จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

บทบาทของยุงพาหะนำโรคและสัตว์เลี้ยงในระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

โดย

สนธยา เตียวศิริทรัพย์

มีนาคม 2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

บทบาทของยุงพาหะนำโรคและสัตว์เลี้ยงในระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

โดย

สนธยา เตียวศิริทรัพย์

มีนาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สัญญาเลขที่ R_015_2553) ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ Ross/186 และขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ Thailand 2010

บทบาทของยุงพาหะนำโรคและสัตว์เลี้ยงในระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สนธยา เตียวศิริทรัพย์

มิถุนายน 2554

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยในคนโดยที่มียุงเป็นแมลงพาหะนำโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของสัตว์เลี้ยงในระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา โดยทำการศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยใช้ลูกไก่และหนูไมซ์เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ ทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ให้กับสัตว์ทดลองในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสจำนวน 10^4, 10^6 และ 10^8 CID_{50} ให้กับหนูไมซ์อายุ 4 และ 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดจากหนูทุกวันเป็นเวลา 7 วัน และทำการฉีดเชื้อไวรัสจำนวน 10^8 CID_{50} ให้กับหนูไมซ์อายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดจากหนูไมซ์ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน สำหรับในลูกไก่นั้น ทำการฉีดเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ จำนวน 10^3, 10^4, 10^6 และ 10^8 CID_{50} ให้กับลูกไก่อายุ 5 วัน หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดจากลูกไก่ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน การตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างซีรั่มทั้งหมดจะใช้วิธี reverse transcription polymcrase chain reaction (RT-PCR) จากการศึกษานี้พบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์อายุ 2 และ 4 สัปดาห์ ที่ได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์จำนวน 10^8 CID_{50} โดยพบว่าหนูไมซ์อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์จะพบเชื้อในกระแสเลือดเพียง 3 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อเท่านั้น ในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Ross/186 จะพบการเชื้อในกระแสเลือดอยู่ที่ร้อยละ 60, 100 และ 60 ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ และในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Thailand 2010 จะพบเชื้อในกระแสเลือดอยู่ที่ร้อยละ 80, 80 และ 60 ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ สำหรับหนูไมซ์อายุ 2 สัปดาห์ นั้นเมื่อได้รับเชื้อสายพันธุ์ Ross/186 จะพบเชื้อในกระแสเลือดอยู่ที่ร้อยละ 100, 100, 50, 83 และ 100 ในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังจากที่ได้รับเชื้อ ตามลำดับ และในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Thailand 2010 จะพบเชื้อในกระแสเลือดอยู่ที่ร้อยละ 90, 100 และ 67 ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ

Roles of mosquito vectors and domestic animals in the epidemiology of Chikungunya virus

Assistant Professor Dr. Sonthaya Tiawsirisup

June 2011

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is a pathogen that causes an illness in humans and mosquito is an insect vector for this virus. Aim of this study is to study roles of domestic animals in the epidemiology of this virus. Chikungunya virus infection in avian and mammal were studied by using baby chickens and mice as model animals. Two strains of CHIKV were used in this study; Thailand 2010 and Ross/186 strain (reference strain). Different amount of CHIKV was inoculated to the tested animals by needle injection. 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} of CHIKV was inoculated to four- and six-week-old mice. Blood was collected and tested for virus for seven days. 10^8 CID_{50} of CHIKV was inoculated to two-week-old mice. Blood was collected and tested for virus for five days. For the baby chickens, 10^2, 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} of CHIKV was inoculated to five-day-old baby chickens. Blood was collected and tested for virus for seven days. Serum samples were tested for CHIKV by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). CHIKV were only found in two- and four-week-old mice that were inoculated with 10^8 CID_{50} of CHIKV. Virus was found for three days in four-week-old mice after inoculation. The percentage of Ross/186 strain of CHIKV in four-week-old mice were 60, 100 and 60 % on day 1, 2 and 3 post injection (PI), respectively. The percentage of Thailand 2010 strain of CHIKV in four-week-old mice were 80, 80 and 60 % on day 1, 2 and 3 PI, respectively. The percentage of Ross/186 strain of CHIKV in two-week-old mice were 100, 100, 50, 83 and 100 % on day 1, 2, 3, 4 and 5 PI, respectively. The percentage of Thailand 2010 strain of CHIKV in two-week-old mice were 90, 100 and 67 % on day 1, 2 and 3 PI, respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการวิจัย	7
1. การศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์	7
2. การศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่	9
3. การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีทางอณูชีววิทยา	10
ผลการวิจัย	12
1. การศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์	12
2.การศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่	13
การอภิปรายผล	15
ข้อสรุป	17
ข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	19
ส่วนผนวก	22
บทความวิจัย	22

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของตู้ isolator ที่อยู่ภายในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย ระดับ 3 8

รูปที่ 2 แสดงสัตว์ทดลองที่เลี้ยงอยู่ภายในตู้ isolator 8

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อายุของหนูไมซ์ สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อให้กับหนู และจำนวนหนูไมซ์ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ 9

ตารางที่ 2 อายุของลูกไก่ สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อให้กับลูกไก่ และจำนวนลูกไก่ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ 10

ตารางที่ 3 ระดับของอุณหภูมิและระยะเวลาในแต่ละช่วงของปฏิกิริยา reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 11

ตารางที่ 4 การตรวจหาเชื้อไวรัสซิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์อายุที่แตกต่างกัน หลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง 13

ตารางที่ 5 การตรวจหาเชื้อไวรัสซิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่อายุ 5 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 14

บทนำ

โรคติดเชื้อที่พบในคนและสัตว์นั้นสามารถเกิดจากเชื้อต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย โปรโตซัว หนอนพยาธิ และไวรัส โรคติดเชื้อบางชนิดเป็นโรคอุบัติใหม่ (emerging infectious disease) ซึ่งคือโรคที่ไม่เคยมีการระบาดมาก่อนในพื้นที่นั้น โรคติดเชื้อบางชนิดเป็นโรคอุบัติซ้ำ (re-emerging infectious disease) ซึ่งคือโรคที่เคยมีการระบาดมาก่อนในอดีต แต่ได้หายไปจากพื้นที่นั้นนานแล้ว แต่ได้กลับมาระบาดใหม่ในปัจจุบันและในบางครั้งพบว่าโรคมีความรุนแรงมากขึ้น การติดต่อของโรคต่างๆ เหล่านี้อาจเกิดจากการติดต่อโดยตรงระหว่างผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย หรืออาจติดต่อโดยอาศัยแมลงพาหะนำโรค (arthropod borne diseases) แมลงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญมาก คือ ยุง ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปรวมทั้งประเทศไทย เชื้อที่มียุงเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ หนอนพยาธิฟิลาเรีย และไวรัสชนิดต่างๆ

Arbovirus เป็นเชื้อไวรัสที่จำเป็นต้องอาศัยแมลงดูดเลือดเป็นพาหะในการนำเชื้อ โดยไวรัสที่มีความสำคัญในไทย ได้แก่ เชื้อไวรัสสมองอักเสบ (Japanese encephalitis virus) เชื้อไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus 1, 2, 3 และ 4) และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus, CHIKV) นอกจากนี้แล้วยังมีไวรัสอีกชนิดหนึ่งซึ่งจัดว่าเป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่ในหลายๆ พื้นที่ในโลก หรือในบางพื้นที่ก็จัดว่าเป็นโรคอุบัติซ้ำที่มีความรุนแรงมากขึ้นกว่าในอดีต คือ ไวรัสเวสท์ไนล์ (West Nile virus) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการระบาดของไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทย

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเป็นไวรัสที่มียุงเป็นพาหะนำโรค (group A arboviruses) ลักษณะของสายพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA genome virus) และมีลักษณะทางโครงสร้างเป็น spherical และ icosahedral โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 - 60 นาโนเมตร และเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) ไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในสกุล (genus) *Alphavirus* และวงศ์ (family) Togaviridae ซึ่งมีความใกล้เคียงของแอนติเจน (antigenic relationship) กับไวรัสอื่น ได้แก่ ไวรัส Mayaro, O'nyong-nyong และ Semliki

การศึกษาที่ผ่านมานั้นพบว่ายุงที่เป็นพาหะที่สำคัญของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ได้แก่ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ยุงทำหน้าที่เป็น biological vector ที่เอื้อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเชื้อ (amplifying vector) เชื้อไวรัสนี้ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่าโรคชิคุนกุนยาหรือโรคไข้ปวดข้อยุงลาย โรคนี้พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2496 ที่ประเทศแทนซาเนีย แอฟริกาตะวันออก และหลังจากนั้นได้พบการระบาดในแอฟริกา อินเดีย และหลายประเทศในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย ในประเทศไทยนั้นก็ได้เกิดการระบาด

ของโรคอย่างมากในระหว่างปี พ.ศ. 2551 - 2552 โดยที่เชื้อไวรัสที่ระบาดในประเทศไทยในปัจจุบันนั้นมีลักษณะที่แตกต่างจากไวรัสที่เคยระบาดมาก่อนในอดีต

ลักษณะอาการที่พบในผู้ป่วยนั้นคล้ายกับไข้เลือดออก แต่ความรุนแรงของโรคน้อยกว่ามาก เนื่องจากไม่มีการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด จึงไม่พบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากจนถึงมีอาการช็อคโดยทั่วไประยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 1 - 12 วัน แต่ที่พบได้บ่อยคือ ประมาณ 2 - 3 วัน โดยในระยะที่มีไข้สูงประมาณวันที่ 2 – 4 เป็นระยะที่มีไวรัสอยู่ในกระแสเลือดมากจึงเป็นช่วงเวลาที่จะเกิดการแพร่เชื้อได้มาก อาการที่พบได้ในผู้ป่วย ได้แก่ อาการไข้สูงอย่างฉับพลัน มีผื่นแดงขึ้นตามร่างกายและอาจมีอาการคันร่วมด้วย ตาแดง ส่วนใหญ่แล้วในเด็กจะมีอาการไม่รุนแรงเท่าในผู้ใหญ่ ในผู้ใหญ่อาการที่เด่นชัดคืออาการปวดข้อ ซึ่งอาจพบข้ออักเสบ ส่วนใหญ่จะเป็นที่ข้อเล็กๆ เช่น ข้อมือ ข้อเท้า อาการปวดข้อจะพบได้หลายๆ ข้อเปลี่ยนตำแหน่งไปเรื่อยๆ (migratory polyarthritis) อาการจะรุนแรงมากจนบางครั้งขยับข้อไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามอาการจะหายภายใน 1 - 12 สัปดาห์ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดข้อเกิดขึ้นได้อีกภายใน 2 - 3 สัปดาห์ต่อมา และบางรายอาการปวดข้อจะอยู่ได้นานเป็นเดือนหรือเป็นปี

สำหรับการติดเชื้อในสัตว์ชนิดต่างๆ มีรายงานพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ลิง ค้างคาว สุกร และนก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการติดเชื้อในหนูทดลอง โดยพบว่าก่อให้เกิดความผิดปกติในลักษณะการเดินของหนู น้ำหนักลด และพบว่าระดับของเชื้อในกระแสเลือดของหนูค่อนข้างสูงซึ่งสามารถที่จะเอื้อให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อไปสู่ยุงที่มาดูดเลือดจากหนูได้ รวมทั้งสามารถพบเชื้อในกล้ามเนื้อของหนู และความผิดปกติของกระดูกอ่อนในข้อต่างๆ ดังนั้นสัตว์ต่างๆ เหล่านี้จึงอาจมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของเชื้อในธรรมชาติได้

เนื่องจากภาวะโรคร้อนที่เกิดขึ้นในปัจจุบันนี้ ทำให้เกิดการกระจายตัวและปริมาณของแมลงพาหะนำโรคต่างๆ โดยเฉพาะยุง เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม บางพื้นที่มีฝนตกชุกตลอดทั้งปี เกิดแหล่งน้ำท่วมขัง ซึ่งกลายเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่ดีสำหรับยุงชนิดต่างๆ เมื่อยุงเพิ่มมากขึ้น การกระจายตัวของเชื้อต่างๆ ก็เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โดยยุงสามารถติดเชื้อผ่านทางการดูดเลือดคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ เชื้อจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในยุงที่เซลล์ของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut epithelial cell) และต่อมน้ำลาย (salivary gland) คนและสัตว์จะติดเชื้อจากน้ำลายของยุงในขณะที่ยุงดูดเลือด

ความสามารถและความจำเพาะในการดูดเลือดของยุงแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน ยุงบางชนิดดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น ยุงบางชนิดดูดเลือดสัตว์ปีกเท่านั้น ในขณะที่ยุงบางชนิดดูดเลือดจากสัตว์ได้หลายชนิดรวมทั้งคนด้วย ยุงในกลุ่มหลังนี้เป็นยุงที่มีความสำคัญในการเป็นพาหะนำโรคระหว่างคนและสัตว์ชนิดต่างๆ โรคที่มียุงเป็นพาหะนำโรคนี้เป็นโรคที่สามารถติดต่อ

ได้ง่ายและเกิดการระบาดได้อย่างรวดเร็ว ประกอบกับการที่ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่ร้อนชื้นซึ่งเหมาะแก่การแพร่พันธุ์ของยุง ดังนั้นเชื้อไวรัสที่มียุงเป็นพาหะจึงอาจสามารถแพร่กระจายได้โดยง่าย นอกจากนี้แล้วยุงจากแต่ละพื้นที่นั้นอาจมีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคแตกต่างกัน

คณะผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาถึงการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทยในปัจจุบันในสัตว์ ซึ่งอาจมีความแตกต่างจากอดีตที่ผ่านมา เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรคในประเทศไทยต่อไป

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus, CHIKV) จัดว่าเป็นเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่ (emerging infectious disease) ซึ่งเป็นโรคที่ไม่เคยมีการระบาดมาก่อนในพื้นที่นั้น หรือโรคอุบัติซ้ำ (re-emerging infectious disease) ซึ่งเป็นโรคที่เคยมีการระบาดมาก่อนในอดีตแต่ได้หายไปจากพื้นที่นั้นนานแล้ว แต่ได้กลับมาระบาดใหม่ในปัจจุบันและในบางครั้งพบว่าโรคมีความรุนแรงมากขึ้น เชื้อไวรัสชิคุนกุนยานี้จัดว่าเป็นโรคอุบัติซ้ำสำหรับประเทศไทยซึ่งพบการระบาดอย่างมากในภาคใต้ของประเทศไทย

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเป็นไวรัสที่มีสายพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA genome virus) จัดอยู่ในสกุล *Alphavirus* (group A arboviruses) และแฟมิลี่ Togaviridae ขนาดเล็กประมาณ 50 - 60 นาโนเมตร เชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Mayaro virus, O'nyong-nyong virus และ Semliki virus เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเป็นเชื้อที่มียุงเป็นแมลงพาหะนำโรค โดยก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า โรคชิคุนกุนยาหรือโรคไข้ปวดข้อยุงลาย โรคนี้พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2496 ที่ประเทศแทนซาเนีย แอฟริกาตะวันออก และหลังจากนั้นได้พบการระบาดในแอฟริกา อินเดีย และหลายๆ ประเทศในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย (Mackenzie et al. 2001, Thavara et al. 2009) ไวรัสชนิดนี้แบ่งออกได้เป็น 4 lineage โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของ E1 envelope glycoprotein ซึ่งได้แก่ West African lineage, East Central and South African lineage, Asian lineage และ Indian Ocean lineage ซึ่ง Indian Ocean lineage เป็น lineage ที่ได้มีวิวัฒนาการมาจาก East Central and South African lineage ซึ่งพบการระบาดครั้งแรกในประเทศเคนยา ในปี พ.ศ. 2547 และหลังจากนั้นได้พบการกระจายของเชื้อไปยัง Indian Ocean Islands ประเทศอินเดีย และประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Parola et al. 2006) อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีรายงานถึงความแตกต่างของความรุนแรงของเชื้อแต่ละ lineage

การระบาดของเชื้อในธรรมชาติประกอบไปด้วย คนติดเชื้อ แมลงพาหะนำโรค และอาจมีสัตว์รังโรคเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย (Jupp and McIntosh 1990; Turell et al. 1992; Jupp and Kemp 1996) ยุงลายทำหน้าที่เป็นแมลงพาหะนำโรค (biological vector) ที่เอื้อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเชื้อ (amplifying vector) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายุงที่เป็นพาหะที่สำคัญของเชื้อ ได้แก่ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการติดเชื้อในยุงชนิดอื่นๆ ด้วย (Reiskind et al. 2008; Dubrulle et al. 2009; van den Hurk et al. 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าการถ่ายทอดเชื้อผ่านจากยุงลายติดเชื้อไปยังไข่ได้ (Thavara et al. 2009)

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยามีความก่อโรคค่อนข้างมากแต่มีความรุนแรงค่อนข้างต่ำ มักไม่ก่อให้เกิดการตายของผู้ป่วย อาการที่สามารถพบได้ในผู้ป่วย ได้แก่ การมีผื่นแดง ไข้ และมีการปวดตามข้อต่อต่างๆ แม้ว่าจะไม่พบการตายในผู้ป่วยด้วยโรคดังกล่าวนี้แต่พบว่าผู้ป่วยต้องเผชิญกับความเจ็บป่วย ในบางรายไม่สามารถทำงานหรือปฏิบัติกิจใดๆ ได้ตามปกติ ส่งผลถึงฐานะทางเศรษฐกิจของครอบครัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อหัวหน้าครอบครัวไม่สามารถทำงานได้ หรือนักเรียนที่จำเป็นต้องขาดเรียนเนื่องจากไม่สามารถไปเรียนได้เนื่องจากความเจ็บป่วย ในผู้ป่วยจะพบว่ามีระดับของไวรัสในกระแสเลือดประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากที่ได้รับเชื้อ โดยที่มีระดับของเชื้อประมาณ 10^7 – 10^9 copies ต่อซีรั่มจำนวน 1 มิลลิลิตร (Parola et al. 2006) ในช่วงเวลานี้การวินิจฉัยโรคจะสามารถทำได้ด้วยการตรวจหาเชื้อโดยใช้วิธีทางไวรัสวิทยาคือ virus isolation และพิสูจน์เชื้อโดยอาศัยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Taqman RT-PCR และ Real-Time RT-PCR เป็นต้น (Laurent et al. 2007; Theamboonlers et al. 2009) ซึ่งแต่ละวิธีก็จะมีความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกัน แต่ถ้าหากผ่านช่วงเวลาดังกล่าวมาแล้วการวินิจฉัยโรคจำเป็นต้องอาศัยอาการของผู้ป่วย (clinical sign) และวิธีทางซีรั่มวิทยา (serology) เช่น การรตรวจหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ ได้แก่ IgM และ IgG profile (Grivard et al. 2007) อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยอาจเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากในบางพื้นที่อาจพบการระบาดของเชื้ออื่นร่วมด้วย เช่น ไข้เลือดออก ในบางครั้งอาจพบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและเชื้อไวรัสไข้เลือดออกร่วมกัน ซึ่งเจ้าหน้าที่ที่ให้บริการทางสาธารณสุขจำเป็นต้องให้ความรอบคอบในการวินิจฉัยโรค (Thaung et al. 1975; Chahar et al. 2009; Leroy et al. 2009; Theamboonlers et al. 2009)

สำหรับในประเทศไทยนั้นได้เกิดการระบาดของเชื้ออย่างมากในระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2552 โดยพบผู้ป่วยจำนวนมากในเขตภาคใต้ของประเทศ จากการศึกษาของ Theamboonlers และคณะ (2009) พบว่าเชื้อที่ระบาดในระหว่างปี พ.ศ. 2551 นี้มีความแตกต่างกับเชื้อที่เคยระบาดมาก่อนเมื่อปี พ.ศ. 2531 และในระหว่างปี พ.ศ. 2538 – 2539 แต่เชื้อนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อที่ระบาดในประเทศสิงคโปร์ ในปี พ.ศ. 2551 จากรายงานของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่มีรายงานในระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2553 คือ 2,433, 49,069 (7.41/100,000) และ 1,533 (2.41/100,000) ราย ตามลำดับ

สำหรับการติดเชื้อในสัตว์นั้นมีรายงานพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ ลิง ค้างคาว สุกร และนก (Jaffar-Bandjee et al. 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการติดเชื้อในหนูทดลอง โดยพบว่าก่อให้เกิดความผิดปกติในลักษณะการเดินของหนู น้ำหนักลด และระดับของเชื้อในกระแสเลือดของหนูค่อนข้างสูง ระดับของเชื้อที่สูงนี้สามารถที่จะเอื้อให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อ

ไปสู่ยุงที่มาดูดเลือดจากหนูได้ รวมทั้งสามารถพบเชื้อในกล้ามเนื้อของหนู และความผิดปกติของกระดูกอ่อนในข้อต่อต่างๆ ตลอดจนพบว่าอายุของหนูนั้นมีผลต่อการติดเชื้อไวรัสที่แตกต่างกันอีกด้วย (Couderc et al. 2008; Ziegler et al. 2008; Couderc and Lecuit 2009) สัตว์ชนิดต่างๆ ทั้งสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเหล่านี้อาจมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อในธรรมชาติ ทำให้เกิดการติดเชื้อมาสู่ยุงที่ไปดูดเลือดสัตว์เหล่านั้นและอาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้

การศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงความสามารถในการติดเชื้อในสัตว์ชนิดต่างๆ หลังจากที่ได้รับเชื้อในระดับที่แตกต่างกันนั้นมีความสำคัญมาก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องดำเนินการศึกษาถึงข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นการบ่งชี้ถึงบทบาทของสัตว์ชนิดต่างๆ ในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน เพื่อเป็นการบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ของสัตว์ชนิดต่างๆ ในธรรมชาติต่อนิเวศวิทยาของเชื้อในธรรมชาติในประเทศไทย นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐาน รวมทั้งพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรคในประเทศไทยต่อไป

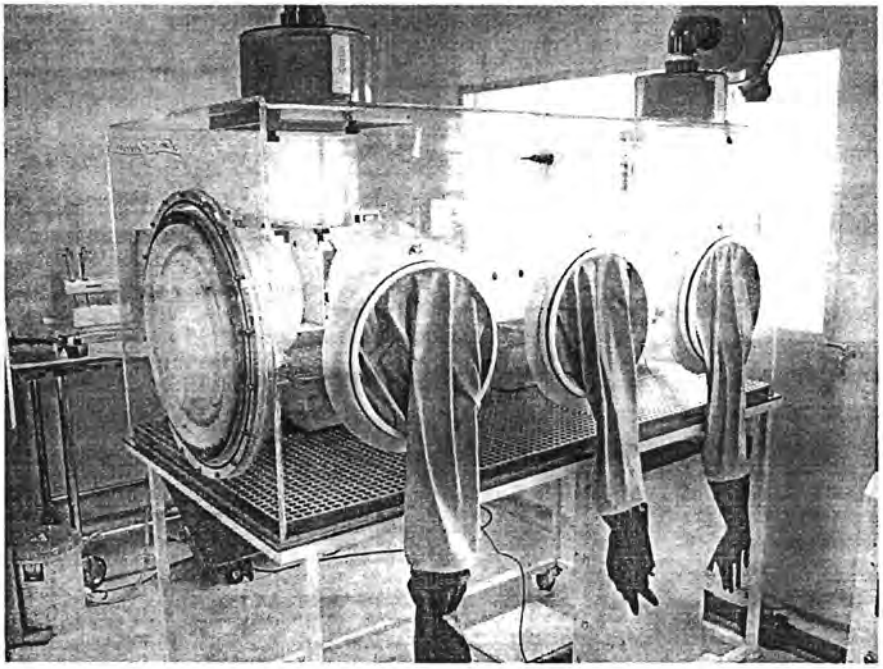
วิธีการวิจัย

1. การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์

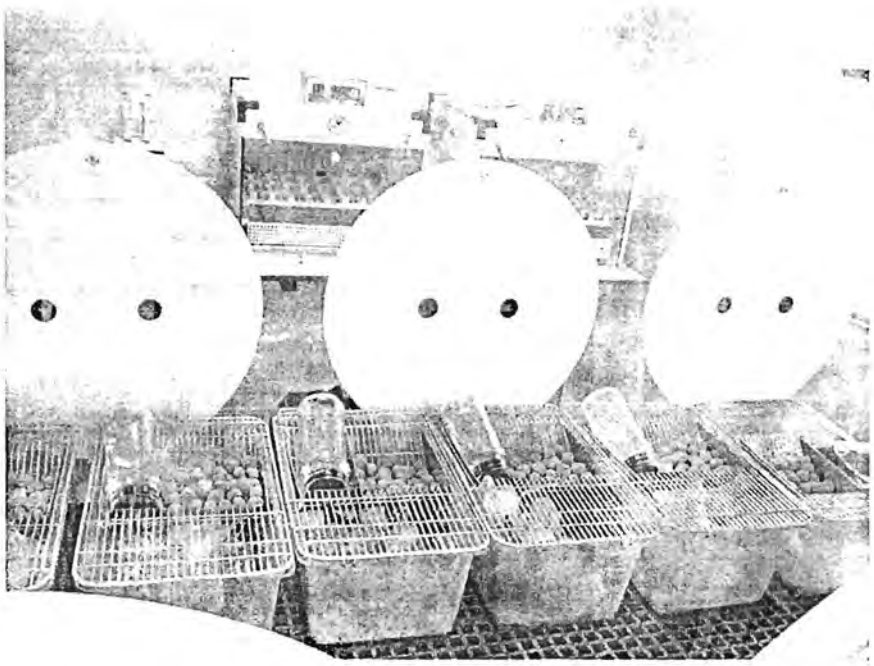
ศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์ (ICR mice) อายุ 2 – 6 สัปดาห์ โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ให้กับหนู โดยการฉีดเชื้อที่มีจำนวน 10^4 - 10^8 CID_{50} เข้าช่องท้องของหนู ภายหลังการฉีดเชื้อแล้วได้ทำการเลี้ยงหนูทดลองไว้ในตู้ isolator ซึ่งอยู่ภายในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย ระดับ 3 (Biosafety level 3 laboratory) ของศูนย์วิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2

ทำการเจาะเลือดจากหนูทุกวัน ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากที่หนูได้รับเชื้อ และตรวจหาเชื้อในซีรั่มด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

การเจาะเลือดจากหนูจะทำหลังจากที่ได้วางยาสลบหนูไปแล้วโดยใช้ Teletamine hypochloride และ Zolazepam hypochloride (Zoletil ®, Virbac, France) โดยเจาะเลือดจากหัวใจและทำการการุณฆาตหลังจากที่ได้เจาะเลือดเรียบร้อยแล้ว การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee. Animal Use Protocol No. 1031038) ตัวอย่างเลือดที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างซีรั่มที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของตู้ isolator ที่อยู่ภายในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย ระดับ 3



รูปที่ 2 แสดงสัตว์ทดลองที่เลี้ยงอยู่ภายในตู้ isolator

ตารางที่ 1 อายุของหนูไมซ์ สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อให้กับหนู และจำนวนหนูไมซ์ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ

อายุของหนูไมซ์	สายพันธุ์ของเชื้อ	ปริมาณของเชื้อ (CID_{50})	จำนวนหนูไมซ์ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
6 สัปดาห์	Ross/186	10^4	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Thailand	10^4	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Ross/186	10^6	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Thailand	10^6	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Ross/186	10^8	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Thailand	10^8	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Ross/186	10^4	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Thailand	10^4	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Ross/186	10^6	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Thailand	10^6	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Ross/186	10^8	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Thailand	10^8	5	5	5	5	5	5	5
2 สัปดาห์	Ross/186	10^5	5	6	6	6	1	-	-
2 สัปดาห์	Thailand	10^5	10	3	6	6	4	-	-

2. การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่

ศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่อายุ 5 วัน โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ให้กับลูกไก่อายุ 5 วัน โดยการฉีดเชื้อที่มีจำนวน 10^2 - 10^8 CID_{50} เข้ากล้ามเนื้อบริเวณอก ภายหลังการฉีดเชื้อแล้วได้ทำการเลี้ยงลูกไก่ทดลองไว้ในตู้ isolator ซึ่งอยู่ภายในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย ระดับ 3 ของศูนย์วิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการเจาะเลือดจากลูกไก่ทุกวัน ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากที่ได้รับเชื้อ ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

การเจาะเลือดจากลูกไก่ทำโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณคอ (Jugular vein) และทำการการุณฆาตหลังจากที่ได้เจาะเลือดเรียบร้อยแล้ว การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee, Animal Use Protocol No. 1031038) ตัวอย่างเลือดที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างซีรั่มที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป

ตารางที่ 2 อายุของลูกไก่ สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อให้กับลูกไก่และจำนวนลูกไก่ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ

อายุของลูกไก่	สายพันธุ์ของเชื้อ	ปริมาณของเชื้อ (CID_{50})	จำนวนลูกไก่ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
5 วัน	Ross/186	10^{2}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Thailand	10^{2}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Ross/186	10^{4}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Thailand	10^{4}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Ross/186	10^{6}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Thailand	10^{6}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Ross/186	10^{8}	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	Thailand	10^{8}	5	5	5	5	5	5	5

3. การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

นำตัวอย่างซีรั่มจากสัตว์ดลองที่ได้มาสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป (Viral nucleic acid extraction kit II, Geneaid, Taiwan) โดยใช้ตัวอย่างซีรั่มจำนวน 200 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างของสารพันธุกรรมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในตัวอย่างที่สกัดได้ทำโดยใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Primer ที่ใช้คือ DVRChk-R 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' และ DVRChk-F 5'ACCGGCGTCTACCCATTCATGT3' (CV et al. 2007) โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรมจำนวน (template RNA) 1.5 ไมโครลิตร 2X reaction mix (dNTP 0.4 mM, $MgSO_4$ 3.2 mM) (Invitrogen, USA) จำนวน 12.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นจำนวน 8 ไมโครลิตร SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, USA) จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward และ reverse primer อย่างละจำนวน 1 ไมโครลิตร (10 μM) อุณหภูมิของปฏิกิริยา RT-PCR ได้พัฒนาจากวิธีของ CV และคณะ (2007) และ Theamboonlers คณะ (2009) การศึกษานี้ประกอบไปด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้นำมาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 90 โวลท์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 330 base pairs

ตารางที่ 3 ระดับของอุณหภูมิและระยะเวลาในแต่ละช่วงของปฏิกิริยา reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ (cycle)
cDNA synthesis	48	30 นาที	1
Denaturation	94	5 นาที	1
PCR amplification	94	45 วินาที	
	56	45 วินาที	35
	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

ผลการวิจัย

1. การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์

การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์ (ICR mice) อายุ 2 - 6 สัปดาห์ หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ซึ่งมีปริมาณของไวรัสจำนวน 10^4 - 10^8 CID_{50} และทำการตรวจหาเชื้อในซีรั่มด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในวันต่างๆ หลังจากที่ได้รับเชื้อ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในหนูไมซ์อายุ 6 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในปริมาณตั้งแต่ 10^4 – 10^8 CID_{50} และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อเป็นเวลา 7 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อ ปรากฏว่าไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์กลุ่มนี้ สำหรับในหนูไมซ์อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในปริมาณตั้งแต่ 10^4 – 10^8 CID_{50} และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อเป็นเวลา 7 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อ ปรากฏว่าไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อ 10^4 – 10^6 CID_{50} แต่สามารถพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อ 10^8 CID_{50} โดยพบเชื้อเพียง 3 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อเท่านั้น ในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Ross/186 จะพบเชื้ออยู่ที่ร้อยละ 60, 100 และ 60 ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ และในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Thailand 2010 จะพบเชื้ออยู่ที่ร้อยละ 80, 80 และ 60 ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ

สำหรับในหนูไมซ์อายุ 2 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในปริมาณ 10^8 CID_{50} และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Ross/186 จะพบเชื้ออยู่ที่ร้อยละ 100, 100, 50, 83 และ 100 ในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ และในหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อสายพันธุ์ Thailand 2010 จะพบเชื้ออยู่ที่ร้อยละ 90, 100 และ 67 ในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์อายุที่แตกต่างกัน หลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง

อายุของหนูไมซ์	สายพันธุ์ของเชื้อ	ปริมาณของเชื้อ (CID_{50})	วันหลังจากที่ได้รับเชื้อ						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
6 สัปดาห์	Ross/186	10^4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Thailand	10^4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Ross/186	10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Thailand	10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Ross/186	10^8	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Thailand	10^8	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Ross/186	10^4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Thailand	10^4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Ross/186	10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Thailand	10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Ross/186	10^8	3/5	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Thailand	10^8	4/5	4/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2 สัปดาห์	Ross/186	10^8	5/5	6/6	3/6	5/6	1 1	-	-
2 สัปดาห์	Thailand	10^8	9/10	3/3	4/6	0/6	0/4	-	-

* ตัวเลขในตาราง แสดงจำนวนหนูที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดต่อจำนวนหนูที่ทำการศึกษาในแต่ละวัน

2. การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่

การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่ อายุ 5 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ซึ่งมีปริมาณของไวรัสที่แตกต่างกันระหว่าง 10^2 – 10^8 CID_{50} และทำการตรวจหาเชื้อในซีรั่มด้วยวิธี

reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในวันต่างๆ หลังจากที่ได้รับเชื้อ ซึ่งไม่พบเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์นี้ในกระแสเลือดของลูกไก่ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่อายุ 5 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

สายพันธุ์ของเชื้อ	ปริมาณของเชื้อ (CID_{50})	วันหลังจากที่ได้รับเชื้อ						
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
Ross/186	10^2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ross/186	10^4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ross/186	10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ross/186	10^8	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Thailand	10^2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Thailand	10^4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Thailand	10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Thailand	10^8	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* ตัวเลขในตาราง แสดงจำนวนลูกไก่ที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดต่อจำนวนลูกไก่ที่ทำการศึกษาในแต่ละวัน

การอภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์ (*Mus musculus*) สายพันธุ์ ICR ซึ่งเป็น outbred mice ที่มีอายุ 2 - 6 สัปดาห์ และในลูกไก่เนื้อ (*Gallus gallus*) สายพันธุ์ Cobb 500 ที่มีอายุ 5 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ซึ่งมีปริมาณของไวรัสที่แตกต่างกัน และทำการตรวจหาเชื้อในซีรั่มของสัตว์ทดลองด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในวันต่างๆ หลังจากที่ได้รับเชื้อ

จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของลูกไก่และในหนูไมซ์ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ แม้จะได้รับเชื้อในปริมาณมากเท่าใดก็ตาม แต่สำหรับในหนูไมซ์ที่มีอายุน้อยลงนั้นจะสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกระแสเลือดได้ โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์ที่มีอายุ 2 - 4 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามหนูไมซ์ต้องได้รับเชื้อในปริมาณที่สูงมากคือ ที่ระดับ 10^5 CID_{50} จากการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่าการตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อหนูไมซ์ได้รับเชื้ออย่างน้อย 10^5 CID_{50} สำหรับในหนูไมซ์ที่มีอายุ 2 สัปดาห์นั้น จากการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเพียงการให้ไวรัสในระดับเดียวคือ 10^8 CID_{50} ซึ่งก็พบเชื้อในกระแสเลือดได้เช่นกัน แต่ไม่ได้ทำการศึกษาว่าถ้าให้เชื้อในปริมาณที่น้อยกว่านี้จะสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์อายุ 2 สัปดาห์ ได้หรือไม่

จากการศึกษานี้พบว่าช่วงเวลาที่สามารถพบเชื้อได้ในกระแสเลือดของหนูที่มีการติดเชื้อโดยส่วนใหญ่จะอยู่ที่ 3 วัน ยกเว้นในหนูไมซ์อายุ 2 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ Ross'186 จะสามารถพบเชื้อในกระแสเลือดได้นานถึง 5 วัน ระยะเวลาที่พบการกระจายตัวของเชื้อในกระแสเลือดของหนูทดลอง 3 – 5 วัน เช่นนี้ เป็นช่วงเวลาที่ยาวนานพอที่สามารถเอื้อให้เป็นแหล่งของเชื้อสำหรับยุงซึ่งเป็นแมลงพาหะนำโรคในธรรมชาติได้ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อไวรัสสองสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์หนึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดมาในอดีต และอีกสายพันธุ์นั้นเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดในช่วงปัจจุบัน เพื่อเป็นการบ่งชี้ถึงความก่อโรคที่จะเกิดขึ้นว่าจะมีความแตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งจะพบว่าช่วงระยะเวลาของการตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์ค่อนข้างจะใกล้เคียงกัน

การศึกษาของ Theamboonlers และคณะ (2009) รายงานว่าเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทยในปี 2551 นี้มีความแตกต่างกับเชื้อที่เคยระบาดมาก่อนเมื่อปี พ.ศ. 2531 และในระหว่างปี พ.ศ. 2538 – 2539 แต่เชื้อนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อที่ระบาดในประเทศสิงคโปร์ ในปี พ.ศ. 2551

และจากการศึกษาอื่นยังบ่งชี้ว่าเชื้อที่มีการระบาดอยู่ในปัจจุบันน่าจะเป็นเชื้อที่จัดอยู่ใน Indean Ocean lineage ที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบน E1 envelope glycoprotein ทำให้มีลำดับเบสที่แตกต่างเชื้อสายพันธุ์ในอดีต หรือที่เรียกว่า E1-A226V ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะทำให้เชื้อเกิดการสูญเสียการเจริญแบบที่จำเป็นต้องอาศัยโคเลสเตอรอล (cholesterol dependence) ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ replication และ infectivity ของเชื้อ รวมทั้งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงถึงยุงพาหะนำโรคซึ่งในอดีตนั้นยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคคือ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) แต่ในปัจจุบันยุงที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นพาหะนำโรคคือ ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงความก่อโรคในคนหรือสัตว์ที่เปลี่ยนแปลงไป จากการศึกษาครั้งนี้อาจจะพอบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาทั้งสองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ที่เคยมีการระบาดมาในอดีตและสายพันธุ์ที่มีการระบาดในปัจจุบันนั้นต่างก็ก่อให้เกิดการติดเชื้อในหนูไมซ์ได้ โดยที่ช่วงเวลาที่สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามหนูไม่ได้แสดงความผิดปกติใดๆ ให้เห็น

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเป็นไวรัสที่มี tissue tropism คือ กล้ามเนื้อลาย ข้อต่อ และผิวหนัง และปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อในสัตว์ทดลอง เช่น หนูไมซ์ ได้แก่ อายุของโฮสต์ และการทำงานของ type-I IFN signaling (Couderc et al. 2008; Ziegler et al. 2008) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ก็ให้ผลสอดคล้องปัจจัยข้างต้น คือ เรื่องของอายุของหนูไมซ์ และแม้ว่าหนูไมซ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็น outbred mice แต่ก็สามารถพบการติดเชื้อในหนูสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ได้ สำหรับในลูกไก่ซึ่งเป็นสัตว์ปีกนั้นก็ไม่พบว่ามีการติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่บ่งชี้ว่าสามารถตรวจพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดและไม่ได้มีรายงานถึงการติดเชื้อหรือการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก (Weinbren et al. 1958; Osterrieth and Blanes-Ridaura. 1960; Halstead and Udomsakdi 1966)

ข้อสรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของสัตว์สองกลุ่มคือ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก โดยใช้หนูไมซ์และลูกไก่เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ และได้ทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) จากการศึกษานี้จะตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของลูกไก่หลังจากที่ได้ให้เชื้อกับลูกไก่ในปริมาณที่แตกต่างกันระหว่าง 10^{2} – 10^{8} CID_{50} รวมทั้งไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์อายุ 6 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในปริมาณตั้งแต่ 10^{4} – 10^{8} CID_{50} และไม่พบการเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในปริมาณตั้งแต่ 10^{4} – 10^{6} CID_{50} แต่สามารถพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูไมซ์ที่มีอายุระหว่าง 2 - 4 สัปดาห์ เมื่อได้รับเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในปริมาณ 10^{8} CID_{50} และสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของหนูอยู่เป็นเวลา 3 และ 5 วัน สำหรับหนูไมซ์อายุ 4 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ จากการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อหนูไมซ์ที่มีอายุน้อยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่ผ่านมา การที่จะบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ของสัตว์ชนิดต่างๆ ในการติดเชื้อและบทบาทในการเป็นแหล่งรังโรคในธรรมชาตินั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องสามารถพิสูจน์เชื้อในกระแสเลือดของสัตว์ต่างๆ เหล่านั้น ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ในพื้นที่หรือจะเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการก็ตาม

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพิ่มเติมที่น่าสนใจคือ การศึกษาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของสัตว์ชนิดอื่นๆ รวมทั้งทำการศึกษาต่อไปว่าระดับของไวรัสที่ตรวจพบในกระแสเลือดของหนูไมซ์เช่นนี้จะสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในยุงชนิดต่างๆ ได้หรือไม่ และจะสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในยุงได้มากน้อยเพียงใด

เอกสารอ้างอิง

Chahar, H.S., Bharaj, P., Dar, L., Guleria, R., Kabra, S.K. and Broor, S. 2009. Co-infections with Chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. Emerg Infect Dis 15: 1077-1080.

Couderc, T., Chretien, F., Schilte, C., Disson, O., Brigitte, M., Guivel-Benhassine, F., Touret, Y., Barau, G., Cayet, N., Schuffenecker, I., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F., Michault, A., Albert, M.L. and Lecuit, M. 2008. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. PLoS Pathog 4: e29.

Couderc, T. and Lecuit, M. 2009. Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models. Microbes Infect 11: 1197-1205.

CV, M.N.K., Anthony Johnson, A.M. and DV, R.S.G., 2007, Molecular characterization of chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. Indian J Med Res 126: 534-540.

Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailler, S., Vazeille, M. and Failloux, A.B. 2009. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. PLoS One 4: e5895.

Grivard, P., Le Roux, K., Laurent, P., Fianu, A., Perrau, J., Gigan, J., Hoarau, G., Grondin, N., Staikowsky, F., Favier, F. and Michault, A. 2007. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. Pathol Biol (Paris) 55: 490-494.

Halstead, S.B. and Udomsakdi, S. 1966. Vertebrate hosts of chikungunya virus. Bull World Health Organ 35: 89.

Jaffar-Bandjee, M. C., Das, Y., Hoarau, J.J., Krejbich Trotot, P., Denizot, M., Ribera, A., Roques, P. and Gasque, P. 2009. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. Microbes Infect 11: 1206-1218.

Jupp, P.G. and Kemp, A. 1996. What is the potential for future outbreaks of Chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? S Afr Med J 86: 35-37.

Jupp, P.G. and McIntosh, B.M. 1990. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of Chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. J Am Mosq Control Assoc 6: 415-420.

Laurent, P., Le Roux, K., Grivard, P., Bertil, G., Naze, F., Picard, M., Staikowsky, F., Barau, G., Schuffenecker, I. and Michault, A. 2007. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify Chikungunya virus. Clin Chem 53: 1408-1414.

Leroy, E.M., Nkoghe, D., Ollomo, B., Nze-Nkogue, C., Becquart, P., Grard, G., Pourrut, X., Charrel, R., Moureau, G., Ndjoyi-Mbiguino, A. and De-Lamballerie, X. 2009. Concurrent Chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. Emerg Infect Dis 15: 591-593.

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. and Williams, D.T. 2001. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. Emerg Infect Dis 7: 497-504.

Osterrieth, P. and Blanes-Ridaura, G. 1960. Research on the Chikungunya virus in the Belgian Congo. I. Isolation of the virus in upper Uele. Ann Soc Belg Med Trop 40: 199-203.

Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovery, C., Vaillant, V., Minodier, P., Brouqui, P., Flahault, A., Raoult, D. and Charrel, R.N. 2006. Novel Chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. Emerg Infect Dis 12: 1493-1499.

Reiskind, M. H., Pesko, K., Westbrook, C.J. and Mores, C.N. 2008. Susceptibility of Florida mosquitoes to infection with Chikungunya virus. Am J Trop Med Hyg 78: 422-425.

Thaung, U., Ming, C.K., Swe, T. and Thein, S. 1975. Epidemiological features of dengue and Chikungunya infections in Burma. Southeast Asian J Trop Med Public Health 6: 276-283.

Thavara, U., Tawatsin, A., Pengsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., Molito, C., Chompoosri, J., Thammapalo, S., Sawanpanyalert, P. and Siriyasatien, P. 2009. Outbreak of Chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health 40: 951-962.

Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Praianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N. and Poovorawan, Y. 2009. Clinical and molecular characterization of chikungunya virus in South Thailand. Jpn J Infect Dis 62: 303-305.

Turell, M.J., Beaman, J.R. and Tammariello, R.F. 1992. Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Chikungunya virus. J Med Entomol 29: 49-53.

van den Hurk, A. F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A.T., Smith, G.A. and Mackenzie, J.S. 2010. Vector Competence of Australian Mosquitoes for Chikungunya Virus. Vector Borne Zoonotic Dis 10(5): 489-495.

Weinbren, M.P., Haddow, A.J. and Williams, M.C. 1958. The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. I. Isolation from mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg 52: 253-257.

Ziegler, S.A., Lu, L., da Rosa, A.P., Xiao, S.Y. and Tesh, R.B., 2008. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. Am J Trop Med Hyg 79: 133-139.

ส่วนผนวก

A manuscript will be submitted to "Parasitology Research"

Experimental infection of mice and baby chickens with Thailand strain of Chikungunya virus

Sonthaya Tiawsirisup[1,*], Pichanan Rattanakampol[2], Warritar Navavichit[2], Hemmarat Ratpiyapaporn[2]

[1]Veterinary Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[2]Senior Veterinary Student Year 2011, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author

Mailing address: Veterinary Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Rd., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

Tel: +662-218-9664 Fax: +662-218-9666

E-mail: sonthaya.t@chula.ac.th, thaya18@hotmail.com

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is a pathogen that causes an illness in humans and mosquito is an insect vector for this virus. Aim of this study is to study roles of domestic animals in the epidemiology of this virus. CHIKV infection in avian and mammal were studied by using baby chickens and mice as model animals. Two strains of CHIKV were used in this study; Thailand 2010 and Ross/186 strain (reference strain). Different amount of CHIKV was inoculated to the tested animals by needle injection. 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} of CHIKV was inoculated to four- and six-week-old mice. Blood was collected and tested for virus for seven days. 10^8 CID_{50} of CHIKV was inoculated to two-week-old mice. Blood was collected and tested for virus for five days. For the baby chickens, 10^2, 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} of CHIKV was inoculated to five-day-old baby chickens. Blood was collected and tested for virus for seven days. Serum samples were tested for CHIKV by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). CHIKV were detected in two- and four-week-old mice that were inoculated with 10^8 CID_{50} of CHIKV. Virus was found for three days in four-week-old mice post inoculation (PI). The percentage of Ross/186 strain of CHIKV in four-week-old mice were 60, 100 and 60 % on day 1, 2 and 3 PI, respectively. The percentage of Thailand 2010 strain of CHIKV in four-week-old mice were 80, 80 and 60 % on day 1, 2 and 3 PI, respectively. The percentage of Ross/186 strain of CHIKV in two-week-old mice were 100, 100, 50, 83 and 100 % on day 1, 2, 3, 4 and 5 PI, respectively. The percentage of Thailand 2010 strain of CHIKV in two-week-old mice were 90, 100 and 67 % on day 1, 2 and 3 PI, respectively. No virus was detected in any 6-week-old mice and baby chickens.

Keywords: Chikungunya virus, mice, baby chicken, infection, Thailand

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging or re-emerging infectious mosquito borne virus that can be found in several countries in Africa and Asia. For the last five years, the outbreak of this virus happened in several countries including Thailand (Mackenzie et al. 2001; Thavara et al. 2009). CHIKV belongs to *Alphavirus* genus of the Togaviridae family. It is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus. CHIKV was first discovered in Tanzania, east Africa in 1952 and was identified in Thailand in 1958. According to E1 envelope glycoprotein, CHIKV can be divided into four lineages; West Africa, East Central and South Africa, Asian, and Indian Ocean lineage (IOL). IOL is the lineage that has evolved from East Central and South Africa lineage. The first outbreak of IOL happened in Kenya in 2004 and it has spread to Indian Ocean Islands, India and other countries in Southeast Asia (Parola et al. 2006).

Transmission cycle of this virus has to be considered in two cycles; urban and sylvatic life cycle. Infected humans and mosquitoes play an important role in the transmission in an urban cycle but infected animals and mosquitoes are responsible for the transmission in a sylvatic cycle. However, reservoir animals might involve in the transmission of this virus in an urban cycle (Jupp and McIntosh 1990; Turell et al. 1992; Jupp and Kemp 1996). Immune response for CHIKV also has been shown in several kinds of animals, for example, monkey, bat, swine, and bird (Jaffar-Bandjee et al. 2009). The major amplifying vectors for this virus are *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, and transovarial transmission of CHIKV also addressed in these mosquitoes (Thavara et al. 2009). However, other mosquito species might also serve

as amplifying vectors for this virus (Reiskind et al. 2008; Dubrulle et al. 2009; van den Hurk et al. 2010).

This study was conducted to investigate the possibility of small mammal and avian to serve as an amplifying host for CHIKV. Thailand strain of CHIKV infection in mice and baby chickens were experimentally study by comparing with reference strain of CHIKV. The initial data from our study would be useful for the future research on the relationship among CHIKV, mosquitoes and animals in the transmission cycle of CHIKV in nature.

Materials and methods

Virus and cell culture

Ross/186 (reference strain) and Thailand 2010 strain of Chikungunya virus (CHIKV) were used in this study. Ross/186 strain of CHIKV was kindly provided by National Instituted of Health of Thailand (Material Transfer Agreement 18-53-06) and Thailand 2010 strain of CHIKV was kindly provided by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand.

Cell and medium

CHIKV was propagated and assayed in Vero-76 cells. Cells were propagated in cell growth medium (GM) containing MEM media (Gibco, Invitrogen) with 10% fetal bovine serum (FBS), glutamate (Gibco, Invitrogen), and 20 mg of gentamicin sulfate per 100 ml of media. Maintenance medium (MM) containing MEM media (Gibco, Invitrogen) with 1% FBS, glutamate (Gibco, Invitrogen), and 20 mg of gentamicin sulfate per 100 ml of media.

Virus assay

Vero-76 cells were propagated in GM and CHIKV was propagated in confluent Vero-76 cells with MM in 25-cm^2 cell culture flask. Ten-fold dilution of CHIKV was assayed for an amount of virus in Vero-76 cells with MM in 25-cm^2 cell culture flask.

Cell cultures were observed for cytopathic effect for up to 4 days and cell culture medium was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction. Virus titers were expressed as CID_{50}/ml.

Viral nucleic acid extraction

Viral nucleic acid was extracted from an individual serum sample or cell culture medium by using viral nucleic acid extraction kit II (Geneaid, Taiwan) according to the manufacturer's recommendation, and each of them was kept at -80 °C until tested.

Reverse transcription polymerase chain reaction

Each extracted viral nucleic acid sample was tested for CHIKV by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) according to CV et al. (2007) and Theamboonlers et al. (2009) with slight modification. The primers were DVRChk-R 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' and DVRChk-F 5'ACCGGCGTCTACCCATTCATGT3' (CV et al. 2007). RT-PCRs were performed in 25 µl-reaction. One and a half µl of RNA was mixed with 12.5 µl of 2X-master mix (0.4 mM dNTP, 3.2 mM $MgSO_4$) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µl of forward and reverse primer (10 µM), 1 µl of SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 8 µl of ultrapure water (Invitrogen, Carlsbad, CA). After the reverse transcription step at 48°C for 30 min and the initial PCR activation step at 94°C for 5 min, the amplification was carried out for 35 cycles with the following temperature cycling parameters: 94°C for 45 sec of denaturation, 56°C for 45 sec of

annealing, and 72°C for 1 min of extension. The final amplification cycle included an addition of 7 min extension at 72°C. RNA was amplified by using thermocycler (Perkin Elmer Cetus 9600, Perkin Elmer, Waltham, MA). The PCR product was mixed with 6 µl of loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA) and analyzed in 2% agarose gel (UltraPure™, Invitrogen, Carlsbad, CA) with expected 330 base pair band.

Experiment animals

ICR mice and baby chickens were inoculated with Ross/186 and Thailand 2010 strain of CHIKV. This study was approved by the Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee (Animal Use Protocol and Approval No. 1031038). Four- and 6-week-old mice were inoculated with 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} and 2-week-old mice were inoculated with only 10^8 CID_{50} of CHIKV by intraperitoneal injection. Five-day-old baby chickens were inoculated with 10^2, 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} of CHIKV by intramuscularly injection. Mice were anesthetized with 10 mg of tiletamine hypochloride and zolazepam hypochloride (Zoletil®, Virbac, Frace) per kg of mice and blood was collected by heart puncture. For baby chickens, blood was collected from jugular vein. After blood was collected, mice and baby chickens were euthanized.

Results

Chikungunya (CHIKV) infection in mice

Four- and 6-week-old mice were inoculated with 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} and 2-week-old mice were inoculated with only 10^8 CID_{50} of Ross/186 and Thailand 2010 strain of CHIKV by intraperitoneal injection. Serum samples were tested for CHIKV infection by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for 7 days post inoculation (PI). CHIKV were detected in two- and four-week-old mice that were inoculated with 10^8 CID_{50} of CHIKV. Virus was found for three days in four-week-old mice post inoculation (PI). The percentage of Ross/186 strain of CHIKV in four-week-old mice were 60, 100 and 60% on day 1, 2 and 3 PI, respectively. The percentage of Thailand 2010 strain of CHIKV in four-week-old mice were 80, 80 and 60% on day 1, 2 and 3 PI, respectively. The percentage of Ross/186 strain of CHIKV in two-week-old mice were 100, 100, 50, 83 and 100% on day 1, 2, 3, 4 and 5 PI, respectively. The percentage of Thailand 2010 strain of CHIKV in two-week-old mice were 90, 100 and 67% on day 1, 2 and 3 PI, respectively (Table 1).

Chikungunya infection in baby chickens

Five-day-old baby chickens were inoculated with 10^2, 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} of Ross/186 and Thailand 2010 strain of CHIKV by intramuscularly injection. Serum samples were tested for CHIKV infection by RT-PCR for 7 days PI. No CHIKV was detected from all baby chicken serum samples (Table 2).

Discussion

This study was conducted to investigate Thailand 2010 and Ross/186 (reference strain) strain of Chikungunya virus (CHKV) infection in 2-, 4- , and 6-week-old ICR mice (*Mus musculus*) and in 5-day-old baby chickens (*Gallus gallus*). The animals were inoculated with different amount of the virus and the animals were tested for the present of the virus in blood circulation by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) after post inoculation (PI).

In the present study, CHIKV could not be detected from any baby chicken and 6-week-old mice PI. However, CHIKV can be detected from 2- and 4-week-old mice that were inoculated with 10^8 CID_{50}. A group of 4-week-old mice were inoculated with 10^4, 10^6 and 10^8 CID_{50} but the virus was only detected when they were inoculated with 10^8 CID_{50}. A group of 2-week-old mice; however, were inoculated with only 10^8 CID_{50} in this study. No study to indicate that 2-week-old mice can be infected with lower amount of virus or not. More works still need to be done to address this question.

Ross/186 and Thailand 2010 strain of CHKV infection in mice in this study can be found for 3 days PI. Two-week-old mice that were inoculated with Ross/186 strain; however, viremia can be found for 5 days PI. Viremia period of CHIKV in mice about 3-5 days as indicated in this study might enough for these mice to serve as infected blood meal sources for mosquitoes in nature. Two strains of CHIKV infection in animals were studied to compare the infectivity between these two strains. One strain (Ross/186) is the virus strain from the past (reference stain) and another

strain (Thailand 2010) is the present strain of CHIKV that just had an outbreak in Thailand. This study shows the infectivity between these two strains is quite similar. However, viremia in 2-week-old mice that were infected with Ross/186 was 5 days.

The study by Theamboonler et al. (2009) indicated CHIKV that had outbreak in Thailand in 2008 was different from the virus that involved in the outbreak in 1988 and during 1995-1996. However, a property of this virus is the same as the virus that involved in the outbreak in Singapore in 1998. The previous study also showed that CHIKV that recently found in Thailand is in the Indean Ocean lineage with the substitution of an alanine to valine at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V). This substitution causes the virus to lose cholesterol dependence for growth and increases its replication and infectivity. This leads to the adaptation to different mosquito species which make *Aedes albopictus* more potential vectors than *Aedes aegypti* (Tsetsarkin et al. 2007). An ability of RNA viruses to evolve rapidly might increase their host or vector range (Tsetsarkin et al. 2007). In the past, CHIKV isolated from Thailand was in the Asian lineage and the competent vector was *Aedes aegypti*; however, CHIKV that was responsible for the outbreak in Thailand during 2008-2010 was the IOL with E1-A226V and the majority of the vector was *Aedes albopictus* (de Lamballerie et al. 2008; Thavara et al. 2009). The 2008 CHIKV isolated from Thailand was also closely related to a virus that caused the outbreak in India in 2007 and in Singapore in 2008 (Theamboonlers et al. 2009).

The present study shows that both strains of CHIKV can infect ICR mice and viremia period was quite similar. These infected mice; however, did not show any sign and symptom of walking difficulty or joint and muscle pain. Tissue tropisms for

CHIKV are striated muscle, joint, and skin. Factors that involved CHIKV infection in mice are age and type-I interferon signaling (Couderc et al. 2008; Ziegler et al. 2008; Couderc and Lecuit 2009). The finding from this study showed the result is the same as the previous study about the age of mice and the infectivity. ICR mice are outbred mice but these mice still can be infected with CHIKV. CHIKV could not be detected from any baby chickens from this study which previous studies also indicated the same finding that CHIKV can infect different kind of mammals but avian (Halstead and Udomsakdi 1966; Osterrieth and Blanes-Ridaura 1960; Weinbren et al. 1958).

More work need to be done on the viremia level in CHIKV infected ICR mice, CHIKV infection in other animals, and infection in mosquitoes after taking blood meal from the infected animal. All of this knowledge will help the researcher to understand more on the transmission cycle of this virus in nature.

Acknowledgments

The research reported in this article was partially funded by the Ratchadapisek sompoch endorsement fund, Chulalongkorn University, Thailand. This work (HR1160A-55) was also supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission. The authors would like to thank the National Instituted of Health of Thailand for Ross/186 strain of Chikunkunya virus and the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand for Thailand 2010 strain of Chikungunya.

References

Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, Touret Y, Barau G, Cayet N, Schuffenecker I, Despres P, Arenzana-Seisdedos F, Michault A, Albert ML, Lecuit M. (2008) A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. PLoS Pathog 4:e29

Couderc T, and Lecuit M (2009) Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models. Microbes Infect 11:1197-1205

CV, MNK, Anthony Johnson AM, DV RSG (2007) Molecular characterization of Chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. Indian J Med Res 126:534-540

Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, and Failloux AB (2009) Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. PLoS One 4:e5895

Halstead SB, Udomsakdi S (1966) Vertebrate hosts of Chikungunya virus. Bull World Health Organ 35:89

Jaffar-Bandjee MC, Das T, Hoarau JJ, Krejbich Trotot P, Denizot M, Ribera A, Roques P, Gasque P (2009) Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. Microbes Infect 11:1206-1218

Jupp PG, Kemp A (1996) What is the potential for future outbreaks of Chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? S Afr Med J 86:35-37

Jupp PG, McIntosh BM (1990) *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of Chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. J Am Mosq Control Assoc 6:415-420

Mackenzie JS, Chua KB, Daniels PW, Eaton BT, Field HE, Hall RA, Halpin K, Johansen CA, Kirkland PD, Lam SK, McMinn P, Nisbet DJ, Paru R, Pyke AT, Ritchie SA, Siba P, Smith DW, Smith GA, van den Hurk AF, Wang LF, Williams DT (2001) Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. Emerg Infect Dis 7:497-504

Osterrieth P, Blanes-Ridaura G (1960) Research on the Chikungunya virus in the Belgian Congo. I. Isolation of the virus in upper Uele. Ann Soc Belg Med Trop 40:199-203

Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovery C, Vaillant V, Minodier P, Brouqui P, Flahault A, Raoult D, Charrel RN (2006) Novel Chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. Emerg Infect Dis 12:1493-1499

Reiskind MH, Pesko K, Westbrook CJ, Mores CN (2008) Susceptibility of Florida mosquitoes to infection with Chikungunya virus. Am J Trop Med Hyg 78:422-425

Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, Molito C, Chompoosri J, Thammapalo S, Sawanpanyalert P, Siriyasatien P (2009) Outbreak of Chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health 40:951-962

Theamboonlers A, Rianthavorn P, Praianantathavorn K, Wuttirattanakowit N, Poovorawan Y (2009) Clinical and molecular characterization of Chikungunya virus in South Thailand. Jpn J Infect Dis 62:303-305

Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S (2007) A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLoS Pathog. 3(12):e201

Turell MJ, Beaman JR, Tammariello RF (1992) Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Chikungunya virus. J Med Entomol 29:49-53

van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Smith GA, Mackenzie JS (2010) Vector competence of Australian mosquitoes for Chikungunya virus. Vector Borne Zoonotic Dis 10(5):489-495

Weinbren MP, Haddow AJ, Williams MC (1958) The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. I. Isolation from mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg 52:253-257

Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB (2008) An animal model for studying the pathogenesis of Chikungunya virus infection. Am J Trop Med Hyg 79:133-139