือ Muar strain (Mangada and Takegami, 1999; Nga et al., 2004; Ni and Barrett, 1995; Solomon et al., 2003; Williams et al., 2000) ซึ่งตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา มีการรายงานการเปลี่ยนแปลง

genotype ของเชื้อเจอีที่พบจากประเทศต่างๆ โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก genotype III มาเป็น genotype I ทั้งในประเทศเกาหลี ญี่ปุ่น (Ma et al., 2003; Nam et al., 1996; Yang et al., 2004) และในประเทศเวียดนามที่พบว่าในช่วงปี ค.ศ. 1986 - 1990 นั้นเชื้อเจอีที่พบอยู่ใน genotype III แต่เชื้อที่แยกได้ในช่วงปี ค.ศ. 1995 - 2002 นั้นกลับอยู่ใน genotype I (Nga et al., 2004) ซึ่งเป็นเหตุการณ์เดียวกับที่พบในประเทศออสเตรเลียที่มีการรายงานการติดเชื้อไวรัสเจอีตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 เป็นต้นมาพบว่าเป็น genotype I ซึ่งถูกแทนที่ genotype II ที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อในอดีต (Johansen et al., 2004; Pyke et al., 2001) แม้กระทั่งในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย ที่พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อไวรัสเจอีโดย genotype I เช่นเดียวกัน (Nga et al., 2004; Pyke et al., 2001) (ภาพที่ 2)



<u>ภาพที่ 2</u> แสดงการแพร่กระจายของ genotype ของเชื้อไวรัสเจอีในประเทศต่างๆ (ดัดแปลงจาก Mackenzie et al 2007, Solomon et al: 2003) (A : อินโดนีเซียและ มาเลเซียไม่รวม นิวกีนี, B : ออสเตรเลียและนิวกีนี, C : ไต้หวันและ ฟิลิปปินส์, D : ไทย กัมพูชา และเวียดนาม , E : ญี่ปุ่น เกาหลี และจีน, F : อินเดีย ศรีลังกา และเนปาล)

ระบาดวิทยาของโรค (Epidemiology)

โรคไข้สมองอักเสบในคนพบทั่วไปในแถบเอเชียตะวันออก (ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (พม่า ไทย ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์) และเอเชียใต้ (เนปาล อินเดีย ศรีลังกา) โดยพบว่าประเทศที่ตั้งอยู่ระหว่าง 23°- 43°N ละติจูด จะเป็นพื้นที่มีเป็น temperate climate เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน ที่การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเจอีจะเป็นแบบ epidemic มักเกิดโรคในช่วงปลายฤดูร้อนการเกิดโรคจะพบเป็นประจำและมีความรุนแรง แต่ประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนที่ 1°- 23°N ละติจูด (ภาคใต้ของไทย เมืองซาราวักของมาเลเซีย อินเดียใต้) จะพบการเกิดโรคแบบกระจัดกระจาย (sporadic) ตลอดทั้งปี OIE รายงานว่าในปี ค.ศ. 1994 พบโรคไข้สมองอักเสบเจอีที่ไต้หวัน ระหว่างเดือนมีนาคม – เมษายน โดยพบผู้ป่วย 11 ราย และที่เนปาล (ไม่มีข้อมูลสัตว์ป่วย) ปี ค.ศ. 1995 ที่ญี่ปุ่นในเดือนกันยายน โดยพบผู้ป่วย 2 ราย

สำหรับประเทศเวียดนามและพม่าพบว่าการติดเชื้อไวรัสเจอี เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคสมองอักเสบในคน ประเทศเวียดนามพบว่า 67 % ของเด็กที่มีอาการสมองอักเสบ เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเจอี (Lowry et al., 1998) ในประเทศพม่าพบเชื้อไวรัสเจอีครั้งแรกที่รัฐชานในปี ค.ศ. 1974 ซึ่งเมืองนี้อยู่ติดกับพรมแดนจังหวัดเชียงใหม่ของไทย และพบระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีในคนที่อาศัยในแถบตะวันตกเฉียงเหนือของพม่าที่มีพรมแดนติดกับอินเดียที่มีการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบเจอีในปี ค.ศ. 1976 (Swe et al., 1979)

สภาวะของโรคไข้สมองอักเสบในประเทศมาเลเซีย ในปี ค.ศ. 1952 แยกเชื้อไวรัสเจอี ได้ครั้งแรกจากผู้ป่วยในมาเลเซีย พบการแพร่กระจายของเชื้อเป็นเหมือนในเขตร้อนคือเป็นการติดเชื้อแบบกระจัดกระจายที่สามารถพบได้ตลอดทั้งปี แต่การเกิดโรคจะสูงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งในช่วงปี ค.ศ. 1989 - 1993 พบว่ามีผู้ป่วยทั้งหมด 172 ราย ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่พบว่าเป็นเด็ก และมีอัตราการตายทั้งหมด 7 % เมื่อทำการสำรวจทางซีรั่มวิทยาในสัตว์พบการมีระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีสูงในสัตว์พวกสุกร โค กระบือและสามารถพบได้ทั่วประเทศมาเลเซีย (Oda et al., 1996) และสามารถแยกเชื้อไวรัสเจอีได้จากยุงรำคาญ *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui*, *Culex bitaeniorhynchus* และ *Culex sitiens* จากรัฐซารังงอ (Vythilingam et al., 1995; Vythilingam et al., 1997; Vythilingam et al., 1994) สำหรับประเทศสิงคโปร์ ช่วงปี ค.ศ. 1980 พบว่าการติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีเกิดแบบกระจัดกระจายและพบว่าผู้ป่วยจะเพิ่มสูงขึ้นสองช่วงคือเดือนเมษายนและช่วงเดือนตุลาคม ผู้ป่วยส่วนใหญ่คือเด็กในช่วงอายุ 5 - 14 ปี

สามารถตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีทั้งในสุกร ม้า และในคนที่อายุ 12 ปีขึ้นไป (Hale and Lee, 1955) และสามารถแยกเชื้อไวรัสเจอีได้จากยุงรำคาญ *Culex tritaeniorhynchus* (Hale et al., 1957) ซึ่งเมื่อทำการย้ายแหล่งเลี้ยงสุกรออกจากประเทศสิงคโปร์ เสร็จสิ้นในปี ค.ศ. 1992 พบว่าผู้ป่วยลดลงจาก 101 รายในช่วงปี ค.ศ. 1977 - 1984 เหลือเพียง 15 ราย ในปี ค.ศ. 1985 - 1993 แต่ยังสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีได้ทั้งในนก หมูป่า และสัตว์อื่นในประเทศสิงคโปร์ (Ting et al., 2004)

ประเทศอินเดียมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเจอีครั้งแรกในปี ค.ศ. 1955 ที่เมือง Vellore รัฐTamil Nadu รวมถึงบริเวณใกล้เคียงคือเมือง Andhra Pradesh มักพบในเด็กอายุต่ำกว่า 14 ปี และพบในช่วงครึ่งหลังของปีระหว่างฤดูฝน (Carey et al., 1969) เมื่อทำการสำรวจทางซีรั่มวิทยาระหว่างปี ค.ศ. 1955 - 1972 พบว่ามีการติดเชื้อแพร่กระจายถึง 8 รัฐ ประกอบด้วย Gujarat, Maharashtra, Andhra Pradesh, Karnataka Orissa, Assam, Arunachal Pradesh, Tamil Nadu (Reuben and Gajanana, 1997) เชื้อไวรัสเจอีสามารถพบครั้งแรกได้ในยุงรำคาญ *Culex vishnui subgroup* ในปี ค.ศ. 1956 และพบเชื้อจากสมองผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากสมองอักเสบในปี ค.ศ. 1958 ซึ่งการติดเชื้อไวรัสเจอีในอินเดียไม่ถือว่าเป็นปัญหาทางสุขภาพที่สำคัญจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1973 ที่พบการระบาดอย่างรุนแรงหลายครั้งในหลายๆรัฐ กระจายทั่วไปโดยการเกิดส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเกิดฝนตกหนักและมีน้ำท่วม โดยการระบาดเกิดติดต่อมาจนถึงปัจจุบัน ซึ่งรัฐที่มีการติดเชื้อสูงเช่น Andhra Pradesh,Tamil Nadu, Uttar Pradesh, Assam และ West Bengal (Ratho et al., 1999) อาจกล่าวได้ว่าการติดต่อของเชื้อไวรัสเจอีนั้นเริ่มต้นที่อินเดียแถบตะวันออกเฉียงใต้ จากนั้นแพร่กระจายการระบาดไปที่แถบเหนือของประเทศในปี ค.ศ. 1978 (Uttar Pradesh และ Bihar) แถบตะวันออกเฉียงเหนือ (Assam, Manipur และ Nagaland) ในช่วงปี ค.ศ. 1980 - 1985 และแถบ west-coast (Goa) และ north-west (Haryana) ในปี ค.ศ. 1982 และ 1990 ตามลำดับ จากนั้นในปี ค.ศ. 1996 การระบาดได้แพร่ไปสู่แถบ ตะวันตกเฉียงใต้ (Kerala) ซึ่งเชื้อไวรัสเจอีที่แพร่ในอินเดียทั้งหมดอยู่ใน genotype III อัตราการป่วยอยู่ระหว่าง 3.0 - 1.5 ต่อประชากร 100,000 คน (Gajanana et al., 1997) จำนวนผู้ป่วยที่มีการรายงานประจำปีในช่วงปี ค.ศ. 1992 - 2001 คือ 1,172 – 3,395 ราย (Kabilan et al., 2004) มีอัตราการตายโดยส่วนใหญ่ 15 – 30 % ซึ่งยุงที่เป็นพาหะหลักของเชื้อในอินเดียจะแตกต่างกันตามพื้นที่ขึ้นกับปัจจัยทางนิเวศน์วิทยา (ecological factor) ซึ่งสามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากยุงถึง 16 species แต่ส่วนมากพาหะหลักของเชื้อไวรัสเจอีจะเป็นยุงในกลุ่ม *Culex vishnui* subgroup คือ *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* และ *Culex pseudovishnui* (Samuel et al., 2000)

ในปี ค.ศ. 1995 มีการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบเจอี ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย (Torres Strait) และปี ค.ศ. 1998 พบการระบาดแพร่ลงมาที่ Cape York Peninsula ของรัฐควีนส์แลนด์ ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการแพร่เชื้อตามธรรมชาติ (natural transmission cycle) ของนกน้ำ สุกร และยุง จากนั้นในปี ค.ศ. 2000 พบมีการระบาดที่ Torres Strait อีกครั้ง โดยมีการพบเชื้อไวรัสเจอีในยุง *Culex gelidus* (van den Hurk et al., 2001) กระทั่งปี ค.ศ. 2004 พบการติดเชื้อไวรัสเจอีในยุง *Culex sitiens* subgroup ของออสเตรเลียซึ่งถือว่าเป็นการพบเชื้อครั้งแรกจากยุงในออสเตรเลีย (Van Den Hurk et al., 2006) และเนื่องจากการระบาดที่ Torres strait ในปี ค.ศ. 1995 จึงทำให้มีการสำรวจยุงที่เกาะปาปัวนิวกินีเพื่อตรวจหาไวรัสในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ปี ค.ศ. 1996 ถึงกุมภาพันธ์ ปี ค.ศ. 1998 พบเชื้อไวรัสเจอี genotype II (Johansen et al., 2000)

ประเทศไทยมีการรายงานการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีตั้งแต่ช่วงกลางถึงปลายปี ค.ศ. 1950 มีการตรวจพบทางซีรั่มวิทยาครั้งแรกในม้าจากจังหวัดชลบุรี จากนั้นมีการแยกเชื้อไวรัสเจอีจากยุงรำคาญ *Culex tritaeniorhynchus* และยุงรำคาญ *Culex gelidus* ในพื้นที่เดียวกันในปี ค.ศ. 1962 (Simasathien et al., 1972) นอกจากนั้นยังสามารถแยกเชื้อได้จากคนไข้ที่โรงพยาบาลจังหวัดพิษณุโลกในปี ค.ศ. 1964 และเด็กป่วยจากจังหวัดสุโขทัยในปี ค.ศ. 1965 (Thongcharoen, 1985) พบการรายงานการเกิดโรคอย่างกระจัดกระจาย (sporadic) ในช่วงปี ค.ศ. 1964 - 1966 ในจังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก และจังหวัดนครราชสีมา สำหรับในประเทศไทยการระบาดของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีมีการรายงานการระบาดรุนแรงครั้งแรกในคนระหว่างปี ค.ศ. 1969 ที่จังหวัดเชียงใหม่ในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม ซึ่งจะพบได้มากสุดในเดือนกรกฎาคม มีผู้ป่วย 655 คน เสียชีวิต 152 คน (Yamada et al., 1971) การระบาดมักเกิดในเด็กอายุระหว่าง 1 - 21 ปี ซึ่งพบมากที่ช่วงอายุ 10 - 15 ปี การระบาดในปีต่อมาในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคมและเดือนกรกฎาคม พบว่ายังคงรุนแรงอยู่ มีผู้ป่วย 87 ราย และยังพบอีก 17 รายในช่วงเดือนสิงหาคมถึงธันวาคม รวมมีรายงานการตาย 20 ราย และอัตราการเกิดโรคคือ 14.7 รายต่อประชากร 100,000 ราย (Grossman et al., 1973b) พบว่าผู้ป่วยที่มารับการรักษาจากอาการทางระบบประสาทที่มีสาเหตุจากไวรัสเจอีจะสูงมากในเดือน พฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม (Grossman et al., 1973a) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1969 เป็นต้นมาพบมีการรายงานการเกิดการติดเชื้อไวรัสเจอีทุกปี ประมาณ 1,500 - 2,500 รายต่อปี และลดลงในช่วงปี ค.ศ. 1988 (Chunsuttiwat, 1989) ในปี ค.ศ. 1991 มีผู้ป่วยและเสียชีวิต 25 คน อัตราการเกิดโรคคิดเป็น 1.69 คนต่อประชากร 100,000 คน แต่มีอัตราการตายสูงถึง 8 % อุบัติการณ์การติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีพบมากในแถบภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ พบน้อยในแถบภาคกลาง และภาคใต้ ซึ่งภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าการติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีจะมีการติดเชื้อสูงในช่วง

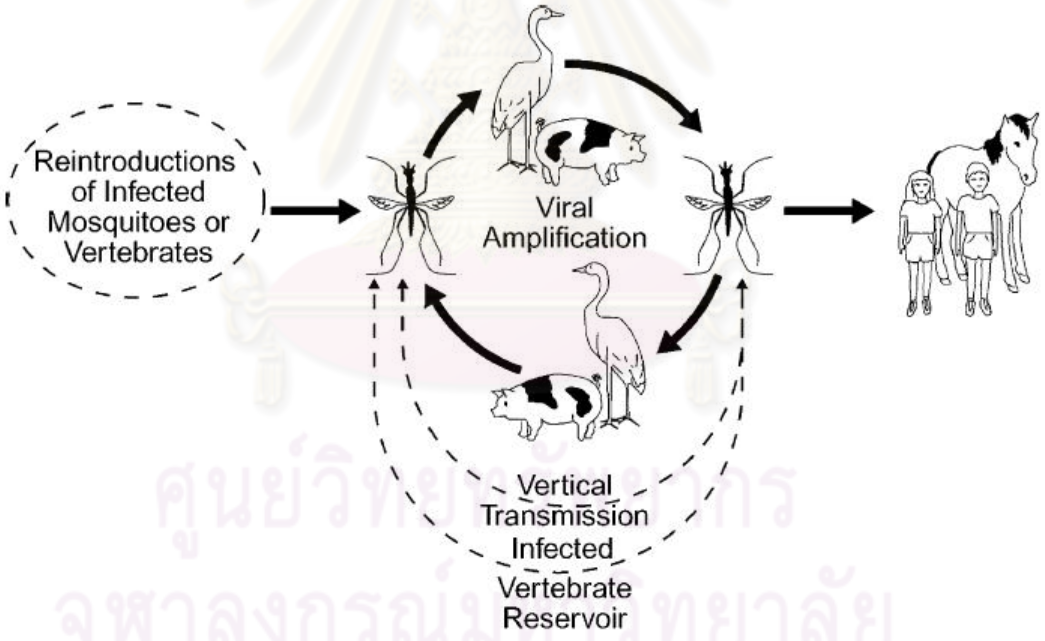
ฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกันยายน ในประเทศไทยสามารถพบการติดเชื้อได้ทั้งสองรูปแบบโดยภาคเหนือจะพบการติดเชื้อเป็นช่วงฤดู แต่ในขณะที่ในภาคใต้จะพบการติดเชื้อแบบกระจัดกระจายตลอดทั้งปี ซึ่งจังหวัดที่พบมากคือ สุราษฎร์ธานี ระนอง กระบี่ และตรัง เมื่อเทียบอัตราการติดเชื้อกับอายุพบว่า ในเด็กอายุน้อยกว่า 4 ปี มีอัตราการติดเชื้อ 8 - 11 ต่อประชากร 100,000 คน เด็กอายุ 5 - 9 ปี มีอัตราการติดเชื้อ 7 - 10 ต่อประชากร 100,000 คน เด็กอายุ 10 - 14 ปี มีอัตราการติดเชื้อ 5 - 9 ต่อประชากร 100,000 คน ในขณะที่ผู้ใหญ่อายุมากกว่า 25 ปี พบว่าอัตราการติดเชื้อน้อยกว่า 2 ต่อประชากร 100,000 คน (Thisyakorn and Nimmannitya, 1985; Thongcharoen, 1985, , 1989)

ในปี ค.ศ. 2006 มีรายงานการเกิดไข้สมองอักเสบทั้งหมด 49 รายโดยพบที่ภาคเหนือ 9 ราย พบมากที่จังหวัดเพชรบูรณ์ 4 ราย กำแพงเพชร 1 ราย นครสวรรค์ 1 ราย ภาคกลาง 9 ราย พบมากที่ลพบุรี 2 ราย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบถึง 15 ราย โดยพบมากที่จังหวัด นครพนม 9 ราย ภาคใต้ 16 ราย พบมากที่กระบี่ 7 ราย นราธิวาส 8 ราย ข้อมูลในปี ค.ศ. 2007 พบผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบเจอี 43 ราย (ร้อยละ 11.69) อัตราป่วย 0.07 ต่อประชากรแสนคน เป็นผู้ป่วยสัญชาติไทย 40 ราย พม่า 2 ราย และลาว 1 ราย โดยพบที่ภาคเหนือ 10 ราย พบมากที่จังหวัดเชียงใหม่ 4 ราย แม่ฮ่องสอน 2 ราย ภาคกลาง 13 ราย พบมากที่จังหวัดนนทบุรี 3 ราย นครปฐม 4 ราย ชลบุรี 3 ราย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ 14 ราย โดยพบมากที่จังหวัด มุกดาหาร 7 ราย นครราชสีมา 3 ราย ภาคใต้ 6 ราย พบมากที่สงขลา 2 ราย แนวโน้มของผู้ป่วยลดลงในช่วงปี ค.ศ.1998 - 2004 แต่กลับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจาก ค.ศ.2005 เป็นต้นมา ในปี ค.ศ.2007 พบผู้ป่วยสูงสุดในช่วงเดือนพฤษภาคม - สิงหาคม ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลย้อนหลังที่จะพบผู้ป่วยสูงสุดในช่วงเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม เท่านั้น (กรมควบคุมโรค, 2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การติดต่อของโรค (Transmission)

โรคไข้สมองอักเสบจากเชื้อไวรัสเจอีนี้เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ผ่านทางยุงเป็นหลัก โดยการติดต่อเป็นวงจร นก-ยุง-นก หรือ สุกร-ยุง-สุกร ซึ่งสุกรเป็นสัตว์รังโรคหลักที่สำคัญของเชื้อไวรัสเจอีที่เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในตัวสัตว์ได้ นอกจากนั้น แล้วยังมีนกเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญเช่นกันที่สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อได้ สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมถือเป็น accidental host ที่ตัวเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้โฮสต์เหล่านี้ในระดับต่ำหรือไม่เพิ่มจำนวนเชื้อเลยและการติดเชื้อมีระยะเวลาที่สั้นจึงไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่สัตว์อื่นได้ (Dead-end host) เช่น คน หรือ ม้า เป็นต้น (Igarashi, 1992; Rosen, 1986; Scherer and Buescher, 1959) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงวงจรการติดต่อของเชื้อไวรัสเจอีโดยมียุงเป็นพาหะ (ดัดแปลงจาก Halstead et al., 2003)

ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่าไวรัสเจอี นำโดยยุง *Culex subgroup vishnui* ซึ่งยุงในกลุ่มนี้เช่น *Culex tritarniorhynchus*, *Culex pseudovishnui* และ *Culex vishnui* (Vaughn and Hoke, 1992) ยุงในสกุล *Culex* ที่สำคัญที่สามารถพบในประเทศไทยคือ *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus*, *Culex fuscocephala*, *Culex vishnui* และ *Culex pseudovishnui* (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2547) ซึ่งยุงในประเทศไทยที่พบว่าเป็นพาหะหลักที่นำเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบในประเทศไทยคือยุง *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus* และ *Culex fuscocephala* (Chunsuttiwat, 1989) การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบในประเทศไทยพบว่ารูปแบบการติดเชื้อตามช่วงฤดู (seasonal pattern) การแพร่กระจายของโรคมักเกิดขึ้นในฤดูฝนเนื่องจากมีปริมาณของยุงเป็นจำนวนมากทำให้มีตัวนำการแพร่กระจายของโรค รวมถึงมีแหล่งที่เหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุง เช่น แหล่งน้ำขังที่เป็นน้ำนิ่งและมีพวกวัชพืชอยู่เป็นต้น ลักษณะการเกิดโรคที่ระบาดในช่วงฤดูฝนพบว่าเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง เดือนสิงหาคม

การดูดเลือดของยุงเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับการมีอยู่ของโฮสต์ และความพึงใจของยุงต่อโฮสต์รวมถึงสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะพันธุ์ของยุงด้วย ยุงในตระกูล *Culex* spp. เป็นยุงที่มีนิสัยดูดเลือดช่วงกลางคืน จากการศึกษาในประเทศไทยพบว่าการดูดเลือดจะสูงเป็นสองช่วงคือช่วงหลังพระอาทิตย์ตกและช่วงก่อนพระอาทิตย์ขึ้น คือหลังเที่ยงคืนถึงประมาณตี 4 (Gould et al., 1974) ยุง *Culex gelidus* และยุง *Culex fuscocephala* เป็นยุงที่มีความชอบในการดูดเลือดสัตว์สูง (high zoophilic) และมีความชอบในการดูดเลือดคนต่ำ (poor anthropophilic) ในขณะที่ยุง *Culex quinquefasciatus* ชอบดูดเลือดคน (anthropophilic) สูงถึง 53.2 - 62.7 % ชอบดูดเลือดโค 7 - 14.7 % และดูดเลือดสุกร 1.5 % (Reuben et al., 1992) จากการศึกษาพบว่า ยุง *Culex tritaeniorhynchus* นั้น 56.6 % ดูดเลือดโค และ 6.3 % ดูดเลือดสุกร อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาพบว่ายุง *Culex tritaeniorhynchus* นั้นบางส่วนมีการดูดเลือดสัตว์หลายชนิดด้วยเช่นกัน (mixed blood feeding) (Arunachalam et al., 2005)

เมื่อทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัสเจอี ในยุง *Culex tritaeniorhynchus* พบว่ายุงสามารถติดเชื้อได้เมื่อได้รับเชื้อแม้ในปริมาณที่น้อยเพียง 0.15 median lethal dose (LD_{50}) / ตัวยุง (3 mouse - LD_{50} / 0.04 ml blood) และจะสามารถตรวจพบไวรัสในยุงได้หลังจากได้รับเชื้อ 5 - 9 วัน แต่จะสามารถแพร่เชื้อไปสู่สัตว์อื่นได้เมื่อได้รับเชื้อไปแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยยุงนี้สามารถแพร่เชื้อไวรัสเจอี ไปสู่สุกรได้ถึง 92 % ในขณะที่การแพร่ไปสู่สัตว์ปีก (ไก่) ได้เพียง 48 % (Gresser et al., 1958) ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วยุง *Culex tritaeniorhynchus* จะสามารถติดเชื้อเมื่อได้รับเชื้อไวรัสเจอี ในขนาด 10^1 และสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อได้มากกว่า 10^4 (Soman et al., 1977; Takahashi,

1976) นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อและการแพร่เชื้อยังขึ้นกับอุณหภูมิโดยรอบด้วย โดยพบว่าเชื้อจะเพิ่มจำนวนสูงสุดใน 5 วัน เมื่อยุงอยู่ในอุณหภูมิ 28°C แต่จะใช้เวลานานขึ้นเมื่อยุงอยู่ที่อุณหภูมิ 10°C และเชื้อจะสามารถแพร่กระจายได้สูงสุดภายใน 14 วัน เมื่อยุงอยู่ในอุณหภูมิ 28°C แต่ใช้เวลาถึง 20 วัน เมื่อยุงอยู่ในอุณหภูมิ 20°C (Takahashi, 1976)

เมื่อทำการศึกษาทางพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของยุง *Culex tritaeniorhynchus* พบว่า เมื่อยุงได้รับเชื้อไวรัสเจอีเข้าไป 2 วันเชื้อจะเข้าไปอยู่ที่เซลล์ไขมันตามลำตัวส่วนอกของยุง จากนั้นแพร่เข้าไปสู่ต่อมน้ำลายของยุงหลังได้รับเชื้อ 4 วัน และในวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อจะสามารถพบเชื้อได้ที่ทางเดินอาหารส่วนกลางและท้ายของยุง นอกจากนั้นยังพบการติดเชื้อที่เซลล์ประสาทของยุงคือ throracic ganglion, abdominal ganglion, cephalic ganglion และที่ตาเมื่อได้รับเชื้อไปแล้ว 4 วัน เช่นกัน จากการศึกษาโดยส่วนใหญ่กล่าวว่าเชื้อจะแพร่มาที่ต่อมน้ำลายของยุงผ่านทางน้ำเลือด (haemolymph) (Leake and Johnson, 1987) เมื่อทำการศึกษาการติดเชื้อในยุง *Culex fuscocephala* พบว่าเมื่อให้เชื้อในปริมาณโดยเฉลี่ย 8 plaque forming unit (PFU) / mosquito จะทำให้ยุง 92 % เกิดการติดเชื้อและสามารถเพิ่มจำนวนตัวเชื้อในยุงให้มีปริมาณที่มากกว่า 10^5 PFU / mosquito ในวันที่ 10 หลังการติดเชื้อ และยุงยังสามารถคงระดับไตเตอร์ของเชื้อที่สูงได้อย่างน้อย 4 สัปดาห์ (Muangman et al., 1972) จากการศึกษาการติดเชื้อในยุง *Culex gelidus* พบว่าปริมาณเชื้อ 4 LD_{50}/ 0.03ml blood คือ ปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่จะทำให้ยุงนี้ติดเชื้อแต่ต้องใช้ระยะเวลาฟักตัว 21 วัน แต่เมื่อยุงได้รับเชื้อในปริมาณที่มากกว่านี้ระยะเวลาฟักตัวจะน้อยลงซึ่งระยะเวลาฟักตัวที่น้อยที่สุดคือ 6 วัน (Gould et al., 1962)

จากการศึกษาการติดเชื้อไวรัสเจอี ในยุง *Culex pipiens molestus* และยุง *Culex tritaeniorhynchus* เมื่อให้เชื้อไวรัสเจอี ที่แยกได้จากไต้หวัน พบว่ามีระดับไวรัสในวันแรก $10^{5.54}$ PFU แล้วลดลงเหลือ $10^{2.9}$ PFU ในวันที่สาม และเพิ่มสูงขึ้นเป็น $10^{4.65}$ PFU ในวันที่แปดในยุง *Culex pipiens molestus* ขณะที่ยุง *Culex tritaeniorhynchus* พบว่ามีระดับไวรัสในวันแรก $10^{5.48}$ PFU ลดลงเหลือ $10^{2.6}$ PFU ในวันที่สิบ และเพิ่มเป็น $10^{5.18}$ PFU ในวันที่ 13 พบว่า median infective dose (ID_{50}) ของยุง *Culex pipiens molestus* คือ $10^{2.83}$ PFU และยุง *Culex tritaeniorhynchus* คือ $10^{1.02}$ PFU และมีค่า median infective dose for virus transmission (TID_{50}) เท่ากับ $10^{5.34}$ PFU และ $10^{4.59}$ PFU ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบโดยให้ยุงที่มีเชื้อมากัดหนู Balb/C แล้วสังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน ผลที่ได้แสดงว่ายุง *Culex pipiens molestus* มีความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อได้เช่นเดียวกับ *Culex tritaeniorhynchus* (Weng et al., 2000)

ประเทศญี่ปุ่นพบว่ายุงในแถบโตเกียวที่มีการติดเชื้อไวรัสเจอี ในช่วงปี ค.ศ. 1952 - 1957 มีเพียงชนิดเดียวคือยุง *Culex tritaeniorhynchus* โดยการติดเชื้อในยุงนี้จะพบในช่วงปลายเดือนมิถุนายนถึงต้นเดือนตุลาคม (Buescher et al., 1959) ในไต้หวันเมื่อทำการศึกษาโดยการหาเชื้อไวรัสเจอี ในยุงในช่วงตุลาคมปี ค.ศ. 1995 - 1996 พบว่า *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 97 pools และ *Aedes albopictus* จำนวน 20 pools จากยุงทั้งหมด 13,576 pools มีเชื้อไวรัสเจอี เมื่อทำการแยกเชื้อจากยุงลงใน C6/36 cell จากนั้นจำแนกเชื้อด้วยวิธี indirect fluorescent antibody test โดยใช้ monoclonal antibody ต่อเชื้อไวรัสเจอี (Weng et al., 1999)

สุกรถือเป็นสัตว์รังโรคหลักที่สำคัญที่สามารถเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อ (amplifying host) ได้โดยเฉพาะในแถบที่ไวรัสเจอีเป็นแบบ endemic นั้นถือว่าสุกรเป็นโฮสต์ที่ทำให้ตัวเชื้อไวรัสคงอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อม (maintenance host) ความสำคัญของการที่สุกรเป็นตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อและเป็นโฮสต์ที่ทำให้ตัวเชื้อคงอยู่นั้นสามารถแสดงให้เห็นได้จากการศึกษาในญี่ปุ่นของ Scherer และ Buescher ในปี ค.ศ. 1959 เมื่อทำการตรวจทางซีรั่มวิทยาของสุกร พบว่าสุกรมีระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีในระดับที่สูง เมื่อยุงที่มีเชื้อไวรัสเจอีดูดเลือดสุกรแล้วเชื้อจากยุงเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวน หลังสุกรถูกยุงกัด 3 - 4 วัน โดยเลือดจะมีปริมาณเชื้อไวรัสสูงนาน 2 - 4 วัน ระดับไวรัสในกระแสเลือด (viremia) โดยเฉลี่ยของสุกรที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีคือ 10^6 median suckling mouse intracranial lethal dose ($SMICLD_{50}$) / ml of blood (Burke et al.,1988) การสำรวจทางซีรั่มวิทยาเป็นการยืนยันถึงความสำคัญของสุกรเป็นโฮสต์ที่สามารถเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อ เพราะสุกรเป็นโฮสต์ที่ดึงดูดยุงที่เป็นพาหะหลักของเชื้อที่ดีมาก เนื่องจากเป็นแหล่งดูดเลือดที่ยุงชอบมากกว่าสัตว์อื่น (Burke et al., 1985a) ซึ่งจะส่งผลให้คนมีความเสี่ยงในการติดเชื้อสูงถ้ามีการเลี้ยงสุกรเป็นจำนวนมากใกล้แหล่งชุมชน ดังนั้นจึงมีการใช้สุกรเป็นเครื่องมือชี้วัดการเกิดการติดเชื้อ (sentinel pigs) เพื่อศึกษาแนวโน้มของการเกิดเชื้อในคนในประเทศต่างๆ เช่น ญี่ปุ่น (Maeda et al., 1978) ไต้หวัน (Detels et al., 1976) ไทย (Burke et al., 1985b; Johnsen et al., 1974) อินเดีย (Geevarghese et al., 1987; Geevarghese et al., 1991) ศรีลังกา (Peiris et al., 1993) อินโดนีเซีย (Van Peenen et al., 1974) และออสเตรเลีย (Hanna et al., 1996) เนื่องจากตัวเชื้ออยู่ในกระแสเลือดสุกรได้นานทำให้ยุงที่มาดูดเลือดสุกรในระยะนี้ติดเชื้อและทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในยุงได้ เมื่อยุงมาดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น เช่น คน ม้า รวมทั้งนก ทำให้สัตว์เหล่านี้เกิดการติดเชื้อ โดยส่วนใหญ่สัตว์ที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการ แต่ในม้าและคนอาจแสดงอาการสมองอักเสบ โดยในม้าพบว่าจะมีปริมาณเชื้อ $10^{1.5}$ $SMICLD_{50}$ในช่วง viremia (Endy and Nisalak, 2002)

ในประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสเจอีในสุกรจากฟาร์มในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งจังหวัดชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์มีระดับค่อนข้างสูงคือ 91.67 - 99.25 % ส่วนในสุกรสาวพบมีอัตราการติดเชื้อ 76.92 % ในช่วงฤดูหนาว และจะเพิ่มขึ้นในฤดูอื่นๆ (ฤดูร้อน 92.11 % และ ฤดูฝน 100 %) สำหรับอัตราความชุกของการติดเชื้อในกลุ่มสุกรพ่อแม่พันธุ์ในแต่ละฟาร์มพบได้ตั้งแต่ 73.34 – 100 % ซึ่งกระจายอยู่ตามพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ และเมื่อทำการศึกษาทางซีรั่มวิทยาในลูกสุกรพบว่าลูกสุกรจะมีการเกิด seroconversion โดยเฉลี่ยในช่วงอายุ 10 - 12 สัปดาห์ เป็นส่วนใหญ่ (คณิศักดิ์ และคณะ, 1998)

นอกจากนี้นกก็เป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเชื้อ (amplifying host) ได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสกุลนกน้ำ (ardeid species) ที่โดยส่วนใหญ่นกเหล่านี้มีการอพยพย้ายถิ่นไปตามแหล่งต่างๆ (ภาพที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 แสดงรูปแบบการย้ายถิ่นของนกใน East Asian-Australasian region ซึ่งนกน้ำเหล่านี้จะมีรูปแบบการย้ายถิ่นตามทิศทางโดยไปทางเหนือในฤดูใบไม้ผลิ และอพยพไปทางใต้ในฤดูใบไม้ร่วง ซึ่งลูกศรแสดงทิศทางการอพยพของนก, PNG; Papua New Guinea (ดัดแปลงจาก Nga et al., 2004)

นกเหล่านี้ถือว่าเป็นโฮสต์ที่ทำให้เชื้อคงอยู่ (maintenance host) ในแหล่งที่ไม่มีสุกรหรือมีสุกรอยู่เป็นจำนวนน้อย นอกจากนั้นยังอาจเป็นตัวแพร่กระจายตัวเชื้อไปสู่แหล่งอื่นๆได้ (Scherer et al., 1959) ซึ่งจากการศึกษาพบว่านกป่ามีความสำคัญในการเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อไวรัสเจอีในธรรมชาติ ซึ่งสามารถตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีได้ในนกน้ำ Black-crowned night

heron (*Nycticorax nycticorax*), Plumed egrets (*Egretta intermedia*), Little egrets (*Egretta garzetta*) และระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีเมื่อตรวจพบว่าในนก Black-crowned night heron นั้นมีไตเตอร์สูงกว่านกชนิดอื่น (Buescher et al., 1959) ซึ่งนกนี้ดึงดูดยุง *Culex tritaeniorhynchus* ได้มากกว่านกชนิดอื่น (Scherer et al., 1959) และพบว่าระดับ viremia สูงถึง $10^{3.5}$ $SMICLD_{50}$/ 0.03 ml of blood สามารถพบได้ในนกน้ำเหล่านี้ นก Pond heron (*Ardeola grayii*) และ Cattle egrets (*Bubulcus ibis*) พบระดับ viremia ที่ใกล้เคียงกัน (Ogata et al., 1970) ซึ่งเมื่อเกิดการติดเชื้อนกเหล่านี้ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการ และมีระยะ viremia ยาวนานถึง 4 วัน (Gresser et al., 1958)

พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

การติดต่อของโรคเกิดจากยุงที่มีเชื้อ JEV ดูดเลือดสุกรแล้วเชื้อจากยุงเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวน ภายหลังสุกรถูกยุงกัด 3 - 4 วัน โดยเลือดจะมีปริมาณเชื้อไวรัสสูงระยะสั้นๆ นาน 2 - 4 วัน เมื่อยุงดูดเลือดสุกรในช่วงนี้ยุงจะนำเชื้อที่ได้รับจากสุกรไปด้วย

การติดเชื้อในคนเริ่มจากเมื่อถูกยุงที่ติดเชื้อกัดทำให้เชื้อเข้าไปอยู่ใน dendritic cell (Langerhans' cells) ที่ผิวหนังของคน จากนั้นเชื้อจะแพร่ไปที่ peripheral lympnode ผ่านเซลล์เม็ดเลือดขาวต่างๆ โดยไวรัสจะทำการเพิ่มจำนวนใน macrophage และเซลล์อื่นๆของ peripheral lymphatic system ตามมาด้วยการเกิด viremia ในช่วงสั้นๆ ที่โดยทั่วไปจะใช้เวลาน้อยกว่าหนึ่งสัปดาห์ ซึ่งช่วงนี้จะเป็นช่วงที่เชื้อไวรัสจะเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้ โดยส่วนใหญ่หากผู้ที่ได้รับเชื้อได้รับการรักษาในช่วงนี้โอกาสเกิดความเสียหายต่อระบบประสาทจะพบได้เพียง 1 : 200 - 1 : 1,000 ราย ซึ่งการผ่านเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางนั้นตัวเชื้อจะเข้าโดยผ่าน blood-brain barrier ไปสู่ vascular endothelium ซึ่งเมื่อไวรัสเข้าไปสู่เซลล์ประสาทแล้วนั้นสามารถพบได้ที่ phagocytic cell ภายในระบบประสาท ซึ่งผลกระทบของไวรัสที่ระบบประสาทส่วนใหญ่จะเกิดในส่วน hippocampus, thalamus, substantia nigra และ brainstem นอกจากนั้นส่วน cerebellum, spinal cord ส่วนบนโดยเฉพาะใน anterior horn cell อาจมีผลกระทบด้วย ซึ่งส่วนที่ได้รับผลกระทบจากเชื้อไวรัสนี้จะเกิดการอักเสบและการบวมน้ำ เซลล์อักเสบที่เข้ามาส่วนใหญ่จะเป็น T cell, macrophage และ B cell ซึ่งการตอบสนองต่อการอักเสบของร่างกายเป็นผลให้เกิดโรคทางระบบประสาทเป็นหลัก แม้ว่าการที่เซลล์ประสาทถูกทำลายเช่นการเกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) จะมีส่วนร่วมด้วยก็ตาม

ในประเทศที่มีการระบาดของเชื้อแบบ endemic นั้น การติดเชื้อไวรัสเจอีนี้มักพบส่วนใหญ่ในเด็ก ในขณะที่ผู้ใหญ่โดยส่วนใหญ่จะมีภูมิต้านทานต่อโรค อย่างไรก็ตามโรคนี้สามารถเกิดได้ในทุกอายุในคนที่เข้ามาในประเทศจากแหล่งอื่นที่ไม่ได้มีเชื้อนี้อยู่เป็นโรคติดต่อเฉพาะถิ่น และยังสามารถแพร่ระบาดรุนแรงในพื้นที่อื่นได้เช่นเดียวกัน ในประชากรที่อายุน้อยมากหรือในกลุ่มผู้สูงอายุก็สามารถเกิดอาการไข้สมองอักเสบรุนแรงได้เช่นกันเมื่อได้รับเชื้อ (Mackenzie et al., 2007)

อาการของโรค (Clinical sign)

การติดเชื้อไวรัสเจอี ในคนมักแสดงอาการในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปี มีอัตราการป่วยและเสียชีวิต 12 – 14 % เนื่องจากมีความต้านทานโรคต่ำ รายที่หายป่วยถ้าเชื้อทำลายสมองจะทำให้พิการได้ ส่วนผู้ใหญ่มักมีความต้านทานต่อโรคนี้ สตรีตั้งครรภ์อาจจะแท้ง อาการของการติดเชื้อโดยทั่วไปคือ มีไข้ (โดยทั่วไปจะมากกว่า 41°C) ปวดศีรษะ มีอาการทางระบบทางเดินอาหารตามมาด้วยการมีสติน้อยลง อาการสับสน (confusion) ชัก และอาจตายได้ (Miyake, 1964; Solomon et al., 2000) ในคนระยะฟักตัวของโรคโดยทั่วไปจะน้อยกว่า 1 สัปดาห์ แต่ในบางรายจะสูงถึง 16 วัน อาการเกร็งกล้ามเนื้อคอสามารถพบได้กว่าครึ่งของผู้ป่วย นอกจากนั้นเมื่อตรวจ cerebrospinal fluid จะพบ lymphocytosis (>100 x 10^9 cell per litre) อัตราการตายของผู้ป่วยด้วยโรคไข้สมองอักเสบเจอี คือ 30 % แต่มีผู้ที่เกิดความผิดปกติระยะยาวจากการติดเชื้อไวรัสเจอี (Solomon, 2003; 2004) ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้น เช่น ความผิดปกติทางพฤติกรรม ความสามารถในการเรียนรู้ต่ำลง ซึ่งอาการดังกล่าวอาจต้องใช้เวลาหลายปีจึงจะสังเกตเห็นอาการต่างๆ ดังกล่าวได้ (Lam et al., 2005) ในแถบที่มีโรคไวรัสเจอีแพร่กระจายแบบ endemic ผู้ที่ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการ (asymptomatic) หรืออาจแสดงอาการเพียงเล็กน้อย (mild symptomatic)

สุกรโตเต็มวัยและสุกรขุนที่ติดเชื้อไวรัสเจอี มักไม่แสดงอาการของโรค (Shimizu et al., 1954) ในสุกรพบว่าการติดเชื้อผ่านรกในแม่สุกรที่อุ้มท้องเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของตัวอ่อน ลูกกรอก ตายแรกคลอด ลูกสุกรอ่อนแอและแสดงการผิดปกติพิการแต่กำเนิดของลูกสุกร ในลูกสุกรอายุน้อยกว่า 3 เดือนที่ไม่มีภูมิคุ้มกันจากแม่อาจแสดงอาการสมองอักเสบ และสมองบวม (hydrocephalus) (Joo and Chu,1999) ในสุกรพ่อพันธุ์อาจพบการเกิดการผสมไม่ติด (infertility) จากการที่พ่อพันธุ์ไม่มีสเปิร์ม (aspermia)

อาการในนกส่วนใหญ่เมื่อเกิดการติดเชื้อจะไม่แสดงอาการ (Gresser et al., 1958)

การวินิจฉัยโรค (Diagnosis)

วิธีการวินิจฉัย JEV มีหลายวิธี ได้แก่ การเพาะแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) ในสมองลูกหนูดูดนม (sucking mice) หรือในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เช่น African green monkey kidney cells (Vero cell), Porcine kidney cells, Hamster kidney cells, MD-BK cell line หรือ C6/36 cells เพื่อดูการเกิด cytopathic effect (CPE) หรือตรวจโดยการย้อมทาง Immunocytochemistry โดยตัวอย่างที่ใช้ตรวจเป็นชิ้นเนื้อจากสมองหรือไขสันหลัง cerebrospinal fluid (CSF) (OIE) นอกจากนี้ยังมีการวินิจฉัยโดยใช้วิธีทางซีรั่มวิทยาเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอี ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ haemagglutination inhibition (HI) test, Complement fixation test (CF), Enzyme-linked immunoassay (ELISA), serum neutralization, epitope blocking immunoassay และ dot enzyme immunoassay (EIA) (Joo and Chu,1999) ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology techniques) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยอย่างกว้างขวาง โดยพบว่ามีการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้แทนการเพาะแยกเชื้อไวรัส เนื่องจากทราบผลได้รวดเร็วกว่าและมีความจำเพาะสูง ซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาเช่น reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (Yang et al., 2004)

จากการที่มี viremia ในระยะที่สั้นทำให้เป็นไปได้น้อยที่จะทำการแยกเชื้อจากเลือดหรือจาก cerebrospinal fluid (CSF) ดังนั้นการใช้วิธีการตรวจทางโมเลกุลโดยตรวจหา RNA ของไวรัส น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าในคนซึ่งวิธีดังกล่าวเช่น RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่ประสบความสำเร็จในการตรวจหาเชื้อใน CSF ของคน นอกจากนี้ยังสามารถทำการวินิฉัยโรคด้วยการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอีในซีรั่ม และ CSF นั้นสามารถตรวจโดยใช้วิธี EIA หรือ HI test รวมถึง immunofluorescence antibodies assay และ rapid immunochromatographic antibody assay ก็ได้ถูกพัฒนาเพื่อหาการติดเชื้อไวรัสนี้ (Cuzzubbo et al., 2000)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง

ในการศึกษานี้ใช้ African green monkey kidney cells (Vero cell) ซึ่งเป็น continuous cell line และ C6/36 cells ซึ่งเป็น mosquitoes cell line ในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส โดยทำการเพาะเลี้ยง Vero cells ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium, L-glutamine 2.0 mM, gentamicin sulfate 20 mg ต่อ medium 100 ml ซึ่ง maintenance medium (MM) เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS)

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ C6/36 cell ใช้ Dulbecco's modified Eagle's medium, non-essential amino acid, L-glutamine 2.0 mM, gentamicin sulfate 20 mg ต่อ medium 100 ml ซึ่ง MM เติม 10% FBS

เชื้อไวรัส

Japanese encephalitis virus สายพันธุ์ปักกิ่ง (Beijing) ที่มีความเข้มข้น $10^{4.87}$ $TCID_{50}$/ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างยุง

ทำการเก็บตัวอย่างยุงในจังหวัดนครสวรรค์ จากฟาร์มสุกรพันธุ์จำนวน 2 ฟาร์ม แหล่งชุมชนจำนวน 1 แหล่ง และแหล่งนกธรรมชาติ 1 แหล่งจากบึงบอระเพ็ด ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมีนาคม ถึง เดือนตุลาคมเป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยใช้เครื่องจับยุงที่มีหลอดไฟ และคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำแข็งแห้ง เป็นตัวล่อให้ยุงมายังเครื่องจับยุง (CDC light traps baited CO_2) และจะทำการดักในช่วงเวลา 18.00 – 07.00 น. ของวันรุ่งขึ้น ซึ่งเป็นช่วงที่ยุงซึ่งเป็นพาหะของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีมีปริมาณมาก จากนั้นขนส่งตัวอย่างมาที่ห้องทดลองต่อไป

ทำการสุ่มตัวอย่างยุงจากยุงที่จับได้จากแหล่งนกธรรมชาติและแหล่งสุกรจำนวนแหล่งละ 100 pools สำหรับแหล่งชุมชนเก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 24 pools ซึ่งแต่ละ pool ประกอบด้วยยุงไม่เกิน 50 ตัว

ตัวอย่างเลือดสุกร

ทำการเจาะเลือดจากลูกสุกรพันธุ์ คละเพศ จำนวน 40 ตัวที่อายุ 8 และ 14 สัปดาห์จากฟาร์มสุกรที่ทำการเก็บตัวอย่างยุงฟาร์มที่หนึ่งและในฟาร์มสุกรพันธุ์ที่สองทำการเก็บตัวอย่างเลือดลูกสุกรที่อายุ 21 และ 27 สัปดาห์ แล้วนำเลือดที่ได้มาปั่นแยกซีรั่ม เก็บตัวอย่างซีรั่มไว้ที่ -20°C เพื่อรอการตรวจหาระดับแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสเจอีต่อไป

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบด้วยวิธีฮีแมกลูติเนชั่น อินฮิบิชั่น (Hemagglutination Inhibition Test)

ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีจากซีรั่มของลูกสุกรด้วยวิธีฮีแมกลูติเนชั่น อินฮิบิชั่น (Hemagglutination Inhibition Test : HI test) โดยใช้ไวรัสแอนติเจนไข้สมองอักเสบเจอี สเตรน ปักกิ่ง (Beljing) และเม็ดเลือดแดงห่านที่ความเข้มข้น 0.5 % ตามวิธีของ Clarke and Casals (1958) โดยย่อดังนี้ ทำการทดสอบ HI โดยใส่ borate saline pH 9.0 ที่มีการเติม 0.4 % bovine albumin ใน 96 well microplate ทุกหลุมๆ ละ 25 µL จากนั้นใส่ตัวอย่างซีรัมที่ผ่านขั้นตอนการกำจัด non-specific destroying enzyme ด้วย Acetone extraction ในแถวแรก หลุมละ 25 µL ทำสารละลายเจือจาง 2 เท่า (2- fold dilution) โดยดูดสารละลายจากแถวแรก 25

µL ใส่ในแถวที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดไปใส่ในแถวถัดไปเรื่อยๆ จนถึงแถวรองสุดท้ายให้ดูดสารละลายทิ้ง (แถวสุดท้ายเป็น negative control) เติมสารละลายไวรัสใน 0.4 % bovine albumin boratr saline pH 9.0 ที่มีค่าเท่ากับ 8 HA unit หลุมละ 25 µL ตั้งไว้ในตู้เย็น นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เติมเม็ดเลือดแดงห่าน 0.5 % ใน phosphate buffer ที่ pH 6.6 ทุกหลุมๆ ละ 50 µL เคาะเบาๆ เพื่อให้สารละลายผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลระดับแอนติบอดี้เป็นส่วนกลับของลำดับการเจือจางต่ำสุดที่ยั้บยั้งการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงได้ โดยกำหนดค่าแอนติบอดีที่ให้ผลบวกต่อการตรวจที่ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 10 จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับผล RT-PCR ที่ได้

Viral extraction

เมื่อได้ตัวอย่างยุงแล้วทำการแยกชนิด (species) และเพศของยุง โดยการดูลักษณะภายนอก (morphology) (Rattanarithikul and Panthusiri, 1994) จากนั้นเลือกแต่ยุงเพศเมียและแบ่งยุงออกเป็นกลุ่ม (pool) ตามชนิดของยุง ทำการบดยุงที่จับมาได้ใน 300 µL PBS เติมลูกโลหะขนาดเล็ก (Crosman, USA) จำนวน 4 ลูก แล้วปั่นด้วย vortex จนยุงละเอียด จากนั้นเติม PBS อีกจำนวน 1,200 µL ปั่นซ้ำอีกครั้งด้วย vortex จากนั้นทำการปั่นด้วย centrifuge ที่ 5,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บและแบ่งส่วนใสที่ได้เพื่อทำการสกัด RNA สำหรับการทดสอบ RT-PCR และสำหรับการลงในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทำการแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัสเจอีต่อไป

การสกัด RNA จากตัวอย่าง

ทำการสกัด RNA จากตัวอย่างยุง ด้วย TRIzol LS® reagent (invitrogen, USA) โดยนำตัวอย่างจากยุงที่ได้บดแล้วจำนวน 250 µL กับ TRIzol LS จำนวน 750 µL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม Chloroform จำนวน 200 µL ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บเฉพาะส่วนใสลงในหลอดที่สะอาด จากนั้นเติม isopropanol alcohol จำนวน 500 µL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้าง RNA pellet ด้วย 70 % ethanol 1 mL แล้วผสมตัวอย่างด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 rpm

ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บ RNA ใน 70 % ethanol ที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นทำการเทส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ส่วนตะกอนแห้งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม RNase-free water หรือ DEP-C treated water จำนวน 40 µL

ทำการรักษาสภาพของ RNA ที่ -80°C เพื่อเตรียมนำไปใช้งานต่อไป

ขั้นตอนการทำปฏิกริยา Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำ RNA ที่ได้จากการสกัดจำนวน 5 µL มาสังเคราะห์เป็น cDNA และเพิ่มจำนวนโดยใช้ AccessOuick™ RT-PCR system (Promega, USA) และ primers ที่จำเพาะต่อ C/Pr M gene ของไวรัสเจอี (ออกแบบโดยหน่วยไวรัสวิทยา) ที่มีลำดับเบส ดังนี้

Forward 5' GAC TAA AAA ACC AGG AGG GC

Reverse 5' CTC CCC ATG TGT TTG GAC CG

โดยผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ primer นี้จะมีความยาว 681 base pair (bp) ขั้นตอนในการทำพีซีอาร์มีดังนี้

AccessQuick (2x Master Mix) (Promega)	12.5	µL
forward primer	1	µL
reverse primer	1	µL
AMV reverse transcriptase (5U)	0.5	µL
RNase-free water	8.5	µL

จากนั้นนำ master mix ที่เตรียมไว้มาเติม template DNA ของตัวอย่างจำนวน 1.5 µL และนำไปเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง thermocycler (Perkin Elmer Cetus 9600, CA, USA) โดยผ่านกระบวนการที่มีอุณหภูมิตามลำดับดังนี้

Reverse transcription	48°C	45	นาที	
Initial PCR activation	94°C	3	นาที	
Denaturation	94°C	30	วินาที	35 รอบ
Annealing	58°C	30	วินาที	
Extension	72°C	30	วินาที	
Final extension	72°C	7	นาที	

เก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาเข้าสู่กระบวนการในลำดับต่อไป

การตรวจหา RT-PCR product

นำผลผลิตที่ได้จำนวน 10 µL ไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis โดยมี 100 base pair (bp) DNA ladder (GIBCO BRL life Technologies Inc., Gaitherberg) เป็น marker เปรียบเทียบ และย้อมสีด้วย Ethidium bromide (2 µL/ml) ดูผลด้วยกล้อง UV transluminator ซึ่งจะให้ผลผลิตที่มีขนาด 681 bp

การทดสอบความไว (Sensitivity) **ของ** primer C /pre M **ต่อเชื้อ** JE **เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี** RT-PCR

ทำการทดสอบโดยนำเชื้อไวรัสเจอี สเตรน ปักกิ่ง ที่มีความเข้มข้น $10^{4.87}$ $TCID_{50}$/ ml มาทำการเจือจางทีละสิบเท่าไปจนถึง $10^{-3.87}$ $TCID_{50}$/ ml จากนั้นทำการตรวจหา RNA ของไวรัสเจอีด้วยวิธี RT-PCRตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น โดยอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลผลิตที่มองเห็นได้

Virus isolation

นำตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ RT - PCR มารวมกันในยุงชนิดเดียวกันที่มาจากแหล่ง และเวลาเดียวกัน (โดย 1 pool มีจำนวนยุงไม่เกิน 250 ตัว) ทำการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 cells เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ supernate ที่ได้จากการบดยุง จากนั้นนำเซลล์ไป freeze ที่อุณหภูมิ -80 °C แล้วนำมา thaw เพื่อลงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cells อีกครั้งเป็นเวลา 3 วัน ใน 96 well microplate โดยทำการเลี้ยงแบบ co - culture ก่อนนำไปย้อมตรวจหาแอนติเจนของไวรัสเจอีต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Immunocytochemistry staining

นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทำการย้อมโดย นำเพลทมาสะบัดน้ำเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้น Fix เซลล์ด้วย 4 % formalin ใน PBS Tween (PBST) 0.5 % หลุมละ 100 µl incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้น สะบัดเพลทให้แห้ง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง โดยใช้ PBST จำนวน 150 µl/หลุม แล้วเติม Mouse Anti – Japanese encephalitis (nakayama) monoclonal antibody (Millipore, USA) โดยใช้อัตราส่วน 1: 200 ใน PBST + 1 % Bovine serum albumin (BSA) ใส่ในปริมาตร 50 µl/หลุม incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น สะบัดเพลทให้แห้ง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง โดยใช้ PBST จำนวน 150 µl/หลุม แล้วเติม Goat Anti–mouse IgG horseradish peroxidase Conjugate (Dako, Denmark) ในอัตราส่วน 1: 250 (diluteด้วย PBST + 1 % BSA) ใส่ในปริมาตร 50 µl/หลุม จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้ที่มี CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสะบัดเพลทให้แห้ง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง โดยใช้ PBST จำนวน 150 µl/หลุม เติม substrate โดยใช้ 0.4 % 3–amino–9–acethyl–carbazol (AEC, Sigma-Aldrich, USA) ใน Acetate buffer และ 30 % H_2O_2 โดยมีอัตราส่วน AEC : Acetate buffer : H_2O_2 เท่ากับ 1ml : 19 ml : 20 µl ใส่หลุมละ 100 µl จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้ที่มี CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย DW 1 ครั้ง สะบัดเพลทให้แห้ง แล้วอ่านผล โดยดูการติดสีน้ำตาลแดงที่ปรากฏภายในเซลล์

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้เป็นสถิติแบบพรรณา โดยแสดงผลที่ได้เป็น

- จำนวน และชนิดของยุงในแต่ละแหล่ง แต่ละช่วงเวลา
- การติดเชื้อในยุงชนิดต่างๆ โดยใช้ minimum estimate infection rate (MEIR) ต่อยุง 1,000 ตัว ซึ่งคำนวณได้จาก จำนวน pool ที่ให้ผลบวก หารด้วยจำนวนยุงทั้งหมด คูณด้วย 1,000

จากนั้นทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในยุงชนิดต่างๆที่พบ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การแยกชนิดของยุง

ทำการแยกชนิดของยุงเฉพาะยุงเพศเมียจากแหล่งชุมชน แหล่งนกธรรมชาติ และฟาร์มสุกร ตามเวลาที่ทำการศึกษารายละเอียด ดังตารางที่ 2, 3, 4 ตามลำดับ พบว่ายุงที่แหล่งชุมชนมีจำนวนยุงสกุล *Mansonia* spp. สูงในเดือน เมษายนและ เดือนกรกฎาคม ในขณะที่เดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคมพบว่า มียุงในสกุล *Culex* spp. (*Culex vishnui* subgroup และ *Culex gelidus*) เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 5) ในแหล่งนกธรรมชาติ (บึงบอระเพ็ด) พบจำนวนยุงในกลุ่ม *Culex vishnui* subgroup มากในทุกเดือนที่ทำการศึกษา และมียุงในสกุล *Mansonia* spp. มากเป็นอันดับสอง ซึ่งยุงในสกุลนี้ประกอบด้วยยุง *Mansonia uniformis*, *Mansonia indiana* และ *Mansonia annulifera* (ภาพที่ 6) สำหรับยุงที่ทำการดักได้จากฟาร์มสุกรพบว่ามีจำนวนยุงในสกุล *Culex* spp. สูงที่สุดเช่นกัน (ภาพที่ 7) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยุง *Culex vishnui* subgroup ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจำนวนยุงและชนิดที่ดักได้จากทั้ง 3 แหล่งที่ทำการศึกษาพบว่า ยุงสกุล *Culex* spp. พบได้สูงที่สุด รองลงมาคือยุงสกุล *Mansonia* spp. (ภาพที่ 8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนยุงเป็นตัว (เปอร์เซ็นต์) ชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งชุมชนในเดือน เมษายน – ตุลาคม พ.ศ. 2550 ในเขตจังหวัดนครสวรรค์

ชนิดของยุง	เดือน				
	เมษายน	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม
Culex gelidus	-	9 (24.32%)	55 (32.35%)	57 (28.5%)	78 (38.05%)
Culex vishnui subgroup	2 (18.18%)	9 (24.32%)	88 (51.78%)	136 (68%)	123 (60%)
Culex fuscocephala	-	-	-	-	-
Culex quinquefasciatus	-	-	3 (1.77%)	-	-
Mansonia indiana	2 (18.18%)	7 (18.93%)	8 (4.7%)	-	-
Mansonia uniformis	7 (63.64%)	12 (32.43%)	5 (2.94%)	-	-
Mansonia annulifera	-	-	-	-	-
Anopheles barbirostris	-	-	5 (2.94%)	-	-
Anopheles peditaeniatus	-	-	2 (1.18%)	1 (0.5%)	-
Anopheles tessellates	-	-	-	-	1 (0.49%)
Anopheles sundaicus	-	-	4 (2.35%)	-	2 (0.98%)
Anopheles stephensi	-	-	-	-	-
Armigeres subalbatus	-	-	-	6 (3%)	1 (0.49%)
รวม	11	37	170	200	205

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

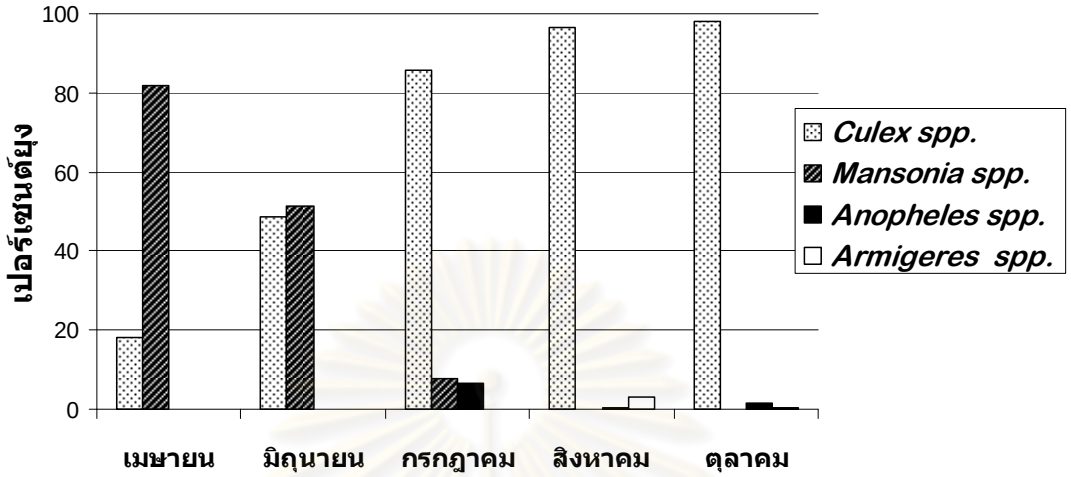
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนยุงเป็นตัว (เปอร์เซ็นต์) ชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งนก ในเดือน มีนาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2550 ในเขตจังหวัดนครสวรรค์

ชนิดของยุง	เดือน					
	มีนาคม	เมษายน	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม
Culex gelidus	-	1 (0.15%)	39 (1.97%)	96 (4.11%)	1 (0.18%)	108 (5.73%)
Culex vishnui subgroup	2,020 (78%)	364 (56.18%)	1,613 (81.34%)	1,674 (71.66%)	219 (38.9%)	1,349 (71.57%)
Culex fuscocephala	-	1 (0.15%)	-	1 (0.04%)	-	-
Culex quinquefasciatus	-	1 (0.15%)	1 (0.05%)	8 (0.34%)	-	-
Mansonia indiana	177 (6.83%)	100 (15.44%)	205 (10.34%)	231 (9.89%)	177 (31.45%)	162 (8.59%)
Mansonia uniformis	204 (7.9%)	125 (19.3%)	70 (3.53%)	124 (5.31%)	140 (24.87%)	168 (8.91%)
Mansonia annulifera	118 (4.55%)	47 (7.25%)	33 (1.66%)	42 (1.8%)	2 (0.34%)	13 (0.69%)
Anopheles barbirostris	31 (1.2%)	1 (0.15%)	4 (0.2%)	12 (0.51%)	3 (0.53%)	42 (2.23%)
Anopheles peditaeniatus	15 (0.57%)	-	1 (0.05%)	90 (3.85%)	-	4 (0.21%)
Anopheles tessellates	8 (0.3%)	-	13 (0.66%)	6 (0.26%)	-	1 (0.05%)
Anopheles sundaicus	1 (0.04%)	-	2 (0.1%)	6 (0.26%)	-	6 (0.32%)
Anopheles stephensi	-	-	2 (0.1%)	-	-	-
Armigeres subalbatus	16 (0.61%)	8 (1.23%)	-	46 (1.97%)	21 (3.73%)	32 (1.7%)
รวม	2,590	648	1,983	2,336	563	1,885

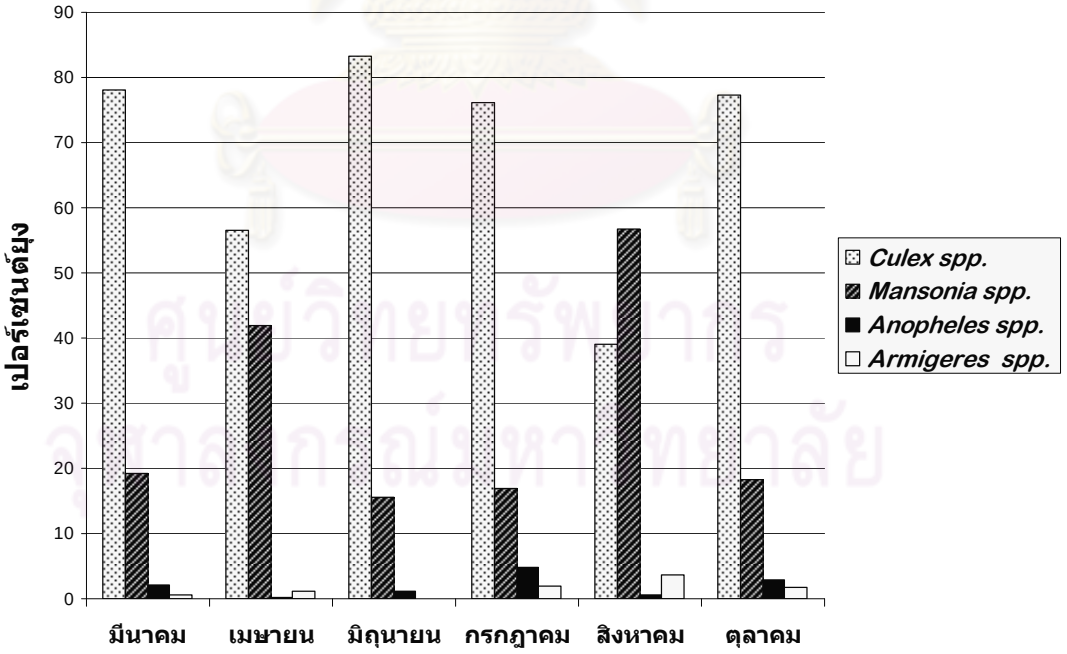
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนยุงเป็นตัว (เปอร์เซ็นต์) ชนิดต่างๆที่ดักได้จากฟาร์มสุกร 2 แห่งในเดือน เมษายน – ตุลาคม พ.ศ. 2550 ในเขตจังหวัดนครสวรรค์

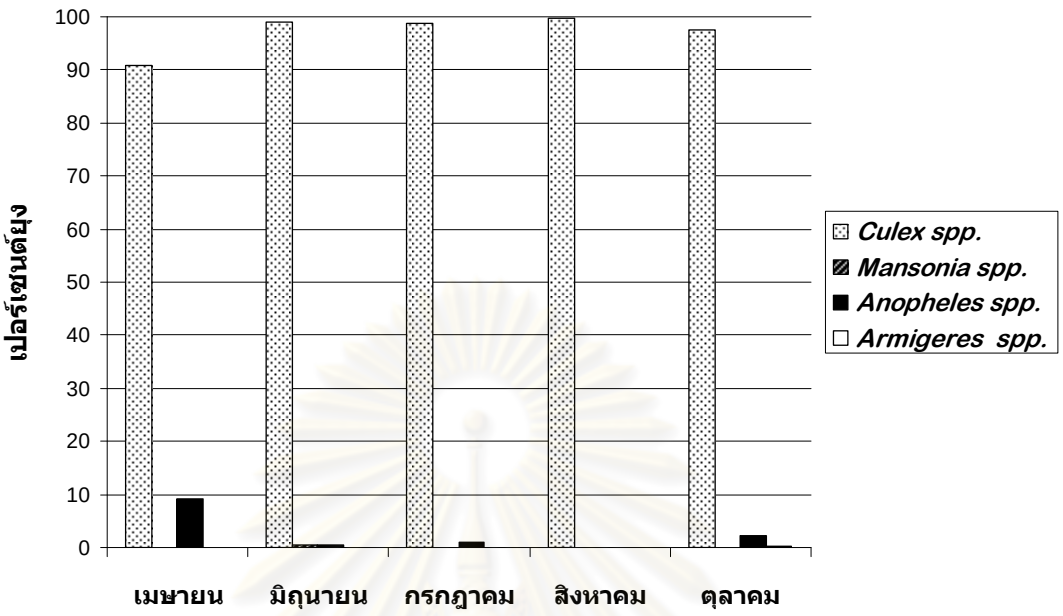
	เดือน							
			ฟาร์ม 1			ฟาร์ม 2		
ชนิดของยุง	เมษายน	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม
Culex gelidus	2 (0.61%)	-	7 (0.16%)	6 (0.08%)	528 (3.045%)	-	-	34 (2.28%)
Culex vishnui subgroup	294 (90.2%)	370 (98.92%)	4,434 (98.66%)	7,369 (99.7%)	16,363 (94.37%)	3 (100%)	142 (99.3%)	1,408 (94.3%)
Culex fuscocephala	-	-	-	-	-	-	-	-
Culex quinquefasciatus	-	-	1 (0.02%)	3 (0.04%)	19 (0.11%)	-	1 (0.7%)	-
Mansonia Indiana	-	1 (0.27%)	-	3 (0.04%)	-	-	-	-
Mansonia uniformis	-	1 (0.27%)	2 (0.05%)	-	-	-	-	-
Mansonia annulifera	-	-	-	-	-	-	-	-
Anopheles barbirostris	16 (4.9%)	-	6 (0.13%)	-	1 (0.005%)	-	-	1 (0.07%)
Anopheles peditaeniatus	13 (3.99%)	1 (0.27%)	31 (0.69%)	10 (0.14%)	418(2.4%)	-	-	-
Anopheles tessellates	-	-	2 (0.05%)	-	8 (0.05%)	-	-	-
Anopheles sundaicus	-	-	10 (0.22%)	-	3 (0.02%)	-	-	1 (0.07%)
Anopheles stephensi	1 (0.3%)	1 (0.27%)	-	-	-	-	-	-
Armigeres subalbatus	-	-	1 (0.02%)	-	-	-	-	49 (3.28%)
รวม	326	374	4,494	7,391	17,340	3	143	1,493



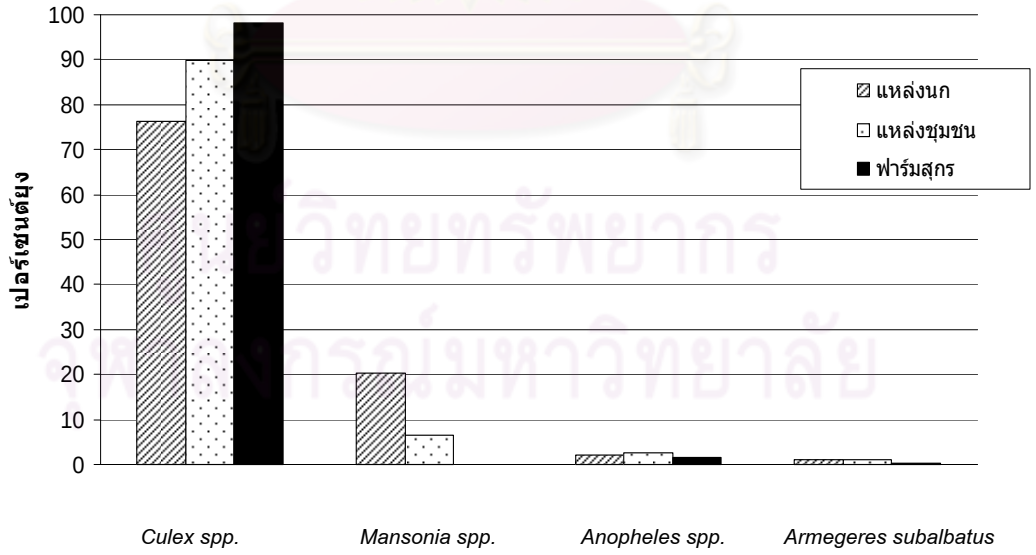
ภาพที่ 5 แสดงร้อยละปริมาณยุงชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งชุมชนแยกตามสกุล ในเดือน เมษายน – ตุลาคม



ภาพที่ 6 แสดงร้อยละปริมาณยุงชนิดต่างๆที่ดักได้จากแหล่งนกธรรมชาติแยกตามสกุล ในเดือนมีนาคม - ตุลาคม



ภาพที่ 7 แสดงร้อยละปริมาณยุงชนิดต่างๆที่ดักได้จากฟาร์มสุกรแยกตามสกุล ในเดือน เมษายน – ตุลาคม



ภาพที่ 8 แสดงร้อยละปริมาณยุงเปรียบเทียบจาก 3 แหล่งการศึกษา โดยแยกตามสกุล

การตรวจหาไวรัสเจอีจากยุงโดยตรง

จากการตรวจหาไวรัสเจอีจากตัวอย่างยุงโดยตรงด้วยวิธี RT-PCR จากแหล่งชุมชน แหล่งนกและฟาร์มสุกร พบว่าให้ผลเป็นบวก 1 pool จากยุง *Culex vishnui* subgroup จากแหล่งนก (บึงบอระเพ็ด) ในเดือนมิถุนายน แต่เมื่อทำซ้ำให้ผลเป็นลบ ในขณะที่ตัวอย่างจากแหล่งชุมชนและฟาร์มสุกรให้ผลเป็นลบทั้งหมด โดยผลแสดงดังตารางที่ 5, 6, 7 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเจอีโดยตรงจาก pool ยุง (1 pool มียุงไม่เกิน 50 ตัว) ที่ดักได้จากแหล่งชุมชนด้วยวิธี RT-PCR (จำนวน 24 pools)

ชนิดของยุง	เดือน				
	เมษายน (pools)	มิถุนายน (pools)	กรกฎาคม (pools)	สิงหาคม (pools)	ตุลาคม (pools)
Culex vishnui subgroup	0/1	0/1	0/2	0/3	0/3
Culex gelidus	-	0/1	0/2	0/2	0/2
Culex quinquefasciatus	-	-	0/1	-	-
Mansonia Indiana	0/1	0/1	0/1	-	-
Mansonia uniformis	0/1	0/1	0/1	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเจอีโดยตรงจาก pool ยุง (1 pool มียุงไม่เกิน 50 ตัว) ที่ดักได้จากแหล่งนกด้วยวิธี RT-PCR (จำนวน 100 pools)

ชนิดของยุง	เดือน					
	มีนาคม (pools)	เมษายน (pools)	มิถุนายน (pools)	กรกฎาคม (pools)	สิงหาคม (pools)	ตุลาคม (pools)
Culex vishnui subgroup	0/15	0/8	1/15*	0/15	0/5	0/15
Culex gelidus	-	0/1	0/1	0/2	0/1	0/3
Culex fuscocephala	-	0/1	-	0/1	-	-
Culex quinquefasciatus	-	0/1	0/1	0/1	-	-
Mansonia Indiana	0/1	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1
Mansonia uniformis	0/1	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1

* เมื่อทำซ้ำให้ผลเป็นลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

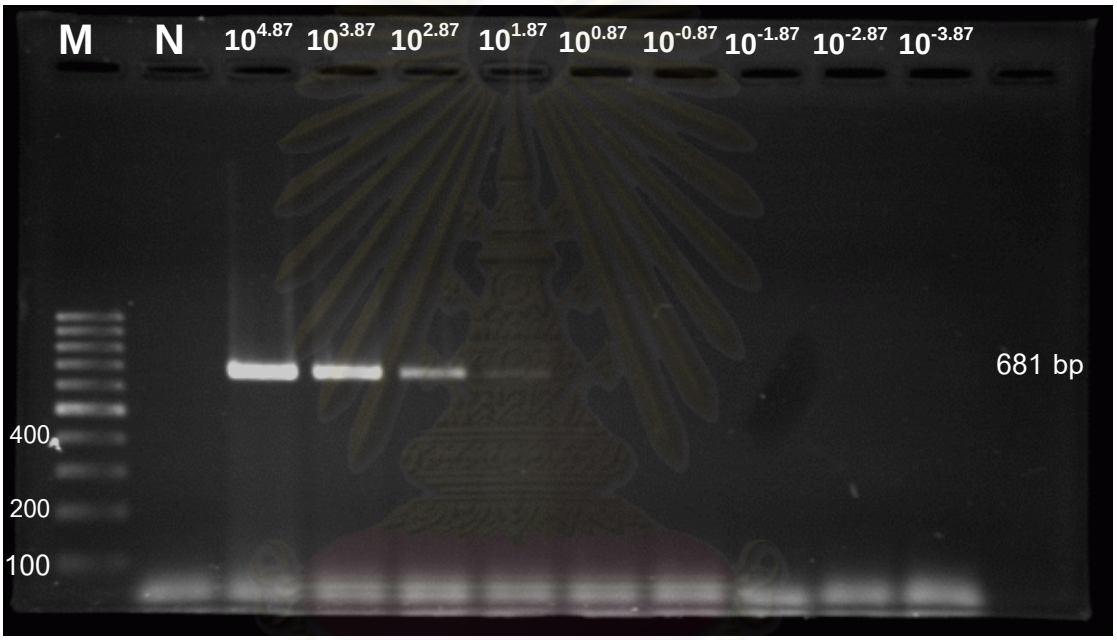
ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจหาไวรัสเจอีโดยตรงจาก pool ยุง (1 pool มียุงไม่เกิน 50 ตัว) ที่ดักได้จากฟาร์มสุกรด้วยวิธี RT-PCR (จำนวน 100 pools)

ชนิดของยุง	เดือน				
	เมษายน (pools)	มิถุนายน (pools)	กรกฎาคม (pools)	สิงหาคม (pools)	ตุลาคม (pools)
Culex vishnui subgroup	0/6	0/8	0/21	0/21	0/21
Culex gelidus	0/1	-	0/1	0/1	0/12
Culex quinquefasciatus	-	-	0/1	0/2	0/1
Mansonia Indiana	-	0/1	-	0/1	-
Mansonia uniformis	-	0/1	0/1	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความไวของ primer C /pre M ในการตรวจหาไวรัสเจอีเมื่อทำการทดสอบโดยวิธี RT-PCR

ทำการประเมินความไวของ primer C/pre M ต่อเชื้อไวรัสเจอี เมื่อทำการตรวจหาไวรัสเจอีโดยวิธี RT-PCR โดยเจือจางไวรัสเจอี ทีละ 10 เท่า ที่มีความเข้มข้นเทียบเท่าตั้งแต่ $10^{4.87}$ $TCID_{50}$/ ml จนถึง $10^{-3.87}$ $TCID_{50}$/ ml พบว่าสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อไวรัสเจอีได้ต่ำสุดที่ $10^{1.87}$ $TCID_{50}$/ ml (ภาพที่ 9)



<u>ภาพที่ 9</u> แสดงความไวของ primer C/pre M ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเจอี โดยวิธี RT-PCR ที่ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จาก $10^{4.87}$ $TCID_{50}$/ ml จนถึง $10^{-3.87}$ $TCID_{50}$/ ml (lane 3 – lane 11) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ (N) และ 100 bp ladder marker (M)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเจอีด้วยวิธีฮีแมกลูติเนชั่น อินฮิบิชั่น

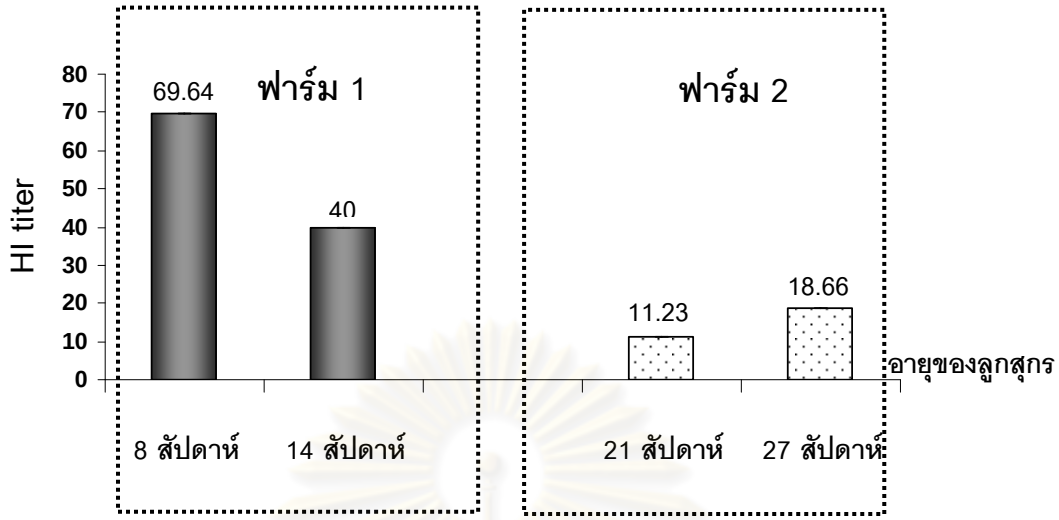
ทำการตรวจซีรั่มลูกสุกรคละเพศ จากฟาร์มสุกรพันธุ์ 2 ฟาร์มที่ทำการเก็บตัวอย่างยุง เพื่อทำการยืนยันการติดเชื้อไวรัสเจอี โดยฟาร์มที่หนึ่งเจาะเลือดลูกสุกรพันธุ์อายุ 8 และ 14 สัปดาห์ และในฟาร์มสุกรพันธุ์ที่สองทำการเก็บตัวอย่างเลือดลูกสุกรที่อายุ 21 และ 27 สัปดาห์ เพื่อหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีต่อ HI ให้ผลดังตารางที่ 8 โดยพบว่าในลูกสุกรฟาร์มที่ 1 มีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีในระดับค่า Geometric mean 69.64 ที่อายุ 8 สัปดาห์ และลดต่ำลงมาเป็น 40 ในอายุ 14 สัปดาห์ ในขณะที่ฟาร์มที่ 2 ยังคงสามารถตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอี ที่อายุ 21 และ 27 สัปดาห์อยู่ในระดับ Geometric mean ที่ 11.23 และ 18.66 ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงระดับภูมิคุ้มกันต่อ Haemagglutination Inhibition ของเชื้อไวรัสเจอีในลูกสุกรอายุ 8 และ14 สัปดาห์ จากฟาร์มสุกรพันธุ์ที่หนึ่งและในลูกสุกรอายุ 21 และ 27 สัปดาห์ จากสุกรพันธุ์ฟาร์มที่สอง ที่ทำการศึกษาในจังหวัดนครสวรรค์

ฟาร์ม 1				ฟาร์ม 2			
อายุ 8 สัปดาห์		อายุ 14 สัปดาห์		อายุ 21 สัปดาห์		อายุ 27 สัปดาห์	
ตัวอย่างที่ (n =10)	ระดับภูมิคุ้มกัน	ตัวอย่างที่ (n =10)	ระดับภูมิคุ้มกัน	ตัวอย่างที่ (n =10)	ระดับภูมิคุ้มกัน	ตัวอย่างที่ (n =10)	ระดับภูมิคุ้มกัน
1	20	11	20	21	10	31	160
2	160	12	20	22	20	32	10
3	160	13	20	23	10	33	20
4	40	14	40	24	20	34	10
5	160	15	80	25	20	35	20
6	40	16	80	26	20	36	10
7	20	17	80	27	10	37	10
8	80	18	80	28	0	38	20
9	160	19	40	29	10	39	20
10	80	20	20	30	20	40	20
Geometric mean	69.64		40		11.23		18.66
% Coefficient Variance	67.36		59.58		49.94		153.16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ย geometric mean ของระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเจอี โดยวิธี haemagglutination inhibition test ในลูกสุกร จาก ฟาร์มสุกร 2 ฟาร์มในจังหวัดนครสวรรค์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการแยกเชื้อไวรัสเจอีในเซลล์เพาะเลี้ยงและพิสูจน์ด้วย Immunocytochemistry staining

นำยุงที่ให้ผลลบต่อ RT-PCR มาทำการทดสอบต่อ โดยการรวมตัวอย่างยุงชนิดเดียวกัน แหล่งและเวลาเดียว ให้ 1 pool มีจำนวนยุงอย่างน้อย 1 ตัวแต่ไม่เกิน 250 ตัวจากนั้นทำการแยกเชื้อไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงและพิสูจน์เชื้อโดยนำมาย้อมด้วย immonocytochemistry staining ที่ใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเจอี พบว่าให้ผลบวกในยุงจากทั้งสามแหล่งการศึกษา โดยยุงจากแหล่งชุมชนที่ให้ผลบวกประกอบด้วย ยุง *Culex vishnui* subgroup จำนวน 1 pool *Culex gelidus* จำนวน 1 pool และ *Mansonia uniformis* จำนวน 1 pool ในเดือนมิถุนายน ยุง *Culex gelidus* จำนวน 1 pool ในเดือนสิงหาคม และในเดือนตุลาคมพบยุง *Culex vishnui* subgroup ให้ผลบวกจำนวน 1 pool

ยุงที่ให้ผลบวกจากแหล่งนก ในเดือนเมษายนประกอบด้วยยุง *Mansonia idiana* จำนวน 2 pool และยุง *Mansonia uniformis* จำนวน 1 pool และยุงที่ให้ผลบวกในเดือนมิถุนายนและเดือนตุลาคม คือยุง *Mansonia uniformis* จำนวน 1 pool

ยุงจากฟาร์มสุกรที่ให้ผลบวก ประกอบด้วยยุง *Culex vishnui* subgroup ในเดือนกรกฎาคมและเดือนตุลาคมจำนวน 1 และ 2 pools ตามลำดับ และยุง *Culex gelidus* จำนวน 1 pool ในเดือนตุลาคม ซึ่ง pool ที่ให้ผลบวกจะติดสีน้ำตาลแดง ในขณะที่ pool ที่ให้ผลลบจะไม่มีการติดสี (ภาพที่ 11) อัตราการติดเชื้อไวรัสเจอีในยุงทุกชนิด ภาพรวมในแหล่งชุมชน แหล่งนกและฟาร์มสุกร เป็น (5/17) 29.41% (5/37) 13.51% และ (4/26) 15.38% ตามลำดับ pool ที่ให้ผลบวกนำมาคำนวณหาค่า minimum estimate infection rate ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเจอี และย้อมพิสูจน์ด้วย Immunocytochemistry staining ในยุงจากแหล่งชุมชน จำนวน 17 pools (1 pool ประกอบด้วยยุงไม่เกิน 250 ตัว)

ชนิดของยุง	เดือน					รวม
	เมษายน	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม	
Culex vishnui subgroup	0/1	1/1	0/1	0/1	1/2	2/6
Culex gelidus	-	1/1	0/1	1/1	0/1	2/4
Culex quinquefasciatus	-	-	0/1	-	-	0/1
Mansonia Indiana	0/1	0/1	0/1	-	-	0/1
Mansonia uniformis	0/1	1/1	0/1	-	-	1/3
รวม	0/3	3/4	0/5	1/2	1/3	5/17 (29.41%)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเจอี และย้อมพิสูจน์ด้วย Immunocytochemistry staining ในยุงจากแหล่งนก (บึงบอระเพ็ด) จำนวน 37 pools (1 pool ประกอบด้วยยุงไม่เกิน 250 ตัว)

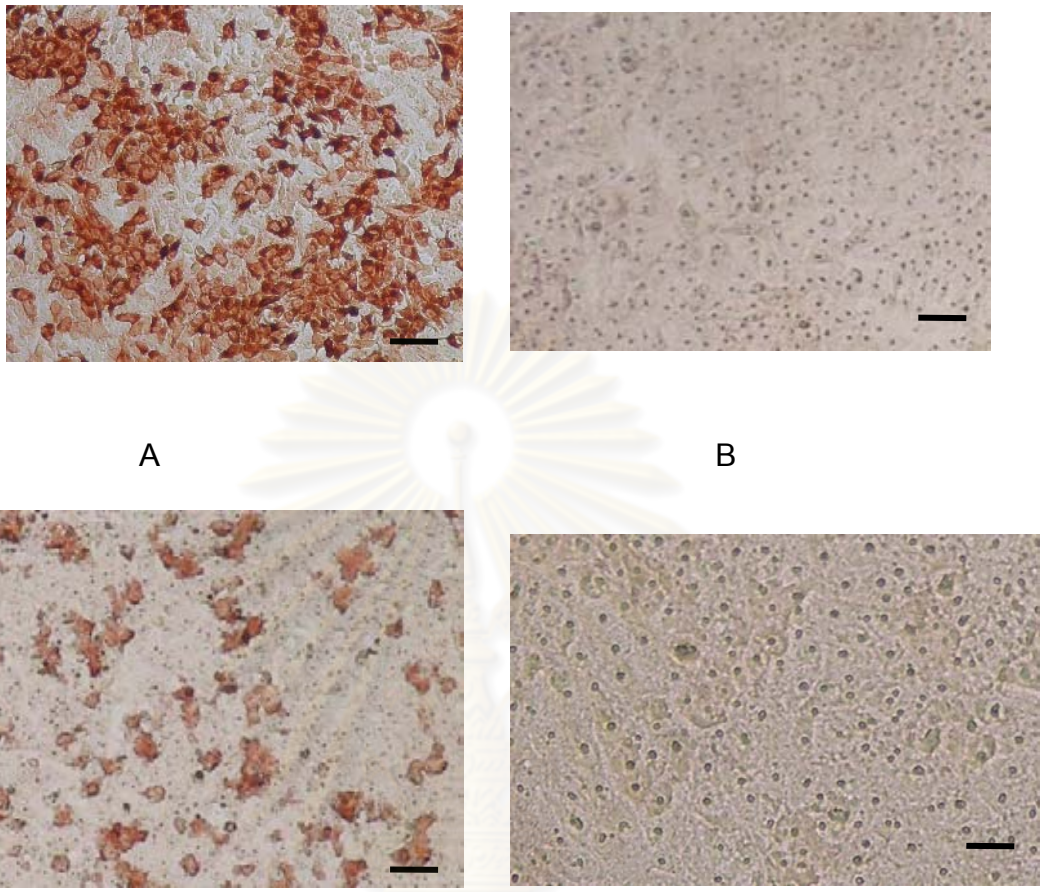
ชนิดของยุง	เดือน						รวม
	มีนาคม	เมษายน	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม	
Culex vishnui subgroup	0/2	0/1	0/3	0/4	0/1	0/3	0/14
Culex gelidus	-	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5
Culex fuscocephala	-	0/1	-	0/1	-	-	0/2
Culex quinquefasciatus	-	0/1	-	0/1	-	-	0/2
Mansonia Indiana	0/1	2/2	0/1	0/1	0/1	0/1	2/7
Mansonia uniformis	0/1	1/2	1/1	0/1	0/1	1/1	3/7
รวม	0/4	3/8	1/6	0/9	0/4	1/6	5/37 (13.51%)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบการเพาะแยกเชื้อไวรัสเจอี และย้อมพิสูจน์ด้วย Immunocytochemistry staining ในยุงจากฟาร์มสุกร จำนวน 26 pools (1 pool ประกอบด้วยยุงไม่เกิน 250 ตัว)

ชนิดของยุง	เดือน					รวม
	เมษายน	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	ตุลาคม	
Culex vishnui subgroup	0/1	0/2	1/4	0/3	2/4	3/14
Culex gelidus	-	-	0/1	0/1	1/4	1/6
Culex quinquefasciatus	-	-	-	0/2	0/1	0/3
Mansonia Indiana	-	0/1	-	-	-	0/1
Mansonia uniformis	-	0/1	0/1	-	-	0/2
รวม	0/1	0/4	1/6	0/6	3/9	4/26 (15.38%)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 11 แสดงการติดสีของแอนติเจนของเชื้อไวรัสเจอีในการเพาะแยกเชื้อจากเซลส์ยุง (C6/36 cells) ใน passage แรก และ vero cells ใน passage ที่สอง จากนั้นใช้ Immunocytochemistry staining ในการพิสูจน์เชื้อ

(A : ตัวควบคุมบวก (positive control), B: ตัวควบคุมลบ (negative control),
C : ตัวอย่างที่ให้ผลบวก และ D : ตัวอย่างที่ให้ผลลบ) (bar = 50 ไมครอน)

คำนวณหาค่า minimum estimate infection rate (MEIR) ต่อยุง 1,000 ตัว ซึ่งเป็นค่าที่แสดงจำนวนยุงที่น้อยที่สุดที่สามารถติดเชื้อได้เมื่อเทียบในยุง 1,000 ตัว ซึ่งค่านี้หาได้ดังนี้

$$\text{MEIR} = \frac{\text{จำนวน pool ที่ให้ผลบวก}}{\text{จำนวนยุงทั้งหมดที่ทำการทดสอบ (ตัว)}} \times 1000$$

พบว่าในยุงจากแหล่งชุมชนที่ให้ผลบวกคือยุง *Mansonia uniformis* จำนวน 1 ตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 2 ตัวอย่างและ *Culex vishnui* subgroup จำนวน 2 ตัวอย่างพบว่าค่า MEIR เท่ากับ 41.67, 10.05 และ 5.59 ตามลำดับ ยุงจากแหล่งนกที่ให้ผลบวกคือยุง *Mansonia uniformis* จำนวน 3 ตัวอย่าง และยุง *Mansonia idiana* จำนวน 2 ตัวอย่าง มีค่า MEIR เท่ากับ 8.57 และ 4.96 ตามลำดับ สำหรับยุงในฟาร์มสุกร พบว่ายุงที่ให้ผลบวกคือยุง *Culex gelidus* จำนวน 1 ตัวอย่าง และยุง *Culex vishnui* subgroup จำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่า MEIR เท่ากับ 1.74 และ 1.24 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ได้ทำการสำรวจหาเชื้อไวรัสเจอี (Japanese Encephalitis virus) จากยุงที่สุ่มเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งชุมชน แหล่งนกในธรรมชาติ และฟาร์มสุกรในเขตจังหวัดนครสวรรค์ เพื่อดูสถานการณ์การติดเชื้อในยุงจากแหล่งต่างๆ ดังกล่าว โดยเชื้อไวรัสเจอีเป็นเชื้อที่มียุงเป็นพาหะในการนำโรค (mosquito borne virus) และมีสุกรและนกเป็นโฮสต์ที่สำคัญในธรรมชาติ (amplifying host) เชื้อไวรัสดังกล่าวยังสามารถติดต่อมายังคนได้อีกด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเจอีในยุงด้วยวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) รวมทั้งการแยกเชื้อไวรัส (virus isolation) ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 cell (เซลล์ยุง) และ vero cell จากนั้นทำการพิสูจน์เชื้อ (virus identification) ด้วยการย้อมด้วยวิธี immunocytochemistry staining โดยใช้ monoclonal antibody ต่อเชื้อไวรัสเจอี เพื่อดูการติดสีซึ่งบ่งถึงการมีเชื้อไวรัสในเซลล์ นอกจากนั้นยังทำการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีด้วยวิธี Heamagglutination Inhibition (HI) ในลูกสุกรจากฟาร์มสุกรพันธุ์ที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างยุงอีกด้วยเพื่อเป็นการยืนยันถึงการหมุนเวียนของเชื้อไวรัสเจอีในบริเวณนั้น การตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อในกลุ่มฟลาวิไวรัส (Flavivirus) ด้วยวิธี RT-PCR นั้นเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลอย่างรวดเร็ว มีความจำเพาะ และความไวสูง (Eldadah et al., 1991; Johansen et al., 2000; Lanciotti et al., 1992; Pandey et al., 1999; Ritchie et al., 1997; Tanaka, 1993) โดยในปี ค.ศ. 1999 Pandey และคณะ ได้ทำการตรวจหาเชื้อฟลาวิไวรัสในยุงในประเทศไทยด้วยวิธี RT-PCR และยืนยันการติดเชื้อด้วยการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงยุงชนิด C6/36 cell และแม้ในปัจจุบันจะมีการนำเอาเทคนิค TaqMan RT-PCR ที่มีความไวสูงกว่า RT-PCR มาใช้ในการหาเชื้อไวรัสเจอีในยุงแต่การแยกเชื้อใน C6/36 cell ก็ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการยืนยันผลการทดสอบ (Van Den Hurk et al., 2006)

การศึกษาครั้งนี้พบว่าชนิดและจำนวนยุงที่พบจากทั้ง 3 แหล่งการศึกษามีปริมาณยุงในสกุล *Culex* สูงที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Culex vishnui* subgroup ที่ประกอบด้วยยุง *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* และ *Culex pseudovishnui* โดยที่ *Culex tritaeniorhynchus* ถือว่าเป็นพาหะหลักของเชื้อไวรัสเจอีในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Buescher et al., 1959b; Gould et al., 1974; Igarashi et al., 1981; Okuno et al., 1973) ผลการศึกษาครั้งนี้ทั้งสามแหล่งพบว่ายุง *Culex vishnui* subgroup เริ่มมีปริมาณมากขึ้นอย่างชัดเจนในเดือนกรกฎาคมถึงเดือน

ตุลาคม พ้องกับการรายงานในแถบกรุงเทพมหานครที่รายงานว่า จำนวนยุงจะสูงที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม ปริมาณปานกลางในเดือนมีนาคม ถึงเดือนเมษายน และพบน้อยที่สุดในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ (Gingrich et al., 1992)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการทดสอบตัวอย่างยุงด้วย RT-PCR ให้ผลการทดสอบเป็นบวกจำกัดอยู่เพียงตัวอย่างเดียวนั้น อาจมีผลสืบเนื่องมาจากวิธีดังกล่าวมีความไว (sensitivity) ในการตรวจที่ค่อนข้างต่ำ ดังจะเห็นได้จากความสามารถในการตรวจหาเชื้อที่จะให้ผลบวกได้นั้นตัวอย่างที่นำมาทดสอบต้องมีปริมาณไวรัสอย่างน้อยที่สุดเท่ากับ $10^{1.87}$ $TCID_{50}$/ ml รวมทั้งยังไม่สามารถบอกได้ว่าไวรัสที่ตรวจพบนั้นเป็นไวรัสที่มีชีวิตหรือไม่ ดังนั้นจึงนำตัวอย่างที่เป็นลบด้วยวิธี RT-PCR มาทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยการเพาะแยกและพิสูจน์เชื้อ โดยนำตัวอย่างยุงมารวมกันอีกครั้งในยุงจากสถานที่ เวลา และชนิดเดียวกัน โดย 1 ตัวอย่างมีจำนวนยุงไม่เกิน 250 ตัว แล้วทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงยุงชนิด C6/36 cell เนื่องจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงยุงมีความสามารถเพิ่มจำนวนตัวเชื้อไวรัสเจอีได้ (Igarashi, 1978) จากนั้นจึงนำมาเพาะแยกเชื้อครั้งที่สองด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cell เนื่องจากเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้เหมาะสมที่จะใช้ในการย้อมพิสูจน์เชื้อไวรัสเจอี โดยวิธี immunocytochemistry staining ซึ่งผลการทดสอบพบว่าให้ผลบวกจากแหล่งชุมชน แหล่งนก และฟาร์มสุกร เป็น 5/17, 5/37 และ 4/26 pools ตามลำดับ การแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นแม้จะมีความยุ่งยากและใช้เวลามากกว่าวิธี RT-PCR แต่เป็นวิธีที่มีความไวสูง โดยที่ไวรัสจะมีการเพิ่มปริมาณในเซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งสามารถนำเชื้อที่ได้ไปในการศึกษาทางด้านอื่นๆ ต่อไปได้

จากชนิดของยุงที่พบบ่งชี้ว่าแหล่งชุมชนอาจเป็นแหล่งกลางที่อาจได้รับเชื้อทั้งจากแหล่งนกธรรมชาติและฟาร์มสุกร เนื่องจากสามารถพบยุงทั้งชนิดที่สามารถพบได้ในฟาร์มสุกรและชนิดที่พบได้ จากแหล่งนกธรรมชาติ นอกจากนั้นในเดือนที่พบเชื้อยังสามารถบอกถึงความเสี่ยงของคนและสัตว์ที่จะสามารถติดเชื้อไวรัสนี้ได้ซึ่งในเดือนเมษายนให้ผลบวกในยุงจากแหล่งนกมากที่สุด ในขณะที่ยุงจากฟาร์มสุกรส่วนใหญ่ให้ผลบวกในเดือนตุลาคม แต่จากแหล่งชุมชนนั้นให้ผลบวกส่วนใหญ่ในเดือนมิถุนายน จากการแสดงผลนี้สามารถบอกได้ว่าในแหล่งชุมชนนั้นมีความเสี่ยงที่คนจะสามารถติดเชื้อไวรัสเจอีนี้ได้จากยุงในเดือนมิถุนายนซึ่งตรงกับการรายงานของกรมควบคุมโรคในปี ค.ศ. 2007 ที่รายงานว่าในประเทศไทยคนสามารถติดเชื้อไวรัสเจอีได้สูงในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม สำหรับยุงจากแหล่งนกก็เช่นเดียวกัน การพบเชื้อมากในเดือนเมษายนนั้นตรงกับช่วงที่แหล่งนกซึ่งในที่นี้คือบึงบอระเพ็ดยังคงมีนกมาอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นนกอพยพส่วนหนึ่ง ในช่วงที่มีนกอพยพมาอาศัยจะเป็นช่วงที่นกสามารถนำเชื้อมาจากแหล่งอื่นและเพิ่มจำนวนเชื้อได้ เนื่องจากนกเป็นโฮสต์ที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเชื้อได้ตัวหนึ่ง ประกอบ

กับการที่พบการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีได้น้อยตรงกับการรายงานของกรมควบคุมโรคในปี ค.ศ. 2006 และ 2007 ที่จังหวัดนครสวรรค์มีรายงานการติดเชื้อไวรัสเจอีเพียง 1 รายในปี ค.ศ. 2006 และไม่มีการรายงานการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในปี ค.ศ. 2007 รายงานการติดเชื้อไวรัสเจอีที่ลดลงในคนอาจเป็นผลโดยตรงจากการรณรงค์การฉีดวัคซีนป้องกันโรคดังกล่าวมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 เป็นต้นมา

สำหรับการติดเชื้อในสุกรนั้นเมื่อทำการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีในลูกสุกรจากฟาร์มสุกรสองฟาร์มแม้จะไม่พบการเกิด seroconversion อย่างเด่นชัด ในลูกสุกรที่นำมาตรวจแต่จากระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีในลูกสุกรที่อายุ 8 สัปดาห์พบว่ามีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีที่สูงจากแม่สุกร (maternal immunity) ที่มีค่า Geometric mean สูงถึง 69.64 ในขณะที่ลูกสุกรที่อายุ 14 สัปดาห์มีค่า Geometric mean เพียง 40 (รูปที่ 10) สามารถบ่งบอกได้ว่าในฟาร์มสุกรนี้มีการวนเวียนของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีจึงทำให้แม่สุกรนั้นมีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีที่สูงและถ่ายทอดมายังลูกสุกรได้ทำให้ลูกสุกรได้รับ maternal immunity ในระดับสูงที่ยังคงแสดงให้เห็นที่อายุ 8 สัปดาห์ และระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีเริ่มลดต่ำลงที่อายุ 14 สัปดาห์ในฟาร์มที่ 1 เพื่อให้เห็นการเกิด seroconversion ตอบสนองการติดเชื้อหมุนเวียนในลูกสุกรในฟาร์มที่2 จึงเลือกศึกษาในลูกสุกรอายุ 21 และ27 สัปดาห์ ตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าในฟาร์มที่ 2 ลูกสุกรเริ่มมีการเกิด seroconversion ที่อายุนี้แต่เมื่อดูจากค่าเฉลี่ย (รูปที่ 10) จะพบว่าระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด อย่างไรก็ตามในประเทศไทยนั้นไม่มีการทำวัคซีนโรคนี้ การปรากฏแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสเจอีแม้จะเป็นการถ่ายทอดจากแม่สุกร ซึ่งพบความชุกสูงจึงเป็นหลักฐานสำคัญในการติดเชื้อไวรัสเจอีในฟาร์มสุกรซึ่งจะพบช่วง viremia สั้นๆไม่เกิน 2-4 วัน (Burke et al.,1988) นอกจากนั้นยุงยังสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทาง transovarian transmission (Rosen et al., 1989a; Rosen et al., 1980) หรือ vertical transmission ได้ (Rosen et al., 1989b) คณิศักดิ์และคณะ (1998) พบว่าลูกสุกรจากฟาร์มสุกรมีความหลากหลายในการเกิด seroconversion ในแต่ละพื้นที่ขึ้นอยู่กับอายุ ตัวสัตว์ สภาพการเลี้ยง สภาพพื้นที่ และปริมาณยุงอีกด้วยที่จะทำให้สุกรเกิดการติดเชื้อและ เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีแตกต่างกันไปในแต่ละฟาร์ม

การศึกษาครั้งได้ทำการบ่งชี้การติดเชื้อในยุงโดยใช้ minimum estimated infection rate (MEIR) เนื่องจากการศึกษาการติดเชื้อในยุงได้ทำการศึกษาจากกลุ่มของยุง (pool) ที่ประกอบไปด้วยยุงหลายๆ ตัว ไม่ได้ทำการศึกษาเป็นรายตัวจึงทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ถึงการติดเชื้อในยุง (infection rate) เป็นค่าที่แน่นอนได้ แต่เป็นการคาดการณ์ถึงการติดเชื้ออย่างน้อยที่สุดเท่าที่จะ

เป็นไปได้ในกลุ่มของยุงที่ทำการศึกษา โดยถ้าเปรียบเทียบกันจะพบว่าเมื่อจำนวนยุงใน pool ของยุงยิ่งมากเท่าไหร่ ค่าของ MEIR ก็จะยิ่งน้อยลงไป

จากการศึกษาพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกในแหล่งชุมชนทั้งยุง *Mansonia uniformis* ที่มีค่า MEIR ต่อยุงจำนวน 1,000 ตัว สูงถึง 41.67 ซึ่งมีความหมายว่า ในยุง *Mansonia uniformis* จำนวน 1000 ตัว มีโอกาสที่จะพบยุงที่มีเชื้อไวรัสเจอีอย่างน้อย 41 ตัว อย่างไรก็ตามเนื่องจากชนิดของยุงดังกล่าวมีปริมาณที่พบน้อยเพียง 24 ตัว เมื่อพบว่าให้ผลบวกคือ พบเชื้อจึงทำให้ค่า MEIR สูง แต่ยุงชนิดนี้พบว่ามีพฤติกรรมแบบ outdoor โดยยุง *Mansonia* spp. มีความชอบในการดูดเลือดคนต่ำ โดยชอบดูดเลือดสุกรมากกว่าดูดเลือดคน (Arunachalam et al., 2004) โอกาสที่คนจะติดเชื้อไวรัสเจอีจากยุงสกุลนี้จึงมีโอกาสน้อยมาก ส่วนยุงในกลุ่ม *Culex* spp. ซึ่งประกอบด้วย *Culex vishnui subgroup* ที่พบให้ผลบวกในแหล่งชุมชนนั้น มีค่า MEIR เท่ากับ 5.59 และ ที่พบในยุง *Culex gelidus* มีค่า MEIR เท่ากับ 10.05 จากรายงานพบว่า ยุงในตระกูล *Culex* spp. เป็นยุงที่มีนิสัยดูดเลือดช่วงกลางคืนยุง *Culex gelidus* เป็นยุงที่มีความชอบในการดูดเลือดสัตว์สูงและมีความชอบในการดูดเลือดคนต่ำ ในขณะที่ยุง *Culex tritaeniorhynchus* นั้น 56.6% ดูดเลือดวัว และ 6.3% ดูดเลือดสุกร แต่บางส่วนมีการดูดเลือดสัตว์หลายชนิดด้วยเช่นกัน (Arunachalam et al., 2005) ในขณะที่ตัวอย่างจากแหล่งนกให้ผลบวกจากยุง *Mansonia* spp. ซึ่งมีค่า MEIR ในยุง *Mansonia uniformis* และ *Mansonia Indiana* เท่ากับ 8.57 และ 4.96 ตามลำดับ ตัวอย่างจากฟาร์มสุกรให้ผลบวกจากยุงในกลุ่ม *Culex* spp. โดยมีค่า MEIR ในยุง *Culex gelidus* และ *Culex vishnui* subgroup เป็น 1.74 และ 1.24 ตามลำดับ ทำให้ตั้งข้อสังเกตได้ว่ายุง *Mansonia* spp. จากแหล่งนกแม้ว่าจะมีโอกาสพบเชื้อสูงระดับหนึ่ง แต่เนื่องจากพฤติกรรมจะชอบดูดเลือดสุกรมากกว่าคนแต่พบว่า ยุง *Mansonia* spp. ในฟาร์มสุกรกลับเป็นประชากรที่มีอัตราการติดเชื้อต่ำกว่า *Culex* spp. และจำนวนยุงที่พบในฟาร์มสุกรต่ำกว่า *Culex* spp. อีกด้วย ยุง *Mansonia* spp. จึงน่าจะมีบทบาทในการแพร่เชื้อจากฟาร์มสุกรไปยังแหล่งชุมชนน้อยกว่า *Culex* spp. นอกจากนั้น *Mansonia* spp. ที่พบจากแหล่งชุมชน อาจเป็นประชากรยุงที่มาจากแหล่งนกโดยตรงในขณะที่ยุง *Culex* spp. อาจเป็นประชากรที่มาจากฟาร์มสุกรมากกว่า และน่าจะเป็นยุง *Culex* spp. ซึ่งมีจำนวนประชากรยุงที่พบมากที่สุดในแหล่งชุมชนที่มีบทบาทในการเป็นพาหะที่สำคัญ ในขณะที่ยุง *Mansonia* spp. มีบทบาทในการแพร่เชื้อในแหล่งชุมชนได้เช่นกันเนื่องจากมีโอกาสในการติดเชื้อสูงกว่าเมื่อดูจากค่า MEIR แม้จะมีจำนวนประชากรที่ต่ำกว่า

นอกจากนั้นการนำเชื้อไวรัสเจอีมาสู่แหล่งชุมชนจากแหล่งนก นอกเหนือจากยุงที่สามารถพบได้โดยทั่วไปแล้วตัวนกเองนั้นสามารถบินอย่างอิสระมายังแหล่งที่เกี่ยวข้องในวงจรไวรัสเจอี

เช่น แหล่งชุมชน เป็นต้น ทำให้เป็นตัวกระจายเชื้อโดยตรงที่แหล่งชุมชนผ่านทางยุงได้เช่นกัน ตรงข้ามกับสุกรที่มีความใกล้ชิดกับคนมากกว่าในฐานะที่เป็นสัตว์เลี้ยง และตัวพาพาหะซึ่งในที่นี้คือยุงที่สำคัญคือ รถยนต์ จากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่ง อาจเป็นปัจจัยที่นำไวรัสเจอีจากฟาร์มสุกรมายุงแหล่งชุมชนได้ รวมถึงการที่มีการเลี้ยงสุกรในหรือใกล้กับแหล่งชุมชนที่อาจเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อไวรัสเจอี นอกจากนั้นในประเทศไทยยังไม่มีการสำรวจการติดเชื้อไวรัสเจอีในนกชนิดต่างๆ ซึ่งอาจจะมีนกที่ใกล้ชนิดกับแหล่งชุมชนโดยตรงที่มีการติดเชื้อไวรัสเจอี

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าเมื่อทำการสำรวจการติดเชื้อไวรัสเจอีในยุงจากแหล่งชุมชน แหล่งนก และฟาร์มสุกรพบจำนวนของยุง *Culex* spp. สูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Culex visnui* subgroup ที่พบว่าเป็นพาหะหลักในการนำเชื้อไวรัสเจอี จากแหล่งที่เกี่ยวข้องจากวงจร เชื้อไวรัสเจอีทั้งสามแหล่งการศึกษา คือ แหล่งชุมชน แหล่งนกธรรมชาติ และฟาร์มสุกร รองลงมาคือ *Mansonia* spp., *Anopheles* spp. และ *Armigeres* spp. นอกจากนั้นยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเจอีได้จากยุง *Culex* spp. และ *Mansonia* spp. ในแหล่งชุมชน จากยุง *Mansonia* spp. ในแหล่งนกธรรมชาติ และจากยุง *Culex* spp. ในฟาร์มสุกร ในช่วงเดือนที่ทำการศึกษา และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสเจอีในยุงจากช่วงเดือนต่างๆทั้งก่อน และ/หรือ ระหว่าง ฤดูฝน จากแหล่งต่างๆที่เกี่ยวข้องกับวงจรไวรัสเจอี

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อสำรวจการติดเชื้อไวรัสเจอีในยุงจากแหล่งชุมชน แหล่งนก และฟาร์มสุกร ในช่วงสั้นๆ สำหรับการศึกษาในครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาระยะยาวอย่างน้อย 1 ปี เพื่อสังเกตความแตกต่างของชนิดและจำนวนยุงที่พบในแต่ละแหล่ง ปริมาณของเชื้อไวรัสเจอีที่พบในยุงที่มีการติดเชื้อ รวมถึงการแยกชนิดของโฮสต์ที่ยุงมาดูดเลือด เพื่อดูว่ายุงที่มีการติดเชื้อโดยส่วนใหญ่ดูดเลือดมาจากสัตว์ในพื้นที่ที่ทำการศึกษาหรือไม่ (แหล่งนก แหล่งชุมชน และฟาร์มสุกร) และความแตกต่างในแต่ละช่วงฤดูต่อการติดเชื้อในยุง นอกจากนั้นควรมีการสำรวจหาชนิดของนกต่างๆจากแหล่งนกธรรมชาติและจากแหล่งอื่นที่เกี่ยวข้องในวงจรการติดเชื้อไวรัสเจอี รวมถึงการศึกษาการเคลื่อนย้ายของยุงจากแหล่งนกธรรมชาติและฟาร์มสุกร

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีการทดสอบด้วย RT-PCR ที่มีความไวต่ำจนไม่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสเจอีได้เมื่อเทียบกับการแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง การเลือกใช้วิธีทดสอบด้วย RT-PCR นั้นสืบเนื่องมาจากเป็นวิธีที่สะดวกและให้ผลรวดเร็วกว่าการเพาะแยกเชื้อ

ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง ในอนาคตถ้าได้ทำการปรับสภาพของ RT-PCRในขั้นตอนต่างๆ การเปลี่ยน primer คู่ใหม่ให้มีความไวสูงขึ้นหรือการพิจารณาพัฒนาวิธีการตรวจแบบ nested RT-PCR เชื่อว่าจะทำให้ RT-PCRมีความไวในการทดสอบสูงขึ้นและจะมีประโยชน์มากขึ้น ซึ่งวิธีนี้ ถือเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการตรวจหาเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในยุงที่มีปริมาณมากได้อย่างรวดเร็วกว่าการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เวลามากกว่า และมีความยุ่งยากมากกว่า

สำหรับการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเจอีของลูกสุกรด้วย HI test ในการศึกษานี้ยังไม่พบการเกิด seroconversion ที่เด่นชัดในลูกสุกร เนื่องจากลูกสุกรในกลุ่มนี้มีการติดเชื้อที่ช้ากว่าที่เคยมีรายงานในแถบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้สามารถบอกได้ว่ามีการวนเวียนของตัวเชื้อไวรัสเจอีในฟาร์มสุกร จึงควรทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มในลูกสุกรเหล่านี้ต่อเนื่องให้ครบทุกอายุของสุกร จะสามารถทำให้ตรวจพบการเกิด seroconversion และจะทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่แน่นอนที่ลูกสุกรเกิดการติดเชื้อไวรัสเจอีจนร่างกายพัฒนาระดับแอนติบอดี้ต่อเชื้อในระดับที่สูงได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ควบคุมโรค,กรม. 2007 (2551) Annual reports. Available from http://203.157.15.4/surdata/disease.php?ds=29

ควบคุมโรค,กรม. 2006 (2549) โรคไข้สมองอักเสบเจอี. Available from http://thaigcd.ddc.moph.go.th/vac_p_JE.html

ควบคุมโรค,กรม. 2005 (2548) Annual reports. Available from http://epid.moph.go.th/Annual/Total_Annual.html

คณิศักดิ์ อรวีระกุล สุมิตรา วัฒโนดร สุพล เลื่องยศลือชากุล สุมาลี บุญมา.1998 (2541) ความชุกของการติดเชื้อไข้สมองอักเสบในฟาร์มสุกร จากเขตภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. เวชชสารสัตวแพทย์ 28(1): 91-97.

ภาษาอังกฤษ

Ali, A., Igarashi, A. 1997. Antigenic and genetic variations among Japanese encephalitis virus strains belonging to genotype 1. Microbiol Immunol. 41: 241-252.

Arunachalam, N., Samuel, P. P., Hiriyan, J., Rajendran, R., Dash, A. P. 2005. Short report: observations on the multiple feeding behavior of Culex tritaeniorhynchus (Diptera: culicidae), the vector of Japanese encephalitis in Kerala in southern India. Am J Trop Med Hyg. 72: 198-200.

Arunachalam, N., Samuel, P. P., Hiriyan, J., Thenmozhi, V., Gajanana, A. 2004. Japanese encephalitis in Kerala, south India: can Mansonia (Diptera: Culicidae) play a supplemental role in transmission? J Med Entomol. 41: 456-461.

Bryant, J. E., Crabtree, M. B., Nam, V. S., Yen, N. T., Duc, H. M., Miller, B. R. 2005. Isolation of arboviruses from mosquitoes collected in northern Vietnam. Am J Trop Med Hyg. 73: 470-473.

Buescher, E. L., Scherer, W .F., Mc, C. H., Moyer, J. T., Rosenberg, M. Z., Yoshii, M., Okada, Y. 1959a. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. IV.

Avian infection. Am J Trop Med Hyg. 8: 678-688.

Buescher, E. L., Scherer, W. F., Rosenberg, M. Z., Gresser, I., Hardy, J. L., Bullock, H. R. 1959b. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. II. Mosquito infection. Am J Trop Med Hyg. 8: 651-664.

Burke, D. S., Leake, C. J. 1988. Japanese encephalitis. In: Monath, T. P., editor The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. Vol.III. Boca Raton: CRC Press: 63-92.

Burke, D. S., Monath, T. P. 2001. Flaviviruses. In: Knipe, D. M., Howley, D. M.,eds. Fields Virology. 1043-1125.

Burke, D. S., Tingpalapong, M., Ward, G. S., Andre, R., Leake, C. J. 1985a. Intense transmission of Japanese encephalitis virus to pigs in a region free of epidemic encephalitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 16: 199-206.

Burke, D. S., Ussery, M. A., Elwell, M. R., Nisalak, A., Leake, C., Laorakpongse, T. 1985b. Isolation of Japanese encephalitis virus strains from sentinel pigs in northern Thailand, 1982. Trans R Soc Trop Med Hyg. 79: 420-421.

Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S., Gubler, D. J. 2002. West Nile virus. Lancet Infect Dis. 2: 519-529.

Cao, J. X., Ni, H., Wills, M. R., Campbell, G. A., Sil, B. K., Ryman, K. D., Kitchen, I., Barrett, A. D. 1995. Passage of Japanese encephalitis virus in HeLa cells results in attenuation of virulence in mice. J Gen Virol. 76 (Pt 11): 2757-2764.

Carey, D. E., Myers, R. M., Webb, J. K., Reuben, R. 1969. Japanese encephalitis in South India. A summary of recent knowledge. J Indian Med Assoc. 52: 10-15.

Chen, W. R., Rico-Hesse, R., Tesh, R. B. 1992. A new genotype of Japanese encephalitis virus from Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 47: 61-69.

Chen, W. R., Tesh, R. B., Rico-Hesse, R. 1990. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. J Gen Virol. 71 (Pt 12): 2915-2922.

Chunsuttiwat, S. 1989. Japanese encephalitis in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 20: 593-597.

Clarke, D. H., Casals, J. 1958. Techniques hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod- borne viruses. Am J Trop Med Hyg. 7(5): 561-73.

Cuzzubbo, A. J., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Solomon, T., Kalayanarooj, S., Aaskov, J.,

Dung, N. M., Devine, P. L. 2000. Comparison of PanBio Dengue Duo IgM and IgG capture ELISA and venture technologies dengue IgM and IgG dot blot. J Clin Virol. 16: 135-144.

Detels, R., Cross, J. H., Huang, W. C., Lien, J. C., Chen, S. 1976. Japanese encephalitis virus in Northern Taiwan, 1969-1973. Am J Trop Med Hyg. 25: 477-485.

Eldadah, Z. A., Asher, D. M., Godec, M. S., Pomeroy, K. L., Goldfarb, L. G., Feinstone, S. M., Levitan, H., Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D.C. 1991. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Med Virol. 33: 260-267.

Endy, T. P., Nisalak, A. 2002. Japanese encephalitis virus: ecology and epidemiology. Curr Top Microbiol Immunol. 267: 11-48.

Gajanana, A., Rajendran, R., Samuel, P. P., Thenmozhi, V., Tsai, T. F., Kimura-Kuroda, J., Reuben, R. 1997. Japanese encephalitis in south Arcot district, Tamil Nadu, India: a three-year longitudinal study of vector abundance and infection frequency. J Med Entomol. 34: 651-659.

Geevarghese, G., George, S., Bhat, H. R., Prasanna, Y., Pavri, K. M. 1987. Isolation of Japanese encephalitis virus from a sentinel domestic pig from Kolar district in Karnataka. Indian J Med Res. 86: 273-275.

Geevarghese, G., Shaikh, B. H., Jacog, P. G., Bhat, H. R. 1991. Monitoring Japanese encephalitis virus activity using domestic sentinel pigs in Mandya district, Karnataka state (India). Indian J Med Res. 93: 140-142.

Gingrich, J. B., Nisalak, A., Latendresse, J. R., Sattabongkot, J., Hoke, C. H., Pomsdhit, J., Chantalakana, C., Satayaphanta, C., Uechiewcharnkit, K., Innis, B. L. 1992. Japanese encephalitis virus in Bangkok: factors influencing vector infections in three suburban communities. J Med Entomol. 29: 436-444.

Gould, D. J., Barnett, H. C., Suyemoto, W. 1962. Transmission of Japanese encephalitis virus by Culex gelidus Theobald. Trans R Soc Trop Med Hyg. 56: 429-435.

Gould, D. J., Edelman, R., Grossman, R. A., Nisalak, A., Sullivan, M. F. 1974. Study of Japanese encephalitis virus in Chiangmai Valley, Thailand. IV. Vector studies. Am J Epidemiol. 100: 49-56.

Gresser, I., Hardy, J. L., Hu, S. M., Scherer, W. F. 1958. Factors influencing transmission of Japanese B encephalitis virus by a colonized strain of Culex tritaeniorhynchus Giles, from infected pigs and chicks to susceptible pigs and birds. Am J Trop Med Hyg. 7: 365-373.

Grossman, R. A., Edelman, R., Chiewanich, P., Voodhikul, P., Siriwan, C. 1973a. Study of Japanese encephalitis virus in Chiangmai valley, Thailand. II. Human clinical infections. Am J Epidemiol. 98: 121-132.

Grossman, R. A., Gould, D. J., Smith, T. J., Johnsen, D. O., Pantuwatana, S. 1973b. Study of Japanese encephalitis virus in Chiangmai Valley, Thailand. I. Introduction and study design. Am J Epidemiol. 98: 111-120.

Hale, J. H., Colless, D. H., Lim, K .A. 1957. Investigation of the Malaysian form of Culex tritaeniorhynchus as a potential vector of Japanese B encephalitis virus on Singapore Island. Ann Trop Med Parasitol. 51: 17-25.

Hale, J. H., Lee, L. H. 1955. Serological evidence of the incidence of Japanese B encephalitis virus infection in Malaysia. Ann Trop Med Parasitol. 49: 293-298.

Halstead, S. B., Jacobson, J. 2003. Japanese encephalitis. Adv Virus Res. 61: 103-138.

Hanna, J. N., Ritchie, S. A., Phillips, D. A., Lee, J. M., Hills, S. L., van den Hurk, A. F., Pyke, A. T., Johansen, C. A., Mackenzie, J. S. 1999. Japanese encephalitis in north Queensland, Australia, 1998. Med J Aust. 170: 533-536.

Hanna, J. N., Ritchie, S. A., Phillips, D. A., Shield, J., Bailey, M. C., Mackenzie, J. S., Poidinger, M., McCall, B. J., Mills, P. J. 1996. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia, 1995. Med J Aust. 165: 256-260.

Hashimoto, H., Nomoto, A., Watanabe, K., Mori, T., Takezawa, T., Aizawa, C., Takegami, T., Hiramatsu, K. 1988. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the genome of Japanese encephalitis virus Beijing-1 strain. Virus Genes. 1: 305-317.

Heinz, F. X., Stiasny, K., Allison, S. L. 2004. The entry machinery of flaviviruses. Arch Virol Suppl. 133-137.

Huang, C., Slater, B., Campbell, W., Howard, J., White, D.2001. Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse transcription-polymerase

chain reaction. J Virol Methods. 94: 121-128.

Huong, V. T., Ha, D. Q., Deubel, V. 1993. Genetic study of Japanese encephalitis viruses from Vietnam. Am J Trop Med Hyg. 49: 538-544.

Igarashi, A. 1978. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. J Gen Virol. 40: 531-544.

Igarashi, A. 1992. Epidemiology and control of Japanese encephalitis. World Health Stat Q. 45: 299-305.

Igarashi, A., Buei, K., Ueba, N., Yoshida, M., Ito, S., Nakamura, H., Sasao, F., Fukai, K. 1981. Isolation of viruses from female Culex tritaeniorhynchus in Aedes albopictus cell cultures. Am J Trop Med Hyg. 30: 449-460.

Johansen, C. A., Nisbet, D. J., Foley, P. N., Van Den Hurk, A. F., Hall, R. A., Mackenzie, J. S., Ritchie, S. A. 2004. Flavivirus isolations from mosquitoes collected from Saibai Island in the Torres Strait, Australia, during an incursion of Japanese encephalitis virus. Med Vet Entomol. 18: 281-287.

Johansen, C. A., van den Hurk, A. F., Ritchie, S. A., Zborowski, P., Nisbet, D. J., Paru, R., Bockarie, M. J., Macdonald, J., Drew, A. C., Khromykh, T. I., Mackenzie, J. S. 2000. Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Western Province of Papua New Guinea, 1997-1998. Am J Trop Med Hyg. 62: 631-638.

Johnsen, D. O., Edelman, R., Grossman, R. A., Muangman, D., Pomsdhit, J., Gould, D. J. 1974. Study of Japanese encephalitis virus in Chiangmia Valley, Thailand. V. Animal infections. Am J Epidemiol. 100: 57-68.

Johansen, C.A, Hall, R.A, Van Den Hurk, A.F, Ritchie, S.A, Mackenzie, J.S.2002. Detection and Stability of Japanese encephalitis virus RNA and virus viability in dead infected mosquitoes under different storage conditions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67(6): 656-661.

Joo, H.S., Chu, R.M. 1999. Japanese B encephalitis. In: Straw B.W., D'Allaire S., Mengeling, W.L., Taylor D.J., eds. Diseases of Swine.173-185.

Kabilan, L., Rajendran, R., Arunachalam, N., Ramesh, S., Srinivasan, S., Samuel, P. P., Dash, A. P. 2004. Japanese encephalitis in India: an overview. Indian J Pediatr.

71: 609-615.

Kaur, R., Vrati, S. 2003. Development of a recombinant vaccine against Japanese encephalitis. J Neurovirol. 9: 421-431.

Lam, K., Tsang, O. T., Yung, R. W., Lau, K. K. 2005. Japanese encephalitis in Hong Kong. Hong Kong Med J. 11: 182-188.

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., 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.

Leake, C. J., Johnson, R. T. 1987. The pathogenesis of Japanese encephalitis virus in Culex tritaeniorhynchus mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 81: 681-685.

Lindenbach, B. D., Rice, C. M. 2001. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, D. M.,eds. Fields Virology. 991-1042.

Lindenbach, B. D., Rice, C. M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. Adv Virus Res. 59: 23-61.

Lowry, P. W., Truong, D. H., Hinh, L. D., Ladinsky, J. L., Karabatsos, N., Cropp, C. B., Martin, D., Gubler, D. J. 1998. Japanese encephalitis among hospitalized pediatric and adult patients with acute encephalitis syndrome in Hanoi, Vietnam 1995. Am J Trop Med Hyg. 58: 324-329.

Ma, S. P., Yoshida, Y., Makino, Y., Tadano, M., Ono, T., Ogawa, M. 2003. Short report: a major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan. Am J Trop Med Hyg. 69: 151-154.

Mackenzie, J. S., Chua, K. B., Daniels, P. W., Eaton, B. T., Field, H. E., Hall, R. A., Halpin, K., Johansen, C. A., Kirkland, P. D., Lam, S. K., McMinn, P., Nisbet, D. J., Paru, R., Pyke, A. T., Ritchie, S. A., Siba, P., Smith, D. W., Smith, G. A., van den Hurk, A. F., Wang, L. F., Williams, D. T. 2001. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. Emerg Infect Dis. 7: 497-504.

Mackenzie, J. S., Johansen, C. A., Ritchie, S. A., van den Hurk, A. F., Hall, R. A. 2002. Japanese encephalitis as an emerging virus: the emergence and spread of Japanese encephalitis virus in Australasia. Curr Top Microbiol Immunol. 267: 49-73.

Mackenzie, J. S., Chua, K. B., Daniels, P. W., Eaton, B. T., Field, H. E., Hall, R. A., Halpin, K., Johansen, C. A., Kirkland, P. D., Lam, S. K., McMinn, P., Nisbet, D. J., Paru, R., Pyke, A. T., Ritchie, S. A., Siba, P., Smith, D. W., Smith, G. A., van den Hurk, A. F., Wang, L. F., Williams, D. T.2001. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. Emerg Infect Dis. 7(3 Suppl): 497-504.

Maeda, O., Takenokuma, K., Karoji, Y., Kuroda, A., Sasaki, O., Karaki, T., Ishii, T. 1978. Epidemiological studies on Japanese encephalitis in Kyoto City area, Japan. IV. Natural infection in sentinel pigs. Jpn J Med Sci Biol. 31: 317-324.

Mangada, M. N., Takegami, T. 1999. Molecular characterization of the Japanese encephalitis virus representative immunotype strain JaGAr 01. Virus Res. 59: 101-112.

McMinn, P. C. 1997. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. J Gen Virol. 78 (Pt 11): 2711-2722.

Miyake, M., 1964. The Pathology of Japanese Encephalitis. a Review. Bull World Health Organ. 30: 153-160.

Monath, T.P. 1988. Japanese encephalitis--a plague of the Orient. N Engl J Med. 319: 641-643.

Muangman, D., Edelman, R., Sullivan, M. J., Gould, D. J. 1972. Experimental transmission of Japanese encephalitis virus by Culex fuscocephala. Am J Trop Med Hyg. 21: 482-486.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol. 3: 13-22.

Nam, J. H., Chung, Y. J., Ban, S. J., Kim, E. J., Park, Y. K., Cho, H. W. 1996. Envelope gene sequence variation among Japanese encephalitis viruses isolated in Korea. Acta Virol. 40: 303-309.

Nga, P. T., del Carmen Parquet, M., Cuong, V. D., Ma, S. P., Hasebe, F., Inoue, S., Makino, Y., Takagi, M., Nam, V. S., Morita, K. 2004. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. J Gen Virol. 85: 1625-1631.

Ni, H., Barrett, A. D. 1995. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the structural protein genes of Japanese encephalitis viruses from different geographical locations. J Gen Virol. 76 (Pt 2): 401-407.

Oda, K., Igarashi, A., Kheong, C. T., Hong, C. C., Vijayamalar, B., Sinniah, M., Hassan, S. S., Tanaka, H., 1996, Cross-sectional serosurvey for Japanese encephalitis specific antibody from animal sera in Malaysia 1993. Southeast Asian J Trop Med Public Health 27: 463-470.

Ogata, M., Nagao, Y., Jitsunari, F., Kitamura, N., Okazaki, T. 1970. Infection of herons and domestic fowls with Japanese encephalitis virus with specific reference to maternal antibody of hen (epidemiological study on Japanese encephalitis 26). Acta Med Okayama. 24: 175-184.

OIE. Available from http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00092.htm

Okuda, K., Ito, K., Miyake, K., Morita, M., Ogonuki, M. 1975. Purification of Japanese encephalitis virus vaccine by zonal centrifugation. J Clin Microbiol. 1: 96-101.

Okuno, T., Mitchell, C. J., Chen, P. S., Wang, J. S., Lin, S. Y. 1973. Seasonal infection of Culex mosquitos and swine with Japanese encephalitis virus. Bull World Health Organ. 49: 347-352.

Pandey, B. D., Karabatsos, N., Cropp, B., Tagaki, M., Tsuda, Y., Ichinose, A., Igarashi, A. 1999. Identification of a flavivirus isolated from mosquitos in Chiang Mai Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 30: 161-165.

Peiris, J. S., Amerasinghe, F. P., Arunagiri, C. K., Perera, L. P., Karunaratne, S. H., Ratnayake, C. B., Kulatilaka, T. A., Abeysinghe, M. R. 1993. Japanese encephalitis in Sri Lanka: comparison of vector and virus ecology in different agro-climatic areas. Trans R Soc Trop Med Hyg. 87: 541-548.

Pond, W. L., Russ, S. B., Lancaster, W. E., Audy, J. R., Smadel, J. E. 1954. Japanese encephalitis in Malaya. II. Distribution of neutralizing antibodies in man and animals. Am J Hyg. 59: 17-25.

Pyke, A. T., Williams, D. T., Nisbet, D. J., van den Hurk, A. F., Taylor, C. T., Johansen, C. A., Macdonald, J., Hall, R. A., Simmons, R. J., Mason, R. J., Lee, J. M., Ritchie, S. A., Smith, G. A., Mackenzie, J.S. 2001, The appearance of a second genotype

of Japanese encephalitis virus in the Australasian region. Am J Trop Med Hyg. 65: 747-753.

Ratho, R. K., Sethi, S., Prasad, S. R. 1999. Prevalence of Japanese encephalitis and West Nile viral infections in pig population in and around Chandigarh. J Commun Dis. 31: 113-116.

Rattanarithikul, R., Panthusiri, P. 1994, Illustrated keys to the medically important mosquitos of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 25 (Suppl 1): 1-66.

Reuben, R., Thenmozhi, V., Samuel, P. P., Gajanana, A., Mani, T. R. 1992. Mosquito blood feeding patterns as a factor in the epidemiology of Japanese encephalitis in southern India. Am J Trop Med Hyg. 46: 654-663.

Ritchie, S. A., Phillips, D., Broom, A., Mackenzie, J., Poidinger, M., van den Hurk, A. 1997. Isolation of Japanese encephalitis virus from Culex annulirostris in Australia. Am J Trop Med Hyg. 56: 80-84.

Rodrigues, F. M., Guttikar, S. N., Pinto, B. D. 1981. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis and West Nile viruses among wild birds in the Krishna-Godavari Delta, Andhra Pradesh, India. Trans R Soc Trop Med Hyg. 75: 258-262.

Rosario Dominguez, D., Suarez Moran, C. M., Rodriguez Roche, R., Soler Nodarse, M., Guzman Tirado, M. G. 1996. The rapid identification of dengue virus serotypes by the polymerase chain reaction. Rev Cubana Med Trop. 48: 155-160.

Rosen, L. 1986. The natural history of Japanese encephalitis virus. Annu Rev Microbiol. 40: 395-414.

Rosen, L., Lien, J. C., Lu, L. C. 1989a. A longitudinal study of the prevalence of Japanese encephalitis virus in adult and larval Culex tritaeniorhynchus mosquitoes in northern Taiwan. Am J Trop Med Hyg. 40: 557-560.

Rosen, L., Lien, J. C., Shroyer, D. A., Baker, R. H., Lu, L. C. 1989b. Experimental vertical transmission of Japanese encephalitis virus by Culex tritaeniorhynchus and other mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 40: 548-556.

Rosen, L., Shroyer, D. A., Lien, J. C. 1980. Transovarial transmission of Japanese

encephalitis virus by Culex tritaeniorhynchus mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 29: 711-712.

Rosenberg, M. Z., Scanlon, J. E., Cedeno, R., Buescher, E. L. 1953. Experimental transmission of Japanese B encephalitis virus from bird to bird by mosquitoes (preliminary report). Med Bull US. 1: 113-115.

Samuel, P. P., Hiriyan, S. J., Gajanana, A. 2000. Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes and its epidemiological implications. ICMR bull. 30(4): 37.

Scherer, W. F., Buescher, E. L. 1959. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. I. Introduction. Am J Trop Med Hyg. 8: 644-650.

Scherer, W. F., Buescher, E. L., Flemings, M. B., Noguchi, A., Scanlon, J. 1959a. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. III. Mosquito factors. Zootropism and vertical flight of Culex tritaeniorhynchus with observations on variations in collections from animal-baited traps in different habitats. Am J Trop Med Hyg. 8: 665-677.

Scherer, W. F., Buescher, E. L., Mc, C. H. 1959b. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. V. Avian factors. Am J Trop Med Hyg. 8: 689-697.

Shimizu, T., Kawakami, Y., Fukuhara, S., Matumoto, M. 1954. Experimental stillbirth in pregnant swine infected with Japanese encephalitis virus. Jpn J Exp Med. 24: 363-375.

Simasathien, P., Rohitayodhin, S., Nisalak, A., Singharaj, P., Halstead, S. B., Russell, P. K. 1972. Recovery of Japanese encephalitis virus from wild caught mosquitoes in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 3: 52-54.

Solomon, T. 2003. Recent advances in Japanese encephalitis. J Neurovirol. 9: 274-283.

Solomon, T. 2004. Flavivirus encephalitis. N Engl J Med. 351: 370-378.

Solomon, T., Dung, N. M., Kneen, R., Gainsborough, M., Vaughn, D. W., Khanh, V. T. 2000. Japanese encephalitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 68: 405-415.

Solomon, T., Ni, H., Beasley, D. W., Ekkelenkamp, M., Cardosa, M. J., Barrett, A. D. 2003. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia. J Virol. 77: 3091-3098.

Soman, R. S., Rodrigues, F. M., Guttikar, S. N., Guru, P. Y. 1977. Experimental viraemia

and transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes in ardeid birds. Indian J Med Res. 66: 709-718.

Srey, V. H., Sadones, H., Ong, S., Mam, M., Yim, C., Sor, S., Grosjean, P., Reynes, J. M., Grosjean, P., Reynes, J. M. 2002. Etiology of encephalitis syndrome among hospitalized children and adults in Takeo, Cambodia, 1999-2000. Am J Trop Med Hyg. 66: 200-207.

Sumiyoshi, H., Mori, C., Fuke, I., Morita, K., Kuhara, S., Kondou, J., Kikuchi, Y., Nagamatu, H., Igarashi, A. 1987. Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. Virology. 161: 497-510.

Swe, T., Thein, S., Myint, M. S. 1979. Pilot sero-epidemiological survey on Japanese encephalitis in north-western Burma. Biken J. 22: 125-129.

Takahashi, M. 1976. The effects of environmental and physiological conditions of Culex tritaeniorhynchus on the pattern of transmission of Japanese encephalitis virus. J Med Entomol. 13: 275-284.

Tanaka, M. 1993. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods. 41: 311-322.

Thenmozhi, V., Rajendran, R., Ayanar, K., Manavalan, R., Tyagi, B. K. 2006. Long-term study of Japanese encephalitis virus infection in Anopheles subpictus in Cuddalore district, Tamil Nadu, South India. Trop Med Int Health. 11: 288-293.

Thisyakorn, U., Nimmannitya, S. 1985. Japanese encephalitis in Thai children, Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 16: 93-97.

Thongcharoen, P. 1985. Japanese encephalitis in Thailand. J Med Assoc Thai. 68: 534-545.

Thongcharoen, P. 1989. Japanese encephalitis virus encephalitis: an overview. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 20: 559-573.

Ting, S. H., Tan, H. C., Wong, W. K., Ng, M. L., Chan, S. H., Ooi, E. E. 2004. Seroepidemiology of neutralizing antibodies to Japanese encephalitis virus in Singapore: continued transmission despite abolishment of pig farming? Acta Trop. 92: 187-191.

Tiroumougane, S.V, Raghava, P., Srinivasan, S.2006. Japanese viral encephalitis. BMJ.

78: 205-215.

Tsai, T. F. 2000. New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination: minutes of a WHO/CVI meeting, Bangkok, Thailand, 13-15 October 1998. Vaccine. 18 (Suppl 2): 1-25.

Van Den Hurk, A. F., Montgomery, B. L., Northill, J. A., Smith, I. L., Zborowski, P., Ritchie, S. A., Mackenzie, J. S., Smith, G. A. 2006. Short report: the first isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected from mainland Australia. Am J Trop Med Hyg. 75: 21-25.

van den Hurk, A. F., Nisbet, D. J., Johansen, C. A., Foley, P. N., Ritchie, S. A., Mackenzie, J. S. 2001. Japanese encephalitis on Badu Island, Australia: the first isolation of Japanese encephalitis virus from Culex gelidus in the Australasian region and the role of mosquito host-feeding patterns in virus transmission cycles. Trans R Soc Trop Med Hyg. 95: 595-600.

Van Peenen, P. F., Joseph, S. W., Atmosoedjono, S., Irsiana, R., Sulianti Saroso, J., Saaroni, O. 1974. Group B arbovirus antibodies in sentinel pigs near Jakarta, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 5: 1-3.

Vaughn, D. W., Hoke, C. H., Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. Epidemiol Rev. 14: 197-221.

Vythilingam, I., Oda, K., Chew, T. K., Mahadevan, S., Vijayamalar, B., Morita, K., Tsuchie, H., Igarashi, A. 1995. Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected in Sabak Bernam, Selangor, Malaysia in 1992. J Am Mosq Control Assoc. 11: 94-98.

Vythilingam, I., Oda, K., Mahadevan, S., Abdullah, G., Thim, C. S., Hong, C. C., Vijayamalar, B., Sinniah, M., Igarashi, A. 1997. Abundance, parity, and Japanese encephalitis virus infection of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in Sepang District, Malaysia. J Med Entomol. 34: 257-262.

Vythilingam, I., Oda, K., Tsuchie, H., Mahadevan, S., Vijayamalar, B. 1994. Isolation of Japanese encephalitis virus from Culex sitiens mosquitoes in Selangor, Malaysia. J Am Mosq Control Assoc. 10: 228-229.

Weng, M. H., Lien, J. C., Wang, Y. M., Lin, C. C., Lin, H. C., Chin, C. 1999. Isolation of

Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected in Northern Taiwan between 1995 and 1996. J Microbiol Immunol Infect. 32: 9-13.

Weng, M. H., Shaio, M. F., Yao, C. W. 2000. Failure of dengue-2 virus antibody to interfere with the isolation of dengue-2 virus from Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 37: 641-644.

Williams, D. T., Wang, L. F., Daniels, P. W., Mackenzie, J. S. 2000. Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. J Gen Virol. 81: 2471-2480.

Yamada, T., Rojanasuphot, S., Takagi, M., Wungkobkiat, S., Hirota, T. 1971. Studies on an epidemic of Japanese encephalitis in the northern region of Thailand in 1969 and 1970. Biken J. 14: 267-296.

Yamanaka, T., Tsujimura, K., Kondo, T., Yasuda, W., Okada, A., Noda, K., Okumura, T., Matsumura, T. 2006. Isolation and genetic analysis of Japanese encephalitis virus from a diseased horse in Japan. J Vet Med Sci. 68: 293-295.

Yang, D. K., Kim, B. H., Kweon, C. H., Kwon, J. H., Lim, S. I., Han, H. R. 2004a. Biophysical characterization of Japanese encephalitis virus (KV1899) isolated from pigs in Korea. J Vet Sci. 5: 125-130.

Yang, D. K., Kim, B. H., Kweon, C. H., Kwon, J. H., Lim, S. I., Han, H. R. 2004b. Molecular characterization of full-length genome of Japanese encephalitis virus (KV1899) isolated from pigs in Korea. J Vet Sci. 5: 197-205.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม Phosphate Buffer saline (PBS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH3PO4	0.20	กรัม
Na2HPO4	1.15	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 10x Tris-borate EDTA buffer (TBE)

Tris base	10.8	กรัม
Boric acid	5.5	กรัม
Na3EDTA	9.3	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 1x TBE

น้ำ 10x TBE 100 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 2% Agarose gel

ชั่ง Agarose gel 2 กรัม ละลายใน 1x TBE ให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.2% versene solution

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH2PO4	0.2	กรัม
Na2HPO4	1.15	กรัม
EDTA	0.2	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม trypsin versene เพื่อย่อยเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cells

2.5% trypsin	5	มิลลิลิตร
0.2% versene	45	มิลลิลิตร

การเตรียม Elsever's solution

Dextrose	2.05	กรัม
Sodium citrate	0.8	กรัม
Citric acid	0.055	กรัม
NaCl	0.42	กรัม

เติม sterile water จนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียม Dextrose gelatin veronal

Veronal	0.58	กรัม
Gelatin	0.6	กรัม
Na veronal	0.38	กรัม
Anhydrose CaCl2	0.02	กรัม
Mg sulfate 7H2O	0.12	กรัม
NaCl	8.5	กรัม
Dextrose	10	กรัม

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม Borate saline pH 9.0

1.5 mNaCl	80	มิลลิลิตร (87.75 กรัม/ ลิตร)
0.5m N3BO3	100	มิลลิลิตร (31.0 กรัม/ ลิตร)
1.0mNaOH	24	มิลลิลิตร (40 กรัม/ ลิตร)

เติม sterile water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้เป็น 9.0 ด้วย 1.0m NaOH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

Buble plastic rack, Scienceware, USA

Refrigerated Universal Centrifuge, Hermle Labortechnik, Germany

Mini-Centrifuge, Quick spin, LABNET, USA

Vortex mixer, Genie-2™, Sciencetific Industries, USA

Freezer-20oC, Sanyo, Japan

Freezer-70oC, Forma Scientific, USA

Power supplies, C.B.S. Scientific, USA

Microcentrifuge tube 1.5 ml, Axygen, USA

Microcentrifuge tube 0.5 ml, Elkay, USA

Microcentrifuge tube 0.2 ml, Axygen, USA

Pipette tips 0.5-10 ul, Axygen, USA

Filter pipettes 200 ul, Axygen, USA

Filter pipettes 200-1000 ul, Axygen, USA

Thermal cycler 9600/Perkin-Elmer, Cetus, USA

Timer, Citizen, Japan

Dyna Cjill Portable Cooler, LABNET, USA

Refrigerator, Mitsubishi Electric, Japan

Water bath, Bosstech, England

UV-visible recording spectrophotometer, UV-160A, Shimadzu, Japan

Sterio-photometer

Flask 25 mm2

96-wells microplate

Scraping

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	แหล่ง
EDTA	Sigma, Germany
Tris base	Amersham, USA
Agarose	Gibco BRL, USA
Boric acid	Merck, Germany
Ethidium bromide	Sigma, Germany
Oligonucleotide primer	Prologo, USA
AccessQuick™RT-PCR system	Promega, USA
100 bp DNA ladder	Fermentus, USA
Trisol LS reagent	Invitrogen, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สวรรยา ศรีภัทรานุสรณ์ เกิดวันที่ 2 สิงหาคม พ.ศ. 2521 ที่โรงพยาบาลมเหสักข์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อ พ.ศ. 2548

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย