

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลไทยพีซีอาร์เพื่อการตรวจหาไวรัสซิกา ไข้เลือดออก และไวรัสเด็งกี



นางสาวปิยธิดา พงษ์ศิริ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR DETECTING CHIKUNGUNYA
VIRUS AND DENGUE VIRUS



Miss Piyathida Pongsiri

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลใต้อาหารเพื่อการตรวจหาไวรัส

ซิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี

โดย

นางสาวปิยธิดา พงษ์ศิริ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แก่นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ھرรษาเวก)

.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.....
(อาจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงภร)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วัชรเนศวร์ ลับเลิศลอบ)

ปิยธิดา พงษ์ศิริ: การพัฒนามัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์เพื่อการตรวจหาไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี. (DEVELOPMENT OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR DETECTING CHIKUNGUNYA VIRUS AND DENGUE VIRUS) อ. ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภูววรรณ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 ร่วม: อาจารย์ ดร.สัณชัย พยุงภร 56 หน้า.

ไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีเป็นไวรัสที่มียุ่งเป็นพาหะนำโรค ซึ่งไวรัสทั้งสองชนิดนี้เป็นไวรัสที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก นำไปสู่การเสียชีวิตได้ โดยมีรายงานว่าในปี 2552 สำหรับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่ระบาดในประเทศไทยมีประมาณ 40,000 ราย และ สำหรับสถิติทั่วโลกของไวรัสเดงกีมีผู้ติดเชื้อประมาณ 50 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 25,000 คน นอกจากนี้ อาการโดยทั่วไปของการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดยังมีอาการใกล้เคียงกันและยังใกล้เคียงกับการติดเชื้อไวรัสตัวอื่นๆ หรืออาการหวัดต่างๆไป นอกจากนี้ไวรัสชิคุนกุนยาสามารถทำให้เกิดอาการเรื้อรังได้ ดังนั้นวิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพและมีความน่าเชื่อถือจึงสำคัญ เพื่อประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังและการรักษาโรคที่ถูกต้อง

การศึกษานี้จึงได้ศึกษา complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยา เพื่อศึกษาทางด้านลักษณะพันธุกรรมเพื่อดูว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ใดที่ระบาดและใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาวิธีการตรวจต่อไป โดยผลการศึกษาพบว่าไวรัสชิคุนกุนยาที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในสายพันธุ์ ECSA ซึ่งต่างจากการระบาดในอดีตที่ระบาดโดยสายพันธุ์ Asian จากนั้นจึงพัฒนาวิธีการตรวจไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีโดยวิธีมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ เพื่อความน่าเชื่อถือ รวดเร็ว และจำเพาะต่อไวรัสทั้งสองชนิดโดยผลการพัฒนาวิธีการนี้พบว่า มีประสิทธิภาพสูง มีความจำเพาะ น่าเชื่อถือ สามารถทำซ้ำได้ และไม่มีปฏิกิริยาข้ามต่อไวรัสทั้งสองชนิด และไวรัสชนิดอื่นๆ เช่นไวรัสตับอักเสบ ชนิด เอ, ซี, อี (Hepatitis A, C and E) หรือไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไขสมองอักเสบ (Japanese encephalitis virus, JEV) โดยเมื่อนำวิธีมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ของทั้งไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี ทดสอบกับตัวอย่างจำนวน 290 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวอย่างทางคลินิกพบว่าวิธีการนี้มีความจำเพาะ 92.59%, ความไว 97.65% และความแม่นยำถึง 95.82% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการพีซีอาร์ปกติ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ลายมือชื่อนิสิต..... *ปิยธิดา พงษ์ศิริ*
 ปีการศึกษา 2553ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... *ยง ภูววรรณ*
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... *ดร.สัณชัย พยุงภร*

5274868230 : MAJOR Medical Science

KEYWORDS : multiplex / real-time PCR / Chikungunya Virus / Dengue virus / complete genome / sequence analysis

PIYATHIDA PONGSIRI: DEVELOPMENT OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR DETECTING CHIKUNGUNYA VIRUS AND DENGUE VIRUS. ADVISOR : PROF.YONG POOVORAWAN, M.D. CO-ADVISOR : SUNCHAI PAYONGPORN PhD., 56 pp.

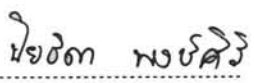
Chikungunya Virus (CHIKV) and Dengue Virus (DENV) are both Arthropod-borne viruses (Arboviruses) which raise public health concern. In Thailand, there was a report of CHIKV infection about 40,000 cases in 2009 and this virus could cause long term symptoms. DENV cause Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever (DF/DHF) with an estimated more than 50 million people per year and 25,000 deaths. Both viruses also share common clinical signs such as the febril of onset and rash. Detecting CHIKV and DENV is crucial role for the doctor and the doctor can give the appropriate treatment to the patients and monitor the patient closely.

Our study has focused on characterizing complete genome of CHIKV and found that the virus spreading in Thailand were categorized into ECSA strain which were different than the strain spreading in the past which were Asian strain. Then we study the development of multiplex real-time PCR for detecting CHIKV and DENV which is rapid, reliable, and specific to both viruses. Our result showed that this assay has high efficiency, sensitivity and specificity. Moreover, when our method was tested against other virus such as Hepatitis A, Hepatitis C, Hepatitis E and Japanese encephalitis virus, it showed no cross-reaction. Total of 290 clinical samples were tested and showed that our method has 92.59%

sp

Field of Study :Medical Science.....

Academic Year : 2010.....

Student's Signature 

Advisor's Signature 

Co-advisor's Signature 

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ ที่ให้โอกาสในการเข้าศึกษาต่อปริญญาโท และ ได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัย ทั้งทางด้านอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆที่เพียงพอ มีคุณภาพ และน่าเชื่อถือ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สัตย์ พงษ์ภร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยกรุณาให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆมากมาย ทั้งทางด้านการปรับปรุงข้อผิดพลาด และคำแนะนำต่างๆในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ญัฐเนศวร์ ลับเลิศลพ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสและให้ตัวอย่างของไวรัส

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน ที่กรุณาให้ตัวอย่างของไวรัสเพื่อทดสอบกับวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา

ขอขอบพระคุณนายแพทย์วิบูลศักดิ์ โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ที่คอยช่วยเหลือเก็บตัวอย่างผู้ป่วยที่น่าสงสัยว่าติดเชื้อไวรัสเด็งกี

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และรุ่นพี่ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือความรู้ คำแนะนำ รวมทั้งการจัดหาอุปกรณ์ทำวิจัย ทำให้การศึกษาวิจัยเป็นไปได้อย่างราบรื่น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือดำเนินเอกสารต่างๆให้เป็นไปด้วยความเรียบร้อย ตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัวเป็นอย่างยิ่งที่คอยสนับสนุน การศึกษาและคอยเป็นกำลังใจในการทำงาน รวมถึงความรักและเมตตาทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจและมุ่งมั่นต่อการศึกษาหาความรู้เป็นอย่างดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายและสัญลักษณ์คำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
- คำถามงานวิจัย.....	2
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
- สมมติฐานของการวิจัย.....	2
- คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
- คำสำคัญ.....	3
- ข้อยกเว้นของการวิจัย.....	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
- ขอบเขตงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
- ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัส.....	5
- การระบาดของไวรัส, พาหะของไวรัส และ การจำแนกสายพันธุ์ต่างๆของไวรัส....	8
- ลักษณะอาการของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสและการรักษา.....	10
- วิธีการตรวจเชื้อไวรัสแบบต่างๆ.....	13
- ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค Real-time PCR.....	14
- การออกแบบ Primer และ probe.....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
- รูปแบบการวิจัย.....	17

	หน้า
- เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	17
- ประชากรศึกษา.....	19
- การคำนวณขนาดประชากรศึกษา.....	19
- วิธีดำเนินงานวิจัย.....	20
- การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจากข้อมูล.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
- ผลการทดลองจากการทำ PCR เพื่อหา complete genome ของไวรัสซิคูนกunya.	29
- ผลการวิเคราะห์ complete genome ของไวรัสซิคูนกunya.....	30
- ผลการออกแบบ primer และ probe.....	33
- สภาวะและความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ทำ real-time PCR.....	36
- การตรวจสอบกับตัวอย่างที่ยืนยันว่าเป็น Positive สำหรับไวรัสซิคูนกunyaหรือ เดงกีและทดสอบกับไวรัสชนิดอื่นๆ.....	44
- การตรวจสอบกับตัวอย่างทางคลินิก.....	45
- การคำนวณทางสถิติ.....	45
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	
- สรุปผลและอภิปรายผลจากการศึกษา Complete genome ของไวรัสซิคูนกunya.	46
- สรุปผลและอภิปรายผลจากการพัฒนาวิธีการ Multiplex real-time PCR.....	47
รายการอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก	
- ภาคผนวก ก	55
- ภาคผนวก ข.....	56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เปรียบเทียบอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสซิกาและไวรัสเดงกี.....	13
2 Primers ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไวรัสซิกา.....	23
3 accession number, สถานที่, ปี ค.ศ. สำหรับไวรัสซิกา.....	25
4 accession number, สถานที่, ปี ค.ศ. สำหรับไวรัสเดงกี.....	26
5 แสดงการเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา.....	28
6 ข้อมูลตัวอย่างที่นำมาทำ complete genome ของไวรัสซิกา.....	29
7 กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับซิกาตัวแรก.....	31
8 primer, probe, ช่วงและตำแหน่งที่เลือกใช้ในการออกแบบ.....	35
9 แสดงความปริมาตรและความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR.....	40
10 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR.....	40
11 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการ real-time PCR และ PCR	45

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงจีโนมทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya Virus) ประกอบด้วยส่วน non-structural region, structural region, 5’NTR และ 3’NTR.....	5
2 รูปถ่าย Electron micrograph of ของCHIKV virions.....	6
3 แสดงจีโนมทั้งหมดของไวรัสเดงกี ประกอบด้วย non structural region, structural region, 5’NTR และ 3’NTR.....	7
4 แสดงส่วนประกอบโครงสร้างของไวรัสเดงกี.....	7
5 วงจรการถ่ายถอดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเทียบระหว่างบริเวณที่เป็นป่า และบริเวณที่เป็นชุมชนเมือง และตัวพาหะที่ต่างกัน.....	9
6 แผนผังการจำแนกระดับของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีตามมาตรฐานของ World Health Organization.....	11
7 ปริมาณของ antibody เมื่อติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2.....	12
8 แสดงการจับกันระหว่าง primer, probe และส่วนที่เราสนใจ.....	15
9 ตัวอย่างการแสดงผลของ real-time PCR ในต่างช่องสัญญาณกัน.....	15
10 แสดงผลการแยก PCR product บน agarose gel.....	29
11 แสดงความสัมพันธ์ทาง phylogenetic เมื่อเปรียบเทียบ complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยาดตัวอื่นๆ.....	32
12 แสดงความสัมพันธ์ทาง phylogenetic เมื่อเปรียบเทียบ E1 gene ของไวรัสชิคุนกุนยา	33
13 แสดง alignment ของไวรัสชิคุนกุนยาและลำดับ oligonucleotide ที่ใช้ออกแบบ primer และ probe.....	34
14แสดง alignment ของไวรัสเดงกีและลำดับ oligonucleotide ที่ใช้ออกแบบ primer และ probe.....	34
15 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ primer ต่างๆของไวรัสชิคุนกุนยา.....	35
16 แสดงค่า Ct ของแต่ละความเข้มข้นของ primer ของไวรัสชิคุนกุนยาเมื่อเทียบกับแต่ละสี.....	36
17 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ primer ต่างๆของไวรัสชิคุนกุนยา.....	37

รูปที่	หน้า
18 แสดงค่า Ct ของแต่ละปริมาณของ probe ของไวรัสชิคุนกุนยาเมื่อเทียบกับแต่ละสี...	37
19 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ primer ต่างๆของไวรัส แดงก็.....	38
20 แสดงค่า Ct ของแต่ละความเข้มข้นของ primer ของไวรัสแดงก็แต่ละ serotype เมื่อ เทียบกับแต่ละสี.....	38
21 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ probeต่างๆของไวรัสแดงก็	39
22 แสดงค่า Ct ของแต่ละความเข้มข้นของ probe ที่ปริมาณของไวรัสแดงก็ที่ต่างกันของ แต่ละ serotype เมื่อเทียบกับแต่ละสี.....	39
23 ภาพสัญญาณของช่อง Cy5 แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของไวรัสชิคุนกุนยา.....	41
24 ภาพสัญญาณของช่อง JOE แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของไวรัสแดงก็ทั้ง 4 serotype.....	42
25 แสดงภาพการทดลองการใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันโดยต่างกัน 10 เท่า ตั้งแต่ 10^1 - 10^6 copies/ μ l ของไวรัสชิคุนกุนยา.....	42
26 แสดง standard curve ของไวรัสชิคุนกุนยา และแสดงให้เห็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ สามารถตรวจสอบได้.....	43
27 แสดงภาพการทดลองการใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันโดยต่างกัน 10 เท่า ตั้งแต่ 10^1 - 10^7 copies/ μ l ของไวรัสแดงก็.....	43
28 แสดง standard curve ของไวรัสแดงก็และแสดงให้เห็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ ตรวจสอบได้.....	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CHIKV	Chikungunya Virus
DENV	Dengue Virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
Ct	Threshold cycle
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EtOH	Ethanol
μ l	Microliter
ml	Mililiter
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
NaOAc	Sodium acetate
NTR	Non-translated region
Tm	melting temperature

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีเป็นปัญหาที่สำคัญ เมื่ออิงจากจำนวนตัวเลข พบว่าในปี 2552 ประเทศไทยมีการระบาดของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยามากกว่า 40,000 คนโดยเฉพาะในเขตภาคใต้ของประเทศไทย (1) และจากรายงานการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั่วโลกพบว่า มีผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีประมาณ 50 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตมากถึง 25,000 ราย ต่อปี (2) โดยมียุงที่อยู่ใน *Aedes family* เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส ซึ่งตัวที่สำคัญคือ *Ae.aegypti* และ *Ae.albopictus* ทั้งในเขตชุมชนเมืองและเขตที่เป็นที่ร่อนขึ้น นอกจากนี้ไวรัสทั้งสองตัวนี้มีพาหะนำโรคที่คล้ายคลึงกันแล้ว เมื่อมาดูอาการของโรค ยังพบว่า การติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดมีอาการที่ใกล้เคียงกันมาก เช่นการมีไข้ การมีผื่นแดง และยิ่งใกล้เคียงกับการติดเชื้อไวรัสตัวอื่นๆ ดังนั้นการตรวจหาและแยกแยะไวรัสทั้งสองชนิดนี้จึงมีความสำคัญ

วิธีการตรวจวัดไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีมีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่ใช้กันอยู่ทั่วไปและมีความน่าเชื่อถือคือการเพาะเชื้อไวรัส(culture) แต่การเพาะเชื้อไวรัสต้องอาศัยเวลา นอกจากการเพาะเชื้อไวรัสแล้ว ยังสามารถตรวจสอบโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) ข้อเสียของการตรวจสอบโดยวิธีการ PCR ปกติคือ อาศัยการดูขนาดของ band ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นโดยอาศัย primer ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณใดบริเวณหนึ่งของไวรัส จากนั้นก็ต้องทำการตรวจสอบ sequence ของ band ที่เกิดขึ้นด้วยว่าเป็น genome ของไวรัสชนิดนั้น จะเห็นได้ว่ามีกระบวนการหลายขั้นตอนก่อนที่จะยืนยันได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชนิดใด ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญและได้พัฒนาเทคนิค multiplex real-time PCR โดยอาศัย probe โดย probe ที่ใช้ มีการติดฉลากสีที่ให้การคายแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน ส่งผลให้มีข้อดีหลายอย่างเช่น สามารถตรวจได้ไว มี specificity และ sensitivity ที่ดี ตรวจหาเชื้อไวรัสที่สนใจได้มากกว่า 1 เชื้อต่อ 1 ปฏิกริยา และยังสามารถแสดงค่าในเชิงปริมาณได้ด้วย การเลือกออกแบบ primer และ probe มีความสำคัญต่อวิธีการ multiplex real-time PCR อย่างมาก โดย primer และ probe ที่เลือกใช้ควรมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ มีความคล้ายคลึงกันระหว่างไวรัสชนิดเดียวกัน และควรจะต้องใช้สภาวะในการทำ PCR ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น การศึกษา complete genome ของไวรัสทั้งสองชนิดจึงมีความสำคัญต่อการเลือกช่วง genome ของไวรัสและการออกแบบ primer และ probe ผู้วิจัยจึงได้อาศัยฐานข้อมูลจาก GenBank เพื่อศึกษา genome ของไวรัสเดงกี แต่ฐานข้อมูลของไวรัสชิคุนกุนยามีอยู่อย่างจำกัด ผู้วิจัยจึงทำการหา complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยาด้วย

คำถามงานวิจัย

1. ลักษณะพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยาที่ระบาดในประเทศไทยช่วงปี ค.ศ. 2008-2009 มีลักษณะอย่างไร
2. การตรวจหาไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีโดยวิธี multiplex real-time PCR สามารถนำมาใช้ตรวจการติดเชื้อของผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อได้หรือไม่
3. ความสามารถของวิธี multiplex real-time PCR ที่แยกแยะไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี เป็นอย่างไร
4. ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง(accuracy) ของวิธี multiplex real-time PCR เป็นอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สามารถวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยาได้
2. เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex real time PCR เพื่อการตรวจวินิจฉัยและแยกแยะไวรัส 2 ชนิดคือ ไวรัสชิคุนกุนยา และ ไวรัสเดงกี ที่อาศัยปฏิกิริยาเพียงปฏิกิริยาเดียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ
3. เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมา มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง(accuracy) ต่อไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี และสามารถวัดปริมาณ template ของไวรัสในตัวอย่างได้

สมมติฐานของการวิจัย

1. ลักษณะพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยา น่าจะมีความใกล้เคียงกับไวรัสชิคุนกุนยาที่ระบาดในประเทศเพื่อนบ้าน หรือ แถบประเทศมหาสมุทรอินเดีย
2. ถ้ามีตัวอย่างที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาหรือไวรัสเดงกี สามารถนำเทคนิค multiplex real time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและบ่งบอกได้ว่าติดเชื้อไวรัสชนิดใดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว แสดงว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อได้จริง
3. ถ้าเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง(Accuracy) ต่อไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี และเวลาที่ใช้ในการตรวจ (detection time) ระหว่างวิธี RT-PCR, และ rapid test kit และELISA น่าจะให้ผลที่น่าพอใจ ซึ่งสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี ได้ในเวลาเดียวกัน

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

Strain เป็นการแบ่งกลุ่มทางชีววิทยาโดยอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมเป็นตัวแบ่งแยก โดยในงานวิจัยนี้เป็นการแบ่งแยกสายพันธุ์ของไวรัสชิคุนกุนยา

Serotype เป็นการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กโดยอาศัยความแตกต่างของโปรตีนบนผิวเซลล์เป็นเกณฑ์ ซึ่งในงานวิจัยนี้หมายถึงการแบ่งแยกสายพันธุ์ของไวรัสเดงกี

Multiplex เป็นการรวมปฏิกิริยามากกว่าหนึ่งปฏิกิริยาไว้ในหลอดทดลองเดียวกัน โดยวิเคราะห์ หรือตรวจหาสิ่งที่สนใจมากกว่าหนึ่งสิ่ง

คำสำคัญ

Multiplex
Real-time PCR
Chikungunya Virus
Dengue Virus
Complete genome
Sequence analysis

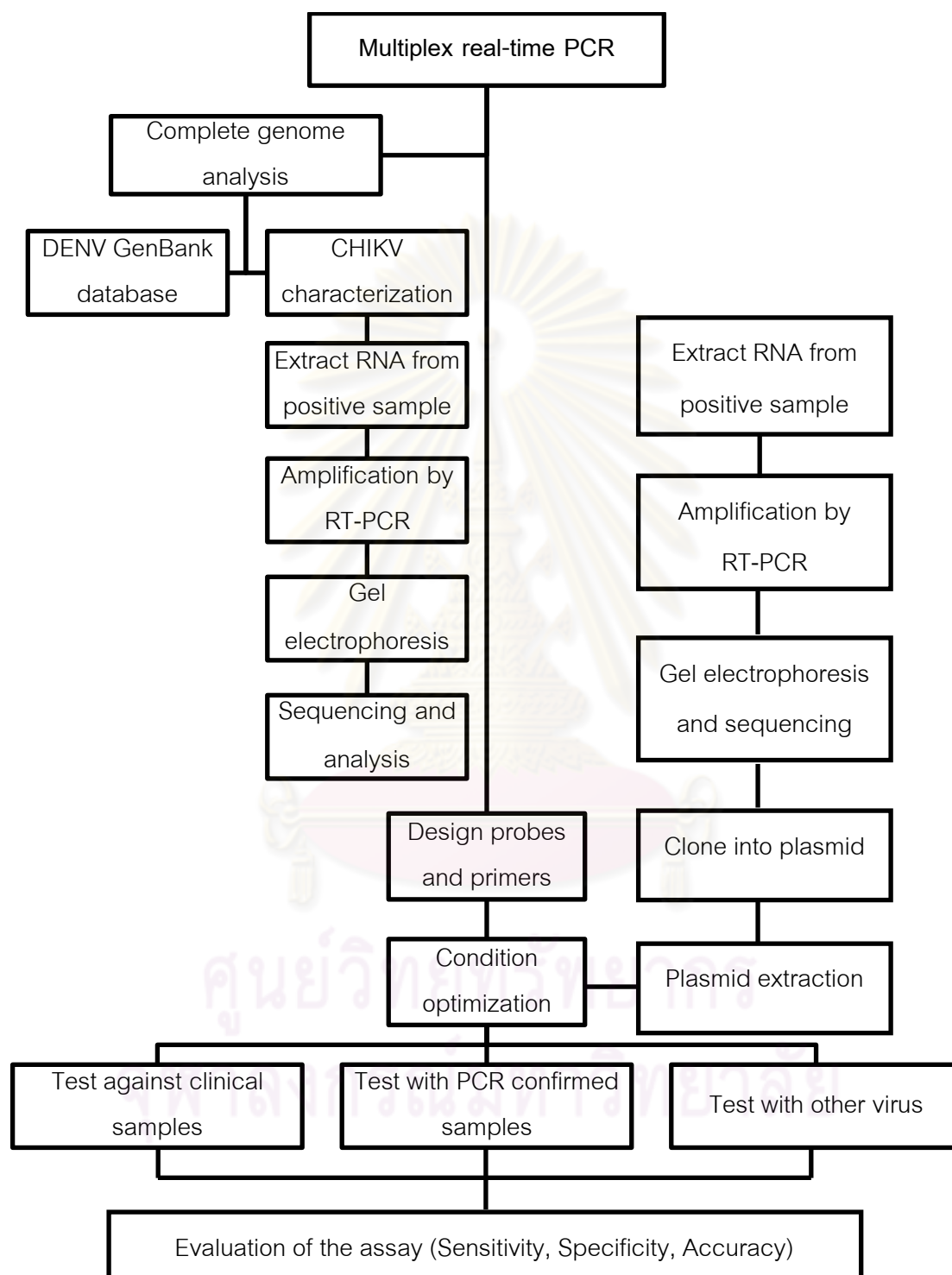
ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ จึงอาจทำให้ Nucleic acid บางส่วนเสียหายไปบ้าง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพิ่มฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของไวรัสชิคุนกุนยา เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่อาจก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมากขึ้นหรือเกิดรูปแบบการระบาดที่ต่างไปจากเดิม ส่วนการพัฒนาวิธีการตรวจน่าจะมีประโยชน์ต่อหลายๆประเทศที่ประสบปัญหาการระบาดของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน โดยวิธีการนี้มีความรวดเร็ว ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ

ขอบเขตของการวิจัย



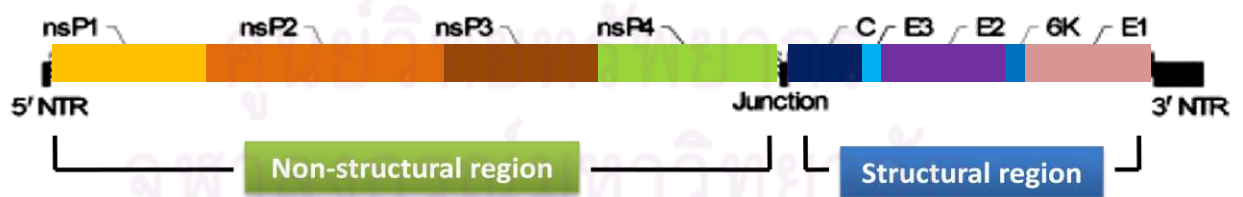
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

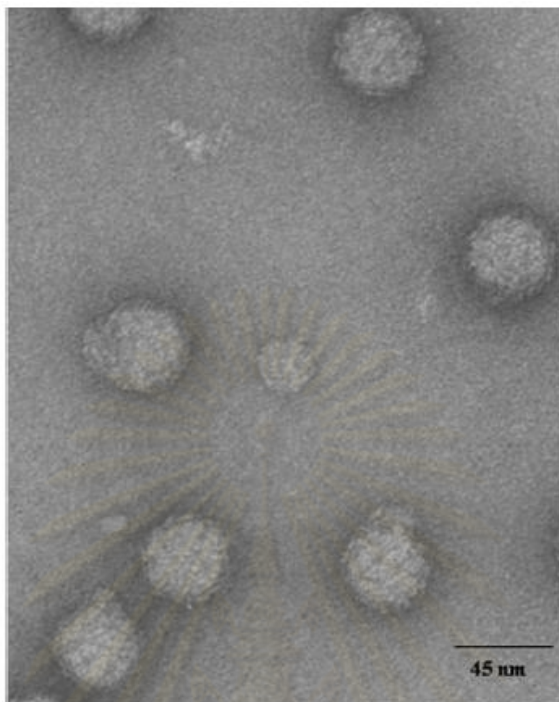
ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัส

ไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya Virus)

จัดอยู่ใน *Alphavirus* genus ซึ่งกลุ่มนี้มีสมาชิกประมาณ 29 ชนิด และจัดอยู่ในกลุ่ม *Togaviridae* family (3) เป็นไวรัสที่มีเยื่อหุ้ม ประกอบด้วยจีโนมที่เป็น RNA สายบวกลายเดี่ยว (single-stranded RNA) มีความยาวประมาณ 11.8 kb (4) จีโนมของไวรัสชิคุนกุนยาประกอบด้วย ส่วนที่ถอดรหัสเป็นส่วนของโปรตีน (structural protein encoding region) ที่เป็นโครงสร้าง และโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้าง (non-structural protein encoding region) ทำหน้าที่ในการถอดรหัสเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของไวรัส และนอกจากนี้ ยังมีส่วนที่ไม่ถอดรหัส อยู่ที่ปลาย 5' non translated region และ 3' non translated region (5'NTR และ 3'NTR) โดยส่วนที่ถอดรหัสเป็นส่วนของโปรตีน (structural protein encoding region) อยู่ทางปลาย 3'NTR ความยาวประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวทั้งหมด ได้แก่ C, E3, E2, 6K และ E1 gene และส่วนที่ถอดรหัสโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้าง (non-structural protein encoding region) อยู่ทางปลาย 5'NTR ความยาวประมาณ 2 ใน 3 ของจีโนม ได้แก่ nsP1, nsP2, nsP3 และ nsP4 gene ทั้งหมดดังแสดงในรูปที่ 1 (5) ไวรัสชิคุนกุนยามีลักษณะเป็นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 42 nm และส่วนที่เป็น core ประมาณ 25–30 nm ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1: แสดงจีโนมทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya Virus) ประกอบด้วยส่วน non-structural region, structural region, 5'NTR และ 3'NTR



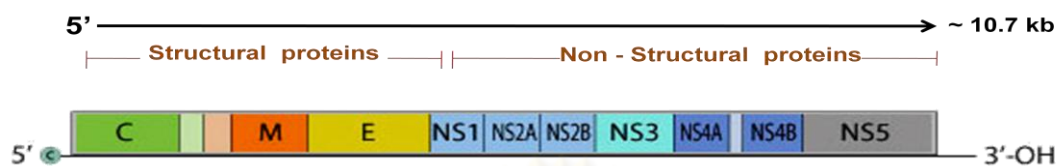
รูปที่ 2 รูปถ่าย Electron micrograph of ของCHIKV virions (6)

โปรตีนโครงสร้างที่สำคัญของไวรัสชิคุนกุนยาและมีผู้สนใจศึกษา คือส่วนโปรตีนที่มาจาก *E1* และ *E2* gene ซึ่งเป็นส่วนที่ถอดรหัสได้ *E1* และ *E2* glycoprotein และเป็นส่วนหนึ่งของ spike ที่อยู่รอบๆตัวไวรัส *E1* และ *E2* glycoprotein จะมีกระบวนการ post-translational modification ใน endoplasmic reticulum และ golgi apparatus ก่อนที่จะถูกส่งไปที่ plasma membrane และไปอยู่ที่ผิวของไวรัส (6) ซึ่ง glycoprotein ทั้งสองตัวนี้จะอยู่ใกล้กันและเชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้าง trimeric heterodimer spike มีส่วนช่วยในการเกาะกับผิวของ host และช่วยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์อีกด้วย โดย *E2* envelope protein เป็น type I transmembrane glycoprotein ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับ receptor ในวงจรชีวิตของไวรัสชิคุนกุนยา (7)

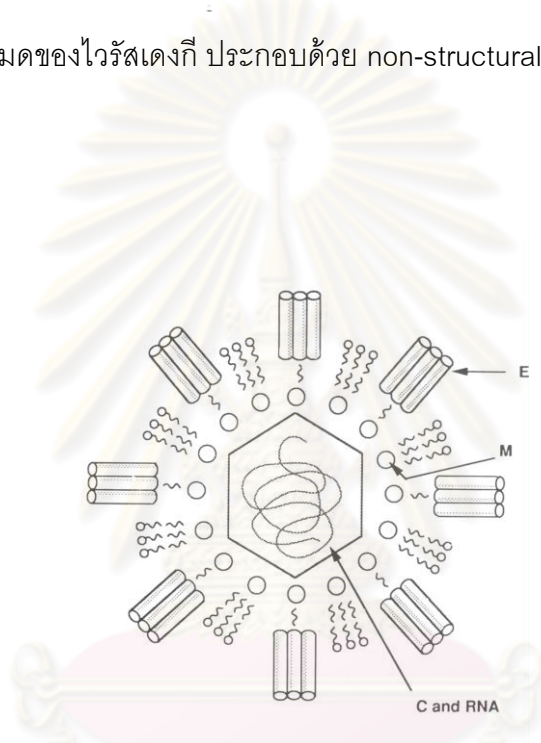
ไวรัสเดงกี (Dengue virus, DENV)

จัดอยู่ใน Genus *Flavivirus* และ Family *Flaviviridae* ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส yellow fever ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้เหลืองและมีความรุนแรงเช่นกัน ไวรัสเดงกีเป็นไวรัสที่มีเยื่อหุ้มประกอบด้วยจีโนมที่เป็น RNA สายบวกลายเดี่ยว (single-stranded RNA) มีความยาวประมาณ 10.7 kb ประกอบด้วยส่วนที่ถอดรหัสได้ออกมาเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนโครงสร้าง (structural protein) ได้แก่

capsid (C), pre-membrane/membrane (prM/M) และ envelop (E) และโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้างของไวรัส ได้แก่ NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5 ดังแสดงในรูปที่ 3(8)



รูปที่ 3: แสดงจีโนมทั้งหมดของไวรัสเดงกี ประกอบด้วย non-structural region, structural region, 5'NTR และ 3'NTR



รูปที่ 4: แสดงส่วนประกอบโครงสร้างของไวรัสเดงกี (9)

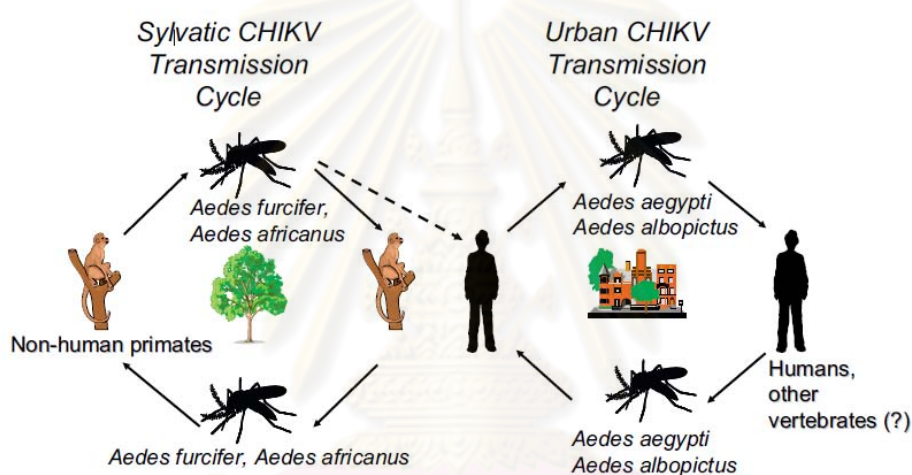
โปรตีน 3 ตัวที่สำคัญที่เป็นโครงสร้างของไวรัสเดงกีคือ C, M และ E protein โดย C protein เป็นส่วนประกอบ core ของไวรัส, M protein น่าจะเป็นส่วนที่ถัดมาจาก core ของไวรัสคือ Membrane protein โดยต้องเป็น prM ก่อน แล้วจึงถูกตัดเป็น M protein ที่หลัง, และ E protein เป็นส่วนหลักของ envelop โดยเชื่อว่า prM-E heterodimer มีความเกี่ยวข้องกับการก่อสร้างตัวของไวรัส และมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น antibody ของร่างกาย นอกจากนี้ NS1 ยังเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้น antibody และเชื่อว่าสามารถใช้ NS1 protein เป็นตัวบ่งบอกการมีอยู่ของไวรัสได้ โดยมีชุดตรวจมากมายที่ออกแบบมาเพื่อตรวจ NS1 protein ของไวรัสเดงกีโดยเฉพาะ(10) โดยการติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรกไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โดยมี E protein เข้าไปจับกับเซลล์ของ host ส่วนโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัสก็มีความสำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถของการแบ่งตัวของไวรัสเดงกี เช่น NS3 ที่เกี่ยวข้องกับการตัดแปลงโปรตีนหลังจากการถอดรหัสแล้วโดยมี serine

protease และ ATP-dependent helicase, NS5 มีความสำคัญคือเกี่ยวข้องกับกระบวนการ methyltransferase และ RNA-dependent RNA polymerase, NS2B ทำหน้าที่เป็น cofactor ของ NS3 protease และ NS4B เชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องกับการขัดขวางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของ host คือการตอบสนองของ interferon (IFN) ส่วน NS1, NS2A และ NS4A ยังไม่มีการรายงานที่ชัดเจนของหน้าที่โปรตีนเหล่านี้ (11)

การระบาดของไวรัส, พาหะของไวรัส และ การจำแนกสายพันธุ์ต่างๆของไวรัส

ไวรัสชิคุนกุนยาถูกพบครั้งแรกที่ประเทศ Tanzania ในปี ค.ศ. 1953 โดยในระหว่างนั้นพบว่าเป็นโรคที่มีความคล้ายคลึงกับโรคที่ติดเชื้อมาจากไวรัสเดงกี ทำให้ในช่วงแรก ผู้คนเข้าใจว่าเป็นโรคเดียวกับโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี (12) หลังจากนั้นก็พบการระบาดของไวรัสชิคุนกุนยา ทั้งในประเทศแถบแอฟริกา เอเชีย และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยประเทศในเอเชียที่พบครั้งแรกนั้น พบในประเทศไทยในปี ค.ศ. 1958 ในแถบชนบท (13) จากนั้นปี ค.ศ. 2004 เป็นจุดเริ่มต้นของการระบาดของไวรัสชิคุนกุนยาครั้งใหญ่ที่สุดในหลายพื้นที่ที่อยู่ในแถบมหาสมุทรอินเดีย เช่นเกาะ Réunion ซึ่งมีรายงานว่ามีผู้ติดเชื้อมากถึง 270,000 ราย คิดเป็น 34% ของประชากรทั้งหมด, นอกจากนี้ที่เกาะ Seychelles, Madagascar และ Mayotte ก็มีรายงานการระบาดด้วย (14) ในปีถัดมาประเทศอินเดียพบการระบาดครั้งใหญ่ของไวรัสชิคุนกุนยาโดยมีผู้ติดเชื้อมากถึง 1.38 ล้านคนในปีค.ศ. 2006 นอกจากการระบาดในบริเวณแถบมหาสมุทรอินเดียและประเทศอินเดียแล้วยังพบการระบาดในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศอินโดนีเซีย ในปี ค.ศ. 2001-2008 (15) ประเทศสิงคโปร์ในปี ค.ศ. 2008 (16) ประเทศมาเลเซียในปี ค.ศ. 2006 (17) และประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2008 ด้วย(18) ไวรัสชิคุนกุนยาสามารถแบ่งสายพันธุ์ออกได้เป็น 3 Strain โดยอาศัยความแตกต่างของ E1 gene ที่ถอดรหัสให้ส่วนของ E1 glycoprotein ในการแบ่งสายพันธุ์ คือ West African strain, Asian strain, และ east central and south African (ECSA) strain (19) สายพันธุ์ที่พบครั้งแรกคือสายพันธุ์ West African ส่วนการระบาดระยะแรกในแถบเอเชียเป็น Asian strain แต่หลังจากปี ค.ศ.2005 เป็นต้นมา ก็มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสายพันธุ์ ECSA และในประเทศไทยมีการระบาดของสายพันธุ์ ECSA เช่นกัน (20) เนื่องจากในปัจจุบันผู้คนมีการเดินทางระหว่างประเทศจำนวนมาก ไวรัสจึงมีการระบาดไปในประเทศที่ไม่ได้อยู่ในเขตร้อนด้วย เช่นประเทศในแถบยุโรปและ อเมริกา(21) และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการกระจายตัวของไวรัสที่แตกต่างไปจากเดิม แต่อย่างไรก็ตาม การระบาดส่วนมากจะอยู่ในแถบประเทศที่อยู่ใกล้เส้นศูนย์สูตร เช่นแถบแอฟริกาและเอเชีย โดยเชื่อว่าไวรัสชิคุนกุนยาในแถบแอฟริกากลางและตะวันตกจะพบมากในพื้นที่ที่เป็นป่ากระจายไปในหมู่ non-human primates และยุงที่อยู่ใน *Aedes species* แต่เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศในแถบเอเชีย พบว่ายุงตัวสำคัญที่มี

ไวรัสชิคุนกุนยาอยู่คือยุง *Ae. Aegypti* โดยนอกจาก *Ae. Aegypti* ที่เป็นตัวสำคัญในการระบาดของไวรัสชิคุนกุนยาคือยุง *Ae. Albopictus* โดยงานวิจัยในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมาพบว่า *Ae. Albopictus* เป็นพาหะนำไวรัสชิคุนกุนยามากกว่า *Ae. Aegypti* นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของกระดุมมิโนบางตัวที่ทำให้การระบาดของไวรัสชิคุนกุนยา อาศัยตัวพาหะที่เป็น *Ae. Albopictus* มากขึ้น และอาจจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเพราะไปลดความต้องการ cholesterol ของไวรัสในการเข้าสู่ host ดังเช่นการศึกษา Cholesterol-dependent ในไวรัส SFV (Semliki forest virus) ซึ่งอยู่ใน family เดียวกับไวรัสชิคุนกุนยา และมีลักษณะที่ค่อนข้างคล้ายกัน (22)



รูปที่ 5 วงจรการถ่ายทอดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเทียบระหว่างบริเวณที่เป็นป่า และบริเวณที่เป็นชุมชนเมือง และตัวพาหะที่ต่างกัน

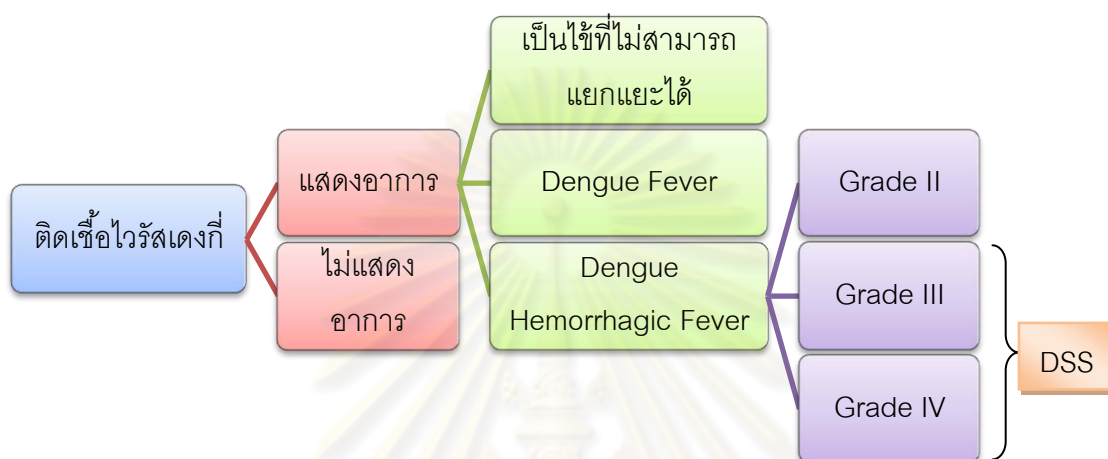
ไวรัสแดงก็พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 ที่เมืองบาจาเวียซึ่งปัจจุบันคือเมืองจาร์กาต้า ในประเทศอินโดนีเซีย และเมืองโคโร ประเทศอียิปต์ (23) หลังจากนั้นก็มีรายงานการระบาดเรื่อยมา ตัวอย่างการระบาดครั้งใหญ่เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ.1922 โดยมีผู้ติดเชื้อไวรัสแดงก็ประมาณ 2 ล้านคน ประเทศออสเตรเลีย ในปี ค.ศ. 1925-1926 และ 1942, ประเทศกรีซในปี ค.ศ.1927-1928 และประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ.1942-1945 (24) หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 ก็มีการระบาดของไวรัสแดงก็ในแถบประเทศเอเชีย โดยพบในประเทศไทยด้วย (25) ในพื้นที่ที่มีการระบาดของไวรัสแดงก็สามารถพบยุงที่เป็นพาหะของไวรัสคือ *Ae. aegypti* ซึ่งเป็นพาหะตัวหลักของไวรัส แต่ก็พบ *Ae. albopictus* ที่เป็นพาหะหลักของไวรัสแดงก็บ้าง เช่นที่เกาะ Hawaii ในปี ค.ศ. 2001(26) โดยพบการกระจายของตัวของ *Ae.albopictus* ทั่วไป โดยเฉพาะในประเทศที่อยู่ใกล้เส้นศูนย์สูตร แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบโดยสัดส่วนแล้วพบว่า *Ae. aegypti* น่าจะเป็นพาหะนำไวรัสแดงก็มากกว่า *Ae.albopictus*

เดงกีไวรัสเดงกีอาศัยภูมิก่อตัวของ Surface antigen ในการจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ DENV 1-4 โดยในประเทศอเมริกาพบว่า serotype ที่พบบ่อยคือ DENV1, DENV2 และ DENV3 (27) แต่บางพื้นที่ก็พบการระบาดของ DENV4 เช่นกัน ตัวอย่างเช่นบริเวณ Pacific region ซึ่งเมื่อ 10-15 ปีที่ผ่านมาจะพบ DENV1 มาก แต่ก็ถูกแทนที่ด้วย DENV4 ในปี ค.ศ. 2008 (28) อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีมีมากถึง 50 ล้านคนต่อปี และอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ โดยมีรายงานการตายมากถึง 25,000 คน (2)

ลักษณะอาการของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสและการรักษา

ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสซิกุนกุณยามักมีอาการเป็นไข้สูงในระยะเวลาอันสั้น อาจมีอาการปวดข้อที่รุนแรงและนอกจากนี้ยังมีผื่นแดงอีกด้วย พบว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสส่วนใหญ่จะแสดงอาการ ในขณะที่บางส่วนอาจไม่แสดงอาการประมาณ 3% การติดเชื้อไวรัสซิกุนกุณยาใช้เวลาประมาณ 2 วันหลังจากการติดเชื้อ แล้วจึงแสดงอาการ โดยอาจเป็นไข้ไม่กี่วันหรืออาจมีไข้จนถึง 1 สัปดาห์ก็ได้ และเมื่อเป็นไข้แล้วส่วนมากมักมีอาการปวดข้อตามมา อาจจะเป็นข้อมือ ข้อเข่า หรือหลายๆที่ที่เป็นได้ ส่วนผื่นแดงก็มีบ้างโดยพบเพียง 19% ของคนไข้ทั้งหมด เช่นการเกิด maculopapular, vesicubullous lesion, aphthouslike ulcer และ vasculitic lesion อาการอื่นๆอีก เช่น ปวดหัว อ่อนแรง วิงเวียน อาเจียน โดยอาการความรุนแรงก็แตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล นอกจากนี้ยังแสดงอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเช่น meningoencephalitis, myeloneuropathy, Guillan-Barre syndrome, acute flaccid paralysis โดยพบว่าเมื่อเร็วๆนี้มีรายงานแสดงอาการของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสซิกุนกุณยาว่ามีอาการทางสมองมากถึง 16% (29) ส่วนความรุนแรงที่ทำให้ถึงแก่ชีวิตของไวรัสซิกุนกุณยานี้ ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าสามารถทำให้ตายได้หรือไม่ แต่ก็มีบางรายงานว่าผู้ป่วยเสียชีวิตจากอาการแทรกซ้อน เช่น ภาวะอวัยวะล้มเหลวเฉียบพลันและหัวใจวาย (30) การติดเชื้อไวรัสซิกุนกุณยาเชื่อว่าสามารถสร้างภูมิคุ้มกันระยะยาวได้ตลอดชีวิต เช่นเดียวกับ arboviruses ตัวอื่นๆ โดยหลังจากการติดเชื้อประมาณ 2 สัปดาห์ร่างกายน่าจะมีการสร้าง antibody ขึ้นมา เช่น IgG และ IgM และพบว่า antibody เหล่านี้สามารถอยู่ได้นานถึง 1 ปีและจากนั้นจะเก็บไว้ที่ memory cell เพื่อการตอบสนองที่ไวขึ้นเมื่อติดเชื้อไวรัสซ้ำสอง การรักษาผู้ที่ติดเชื้อไวรัสซิกุนกุณยาไม่มียารักษาที่จำเพาะ จึงใช้ยาเพื่อรักษาอาการทั่วไป เช่น ribavirin, sulfated polysaccharides, interferon, corticosteroids, and chloroquine (31) แม้ว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อาการจะหายไปเองภายในเวลา 1 สัปดาห์ แต่ก็ยังมีรายงานว่าผู้ป่วยมีอาการที่ยาวนานเป็นปีหรือหลายปีโดยเฉพาะอาการปวดข้อ อาการอ่อนเพลีย (32) โดยการเป็นอาการเรื้อรังนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมก็ได้ (33) ไวรัสเดงกีสามารถทำให้เกิด dengue fever (DF) และ dengue hemorrhagic fever (DHF) โดยอาการของแต่ละคนอาจจะแตกต่างกันออกไป โดยผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

อาจจะแสดงอาการน้อยมาก หรือไม่แสดงอาการเลย หรือบางทีอาจมีอาการรุนแรงมากจนถึงแก่ชีวิต โดย WHO ได้แบ่งอาการของโรคออกเป็นระดับต่างๆดังแสดงในรูปที่ 6 (34)



รูปที่ 6 แผนผังการจำแนกระดับของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีตามมาตรฐานของ World Health Organization (34)

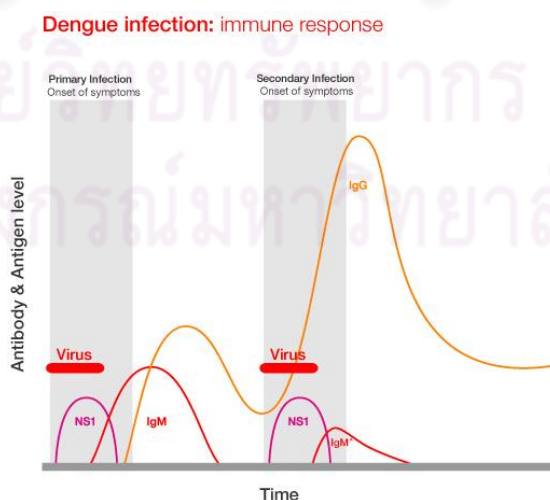
โดยส่วนมากแล้วผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เป็นเด็ก มักจะมีผื่นแดงในลักษณะที่เป็น maculopapular rash พร้อมๆกับการเป็นไข้ ที่ไม่สามารถแยกแยะได้ อาการของเด็กโดยทั่วไปมักจะแสดงอาการน้อยหรือไม่แสดงอาการเลย ตัวอย่างเช่น การศึกษาในประเทศไทย เด็กที่อายุต่ำกว่า 15 ปี พบว่าเพียง 13% ของเด็กกลุ่มนี้ไม่มาโรงเรียนเกิน 1 วัน (35) แต่เด็กบางคนก็สามารถเกิดอาการรุนแรงได้โดยเกิด Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) โดยอาการคือ มีการขยายตัวของรูเส้นเลือดฝอย หรือที่เรียกว่า capillary permeability ทำให้เกิดพลาสมารั่วไหล และทำให้เกิดอาการเลือดออกได้ ดังที่คนทั่วไปเรียกว่าไข้เลือดออก บางครั้งตับอาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและนุ่มขึ้นโดยพบมากถึง 40% โดยคนที่ เป็น DHF นี้มีโอกาสเสียชีวิตมากถึง 10-20% (โดยที่ 40% เกิดจากอาการช็อค) อาการเช่นนี้ถ้าดูแล อย่างดีในโรงพยาบาล จะช่วยลดอัตราการตายลงได้ โดยสังเกตได้จากการปวดหน้าท้องอย่างยาวนาน การอาเจียนอย่างต่อเนื่อง จำนวน platelet count ลดลงอย่างมากและกระตื้นห้น การเปลี่ยนแปลง จากไข้ไปเป็น hypothermia อย่างรวดเร็ว (36)

อาการอื่นๆของการติดเชื้อไวรัสเดงกี เช่น อาการตัวเหลืองคล้ายดีซ่าน คางทูม กล้ามเนื้อหัวใจ อักเสบ, mononeuropathies, polyneuropathies, ภาวะสมองและไขสันหลังอักเสบ (37)

ส่วนการแสดงออกของอาการจากไข้เด็งกีหรือ Dengue fever มักจะพบในวัยรุ่น โดยมักจะเป็นไข้เฉียบพลัน ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน และมีผื่นแดงๆขึ้นตามตัว แขน และขา โดยผื่นแดงส่วนมากจะเป็น macular หรือ maculopapular rash แล้วพัฒนาเป็น confluent และ sparing small islands ของผิวหนังปกติ (38) อาการอื่นๆเช่น เจ็บคอ และ ไอ เป็นต้น

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีไม่มียาที่รักษาโดยตรงเช่นเดียวกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา โดยอาจจะใช้สเตียรอยด์ ใช้ยาดับไวรัส หรือใช้carbazochrome ซึ่งไปลดขนาดของรูเส้นเลือดฝอย (capillary permeability) ในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการช็อค ควรให้ผู้ป่วยดื่มน้ำมากๆ ควรหลีกเลี่ยงการให้ยาพาราเซตามอล แอสไพริน หรือยาที่ไปลดอาการอักเสบทั้งหลาย เนื่องจากยาเหล่านี้จะไปเพิ่ม อาการ Reye's syndrome และการรั่วไหลของพลาสมา ผู้ป่วยควรอยู่ในการดูแลของแพทย์อย่างใกล้ชิดหลังจากไข้ลดอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เนื่องจากเสี่ยงต่ออาการช็อคและเสียชีวิตได้ (39)

การติดเชื้อไวรัสเด็งกีครั้งแรกมักไม่แสดงอาการ ทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัส serotype หนึ่งแต่ไม่ได้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ serotype อื่นๆ จึงพบการติดเชื้อครั้งที่ 2 อยู่เสมอ โดยร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาในระดับหนึ่ง แต่ไม่มากนัก และเมื่อติดเชื้อไวรัสเด็งกีครั้งที่ 2 จะมีภูมิคุ้มกันหรือ antibody ที่สูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งความรุนแรงของโรคส่วนหนึ่งมาจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง โดย antibody ไปทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้น ซึ่งเรียกว่า antibody-dependent enhancement โดยอาจเกิดการ cross-reaction ระหว่าง serotype ของไวรัสเด็งกีทำให้เกิดกระบวนการที่ทำให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น เช่น monocyte ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายหลักของไวรัสเด็งกีในการติดเชื้อ



รูปที่ 7 ปริมาณของ antibody เมื่อติดเชื้อไวรัสเด็งกีครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

(<http://denguemu.wordpress.com/pathogenesis/>)

จะเห็นว่าอาการของการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่ก็มีบางอาการที่การติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกัน ดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบอาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี

	ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา	ติดเชื้อไวรัสเดงกี
เป็นไข้	+++	++
ผื่นแดง	++	++
Arthragia/arthritis	+++	-
Myalgia	+	++
Bleeding	+/-	+++

+ แสดงถึงการมีอาการและความรุนแรงของโรค

- แสดงถึงการไม่มีอาการ

วิธีการตรวจเชื้อไวรัสแบบต่างๆ

การตรวจแยกแยะไวรัสทั้งสองชนิดถือว่าสำคัญมาก โดยเฉพาะ วิธีการทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากอาการที่ไม่ชัดเจนและใกล้เคียงกับกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น การเป็นไข้จากการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ การพบเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาครั้งแรก เชื่อว่าเหตุมาจากเชื้อไวรัสเดงกี แสดงให้เห็นถึงความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์หากไม่ทำการทำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีสามารถตรวจได้หลายวิธีขึ้น เช่น การตรวจ RNA ของไวรัส โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งวิธีการนี้ควรตรวจตั้งแต่ช่วงแรกของการติดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิด viremia เพราะไวรัสยังคงอยู่ โดยตัวอย่างที่มีการเก็บในช่วง 7 วันแรกหรือการตรวจ antibody ที่มีต่อไวรัส โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ไวรัสชิคุนกุนยาสามารถตรวจ IgM ได้ภายหลังจากการติดเชื้อประมาณ 7 วัน และสามารถคงอยู่ได้หลายเดือน หรืออาจเป็นปี นอกจาก IgM แล้ว ยังสามารถตรวจ IgG ได้เช่นกัน antibody นี้สามารถตรวจโดยวิธี HI ได้ด้วย(40) นอกจากนี้การตรวจเชื้อไวรัสเดงกีวิธีหนึ่งที่น่าเชื่อถือคือ การเพาะเชื้อไวรัส การบ่งบอกเชื้อไวรัสเดงกีนี้มีความจำเป็นมากต่อการระวังผู้ป่วยไม่ให้เกิดอาการซ้ำ

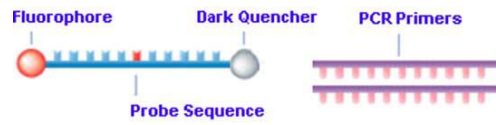
ทฤษฎีและหลักการทั่วไปของเทคนิค Real-time PCR

เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมาก เนื่องจากเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA เป็นทวีคูณ นั่นหมายถึงมีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าในทุกๆ วัฏจักร โดย DNA เป็นสารตั้งต้นและมีการออกแบบ primer เพื่อไปจับกับ DNA ตั้งต้นอย่างจำเพาะและเพิ่มจำนวน โดยการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการจับของ primer และการต่อสายให้ยาวขึ้น จากนั้นก็มีการพัฒนาเทคนิค PCR นี้เรื่อยมา และมีการเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคนี้อย่างมากมาย อีกวิธีหนึ่งที่มาจากการพัฒนาเทคนิค PCR คือ real-time PCR ซึ่งวิธีนี้สามารถวัดการเพิ่มปริมาณของ DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา โดยมีตัวที่ส่งสัญญาณการเพิ่มปริมาณของ DNA เช่น fluorescence probe หรือ DNA dyes หลักการที่ต่างกันระหว่าง fluorescence probe และ DNA dyes คือ fluorescence probe จะถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับ sequence ของส่วนที่เราสนใจ แต่ DNA dyes สามารถไปจับกับ double stranded DNA ได้ไม่ว่า sequence จะเป็นอย่างไรก็ตาม แต่ข้อดีของการใช้ DNA dyes คือราคาถูกกว่า

fluorescence *Taqman* probe ประกอบด้วย oligonucleotide ที่เชื่อมอยู่กับ quencher และ reporter molecule ซึ่งปกติจะไม่สามารถตรวจวัดแสงของ fluorescence ได้เมื่อยังมี quencher ต่ออยู่ แต่เมื่อมีการย่อยทำให้ quencher และ reporter หลุดออกจากกัน จะทำให้เครื่องสามารถตรวจวัดแสง fluorescence ได้ ส่วนขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA โดยการใช้ fluorescence *Taqman* probe เป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณ DNA แสดงในรูปที่ 8(41) โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย PCR primer และ probe ที่จำเพาะต่อส่วนที่เราสนใจ จากนั้น primers และ probe จะไปจับที่ส่วนนั้นโดยอาศัยอุณหภูมิที่พอเหมาะ และเมื่อมีการต่อสายของ primer จะมีการย่อยของ probe ซึ่งมี quencher อยู่ ทำให้ fluorescence สามารถตรวจได้ในเครื่อง real-time PCR ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา

การทำ Multiplex real-time PCR คือการที่เราใส่ probe มากกว่า 1 probe ในปฏิกิริยาเพื่อไปจับกับส่วนที่เราสนใจมากกว่า 1 ส่วน โดยส่วนมากแล้วก็จะใช้ primer มากกว่า 1 คู่ด้วยก็ได้ หลักการคือการใช้ probe ที่มีค่าแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน ทำให้สามารถวัดความยาวคลื่นที่แตกต่างกันได้ในต่างช่องสัญญาณกันดังรูปที่ 9 เมื่อเราใช้สัญญาณใดสัญญาณหนึ่ง ก็หมายถึง 1 ส่วนที่เราสนใจ และไม่ควรมีการ cross กันระหว่างช่องสัญญาณ

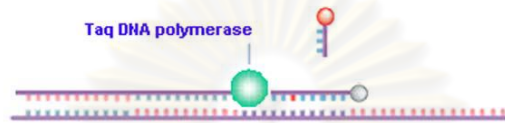
Elements of the TaqMan technology



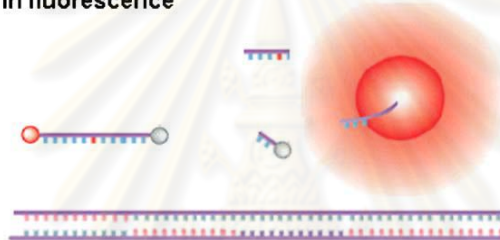
Step 1. Primer and probe annealing



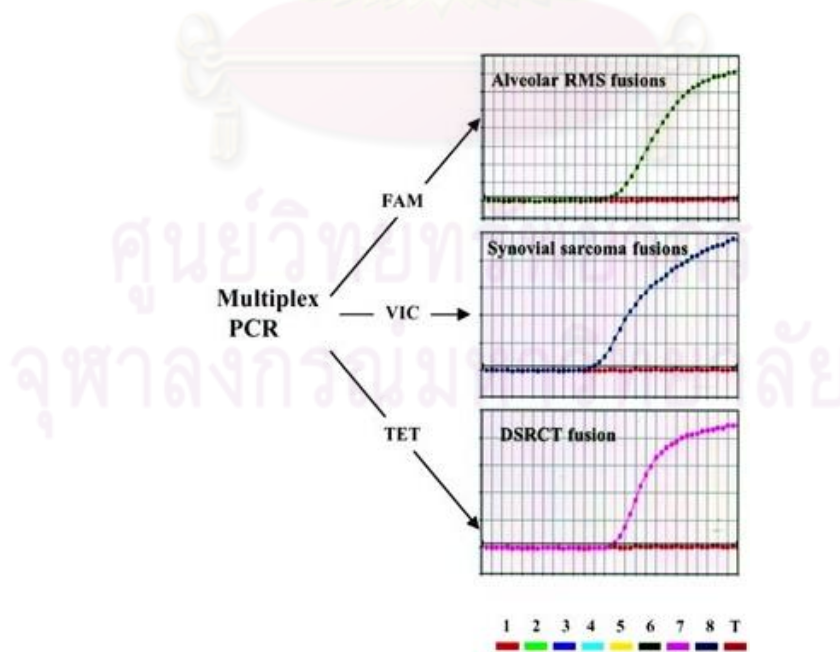
Step 2. Primer extension with Taq DNA polymerase



Step 3. Release of probe fragments with increase in fluorescence



รูปที่ 8 แสดงการจับกันระหว่าง primer, probe และส่วนที่เราสนใจ



รูปที่ 9 ตัวอย่างการแสดงผลของ real-time PCR ในต่างช่องสัญญาณกัน
 (http://www.nature.com/labinvest/journal/v81/n6/fig_tab/3780299f1.html)

การออกแบบ Primer และ probe

หลักการสำหรับการออกแบบ primer ในการทำ PCR

1. ควรเลือกตำแหน่ง primer ควรเลือกขนาบข้างของส่วนที่เราสนใจ โดนควรหลีกเลี่ยง primer ที่สามารถไปจับที่บริเวณอื่นได้เช่นกัน

2. เบสที่ปลาย 3' ของ primer ควรมี G หรือ C อยู่ 1-2 ตัว

3. primers ไม่ควรเป็นคู่ผสมกันเอง หรือมีโอกาสเกิดคู่ผสมกันเองได้ ทำให้เกิดเป็น primer dimer

4. ควรมีปริมาณ GC ประมาณ 45%-55%

5. ความยาวของ primer ควรประมาณ 18-30 เบส

6. ค่า Tm ของ primer ประมาณ 58°C-60°C ส่วนของ Taqman probe ควรมีค่า Tm สูงกว่า ประมาณ 10°C

7. ขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์ประมาณ 100-1000 เบส แต่ไม่ควรเกิน 150 เบส สำหรับ real-time PCR

โดยการออกแบบ primer ต้องคำนึงถึงความจำเพาะและประสิทธิภาพของ Primers เป็นสำคัญ หาก primer ไม่สามารถเพิ่มปริมาณส่วนของ DNA ที่เราสนใจ ต้องพยายามหาจุดบกพร่องและพยายามหาสภาวะที่เหมาะสมให้กับปฏิกิริยาของเรา

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

Cross-Sectional, Descriptive study

Developmental research

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

- MicroAmp PCR tube (Perkin Elemer)
- Microcentrifuge tube: 0.5 and 1.5 mL (AxyGen® Scientific)
- Polypropylene conical tube: 50 and 15 mL (AxyGen® Scientific)
- Pipette tip: 10 μ L, 200 μ l and 1000 μ l (AxyGen® Scientific)
- Glassware: Beaker, Flask, Cylinder and reagent bottles (Pyrex)
- Centrifuge (Beckman GS-6R)
- Refrigerated microcentrifuge (Universal 16R Hettich)
- -70 °C freezer (Forma Scientific)
- -20 °C freezer (Philco)
- Mastercycler personal (Eppendorf)
- UV Transilluminator (Biogeomed)
- Bio Photometer (Eppendorf)
- Class II Microbiological Safety Cabinet (Envair)
- PCR Cabinet (Augusta)
- Orbital incubator S150 (Stuart)
- Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey)
- Multi-block heater (Lab-line)
- Balance (PB1502 Mettler Toledo)
- Microwave oven (Sanyo)
- Roter Gene 3000 real-time PCR (Corbett research)

โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ลำดับ Sequences

- CLUSTAL X program (version 1.8)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1)
- Chromas Lite (version 2.01)
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 3.1)

การทำ cloning

- One Shot TOP10 Chemically Competent *E.Coli* (Invitrogen)
- pGEM-T Easy Vector System for T/A cloning strategy (Promega)
- X-Gal (Promega)
- IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendorf)
- Tryptone powder (BIO BASIC INC)
- Yeast Extract (GIBCO)
- Agar Bacteriological (GIBCO)
- FastPlasmid Mini (Eppendorf)

การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription

- Imprompt II reverse transcriptase (Promega)
- Random Primers (Promega)

การทำ PCR และ real-time PCR

- Eppendorf MasterMix (2.5X) (Eppendorf)
- SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen)
- GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas)
- Agarose, low EEO, Molecular Biology Grade (Research Organics)
- SeaKem LE agarose (BioWhittaker Molecular Applications)
- Ethidium Bromide (SIGMA)
- Primers (BioDesign)
- Probes (TIB Molbiol)

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยจาก โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเป็นตัวอย่างเก่า ซึ่งเก็บไว้ประมาณ 1 เดือนที่เหลือจากการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลรวมทั้งสิ้นอย่างน้อย 142 ตัวอย่างจากการคำนวณประชากรศึกษา แต่เนื่องจากมีตัวอย่างที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาและไวรัสแดงก็มากกว่าที่คำนวณ จึงนำมาศึกษาประมาณ 290 ตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่างที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา 39 ตัวอย่างและ ติดเชื้อแดงก็อีก 26 ตัวอย่าง แล้วเลือกตัวอย่างของไวรัสซิกุนกุนยามาประมาณ 4 ตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ complete genome นอกจากนี้ ยังมีตัวอย่างอื่นๆ ที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาหรือไวรัสแดงก็จำนวน 38 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ assay ที่พัฒนาขึ้นมา ตัวอย่างซีรัมทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการศึกษาการตรวจวินิจฉัย

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

ขนาดตัวอย่างโดยใช้อัตราการตรวจพบไวรัสซิกุนกุนยาและไวรัสแดงก็ ดังแสดงตามสูตร
สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$N = Z^2 PQ/d^2$$

โดย Z: Z ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.96

P: อัตราการตรวจพบเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา (P=0.075) และไวรัสแดงก็ (P=0.023)

Q: 1 - P

d: ค่าความคลาดเคลื่อน (d) = 5% ของอัตราการตรวจพบเชื้อไวรัส

ตัวอย่างการคำนวณเมื่ออัตราความผิดพลาดของไวรัสแดงก็ = 0.23% และไวรัสซิกุนกุนยา 0.75%

$$N_{\text{ซิกุนกุนยา}} = (1.96)^2(0.075)(0.925)/(0.05)^2$$

$$= 106.6$$

$$N_{\text{แดงก็}} = (1.96)^2(0.023)(0.977)/(0.05)^2$$

$$= 34.52$$

ดังนั้น ใช้ตัวอย่างสำหรับไวรัสซิกุนกุนยาประมาณ 107 ตัวอย่างและไวรัสแดงก็ประมาณ 35 ตัวอย่าง
รวมทั้งหมด 142 ตัวอย่าง

วิธีดำเนินงานวิจัย

การสกัด Viral RNA จาก sample โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction, RBC Bioscience

- ซีรัมจากตัวอย่างผู้ป่วย ปริมาตร 200 μ l + VB buffer ปริมาตร 400 μ l แล้วนำไป vortex
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- เติม 95% ethanol ปริมาตร 500 μ l
- แบ่ง mixture ใส่ VB column ครั้งละ 550 μ l แล้วนำไป Centrifuge ที่ 12,000xg, 2 นาที แล้วเทส่วนชั้นล่างของcolumn ทิ้ง (ทำ 2 รอบ)
- เติม W1 ปริมาตร 400 μ l แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg, 1 นาที แล้วเทสารชั้นล่างทิ้ง
- เติม R-wash ปริมาตร 600 μ l แล้ว Centrifuge ที่ 12,000xg, 1 นาที แล้วเทสารชั้นล่างทิ้ง
- Centrifuge ที่ 12,000xg 3 นาที
- ย้ายใส่ column ใหม่ แล้วเติม RNase-free water ปริมาตร 50 μ l
- ตั้งไว้ 3 นาที แล้วไป centrifuge ที่ 12,000xg, 5 นาที

การเตรียม cDNA จาก RNA เพื่อทำ PCR และเป็น plasmid control ด้วยวิธี reverse transcriptase โดยใช้สารเคมีจาก Promega, Madison, WI

- ผสม mixture [RNA (3 μ l), Random primer (1 μ l), DepC (3 μ l)]
- จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที
- แชน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
- ใส่ reverse transcription mix 7 μ l แล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- บ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Plasmid positive control (Promega, Medison, WI) โดยใช้ไวรัสซิกนุกุนยา ECSA strain และ ไวรัสแดงกีทั้ง 4 serotype

Ligation

- Ligation ระหว่าง PCR product กับ plasmid (pGEM-T) เตรียม mixture
- 2x buffer (5 μ l), T4 DNA ligase (3 weiss units/ μ l) (1 μ l), pGEM-T (1 μ l), PCR product (3 μ l)
- จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ซ้ำมคืน หรือที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Transformation

- เตรียม competent cells ปริมาตร 50 μ l
- นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้ competent cell ละลาย
- เติมสารละลาย ligation 2 μ l
- ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที
- แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
- เติม SOC medium ปริมาตร 950 μ l
- เขย่าที่ความเร็วประมาณ 200 rpm, อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
- centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือ pellet ประมาณ 45 μ l
- เติม x-gal 15 μ l และ IPGL 5 μ l
- Spread ลงบน LB agar plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน

Colony selection

- สังเกตดู colony ที่ขึ้นบน LB agar plate โดยจะเลือก colony ที่มีสีขาว
- เลือก colony สีขาวใส่ลงใน LB broth เขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์

Plasmid extraction

- นำแบคทีเรียจาก LB broth 1.5 ml มาใส่ลงในหลอด 2 ml
- นำหลอดปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีแล้ว เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือ pellet
- เติม lysis solution (แช่เย็น) ปริมาตร 400 μ l แล้วนำไป Vortex 30 วินาที
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
- นำสารละลาย lysate ลงใน spin column
- นำ spin column ไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- เติม diluted wash buffer ปริมาตร 400 μ l
- นำ spin column ไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- เทส่วน filtrate ทิ้ง และนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- จากนั้นนำ spin column ลงใน collection tube
- เติม elution buffer ปริมาตร 50 μ l
- ปั่นที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
- ได้สารละลาย positive control ที่มีปริมาตร 50 μ l

คำนวณค่าการดูดกลืนแสง เพื่อหาความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของ RNA, cDNA

หาความบริสุทธิ์โดยวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเทคนิค Spectrophotometry เทียบกับ การดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 280 nm จากความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0

$$\text{RNA Purity} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

กำหนดให้ A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ RNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm

A_{280} = ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm

คำนวณหาความเข้มข้นของ RNA, cDNA มาตรฐานในหน่วย $\mu\text{g/ml}$ โดยเครื่อง BioPhotometer, Eppendorf แล้วคำนวณความเข้มข้น ดังนี้

คำนวณความเข้มข้นของ RNA ในหน่วย Copy/ μl

$$[\text{RNA}] \text{ Copy/ } \mu\text{l} = \frac{[\text{RNA}] \text{ (g/ } \mu\text{l)} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Length of RNA (nt)} \times 340}$$

คำนวณความเข้มข้นของ cDNA ในหน่วย Copy/ μl

$$[\text{cDNA}] \text{ Copy/ } \mu\text{l} = \frac{[\text{cDNA}] \text{ (g/ } \mu\text{l)} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Length of cDNA (nt)} \times 660}$$

การทำ Serial dilution เพื่อกำหนดความเข้มข้นของ template

นำ cDNA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาปรับให้มีความเข้มข้นระหว่าง $10^1 - 10^7$ Copies/ μl โดยการทำให้ serial dilution โดยกำหนดให้ dilution factor เท่ากับ 10 แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาใช้เป็น template ในการทำ real time PCR โดยค่า limit of detection คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจได้

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยา

fragment	Product size (bp)	gene	primer	Position*	Sequence (5'-3')	T _m (°C)
1	853	5'NC	18F	18	CACGTAGCCTACCAGTTTCTTA	53.0
		nsP1	871R	871	ATGGAACACCGATGGTAGGTG	54.4
2	819	nsP1	616F	616	AACCCCGTTCATGTACAATGC	52.4
		nsP1	1435R	1435	CGGTACCACAAAGCTGTCAAAC	54.8
3	813	nsP1	1317F	1317	CACTGACCTGCTGCTGTCTATG	56.7
		nsP2	2130R	2130	AGTCCTGCAGCTTCTTCCTTC	54.4
4	815	nsP1	1412F	1412	CGAGTTTGACAGCTTTGTGGTA	53.0
		nsP2	2227R	2227	ATGACTGCAATTTTGTATGGGC	51.1
5	801	nsP2	1908F	1908	CAATCTCGCCTGAAGACTTCC	54.4
		nsP2	2709R	2709	TCCACTACAATCGGCTTGTTG	52.4
6	813	nsP2	2530F	2530	GTGCGGCTTCTTCAATATGATG	53.0
		nsP2	3343R	3343	TCCAGGCCTATTATCCCAGTG	54.4

fragment	Product size (bp)	gene	primer	Position*	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
7	927	nsP2	2577F	2577	AACATCTGCACCCAAGTGTACC	54.8
		nsP2	3504R	3504	GTCTCCTGTTGGCCGGTATAAT	54.8
8	802	nsP2	3332F	3332	TAATAGGCTGGAGGGAAGATG	54.8
		nsP3	4134R	4134	CTACGCACTCTTCATCGTTCTT	53.0
9	840	nsP2	3885F	3885	GAACGAGTCATCTGCGTATTGG	54.8
		nsP3	4725R	4725	ATATCTCTGCCATATCCACTGC	53.0
10	1416	nsP3	4458F	4458	TCTTTACAGCCATGGACTCGAC	54.8
		nsP4	5874R	5874	TCTACTTTGCGGACTGATACC	54.8
11	750	nsP4	5630F	5630	ACGGACGACGAGTTACGACTAG	56.7
		nsP4	6380R	6380	CCCAGTATTCTTGGTTGCATG	52.4
12	752	nsP4	6184F	6184	AAAACAGCACGCTTACCACG	51.8
		nsP4	6936R	6936	AACTTGAAGCGCGTACCTGTC	54.4
13	763	nsP4	6732F	6732	TCATAGCCGCACACTTTAAGC	52.4
		nsP4	7495R	7495	AGGACCGCCGTACAAAGTTAC	54.4
14	756	nSP4	7278F	7278	GCAGGTGACGAACAAGATGAG	54.4
		C	8034R	8034	CCGCTTAAAGGCCAATTTG	48.9
15	760	C	7910F	7910	TCGAAGTCAAGCACGAAGG	51.1
		E2	8670R	8670	GTCTGTCGCTTCATTTCTGATG	53
16	781	E3	8459F	8459	TGCTTGAGGACAACGTCATGAG	54.8
		E2	9240R	9240	TTTGTGATTGGTGACCGCG	51.1
17	768	E2	9093F	9093	AGTCCGGCAACGTAAAGATCAC	54.8
		6K	9861R	9861	AAAGTTGCTGCTCGTCCAC	54.4
18	755	E2	9648F	9648	AGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTC	56.7
		E1	10403R	10403	TAAAGGACGCGGAGCTTAGCTG	56.7
19	1013	E1	10145F	10145	ACAAAACCGTCATCCCGTCTC	54.4
		E1	11158R	11158	TGACTATGTGGTCCTTCGGAGG	56.7
20	843	E1	10959F	10959	CAGCAAGAAAGGCAAGTGTGC	54.4
		3'NC	11802R	11802	CTCCTACGTCCTGTGGG	54.9

Primers ที่ใช้สำหรับส่วนที่ 1-19 และ forward primer ของส่วนที่ 20 มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (44) และ reverse primer ของส่วนที่ 20 ถูกออกแบบใหม่โดยอิงจาก accession NO. NC_004162

ตารางที่ 3 accession number, สถานที่, ปี ค.ศ. สำหรับไวรัสชิคุนกุนยา

	Accession number	สถานที่, ปี ค.ศ.
CHIKV	FJ807891	อินโดนีเซีย, 2008
	EU703762	มาเลเซีย, 2006
	AF192898	N/A
	GU301779	ไทย, 2009
	GU301780	ไทย, 2008
	GU301781	ไทย, 2009
	FJ807893	มาเลเซีย, 2008
	FJ445511	สิงคโปร์, 2008
	AM258994	รียูเนียน, 2006
	FJ513655	ศรีลังกา, 2008
	EU244823	อิตาลี, 2007
	FJ445492	สิงคโปร์, 2008
	FJ807896	สิงคโปร์, 2006
	NC004162	Prototype
AF192907	N/A	

ตารางที่ 4 accession number, สถานที่, ปี ค.ศ. สำหรับไวรัสเดงกี

	Accession number	สถานที่, ปี ค.ศ.
DENV	HQ166035	แม็กซิโก, 2007
	GQ398255	สิงคโปร์, 2008
	GQ398265	สิงคโปร์, 2008
	GQ398266	สิงคโปร์, 2007
	FJ744718	ไทย, 2001
	FJ744719	ไทย, 2001
	GQ398257	อินโดนีเซีย, 1977
	FJ744740	ไทย, 2001
	FJ744734	ไทย, 2001
	AY618993	ไทย, 2000
	AY618992	ไทย, 2001

การทำ PCR สำหรับการตรวจหาไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- นำ cDNA ที่จากซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าจะติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาหรือไวรัสเดงกีมาตรวจสอบโดยวิธีเพิ่มปริมาณ โดยวิธี PCR และ semi-nested PCR โดยการตรวจหาไวรัสชิคุนกุนยา (42) และสำหรับไวรัสเดงกี (43)ตามลำดับ
- เมื่อได้ PCR product แล้ว นำมาตรวจสอบและแยกขนาดของ band โดยวิธี gel electrophoresis ใน 2% agarose gel และใช้ 100 bp ladder เป็นตัวบอกขนาดของ PCR product
- ตัด gel โดยเลือกตัดในบริเวณที่มีแถบ PCR product ขนาดที่ต้องการ ดังนี้
- สกัด PCR product จาก gel ที่ตัดออกมาด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Bioscience)
- หาลำดับเบสโดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD

การทำ phylogenetic analysis และวิเคราะห์ sequence เทียบกับฐานข้อมูล

- การวิเคราะห์นี้ใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor และ Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 3.1
- วิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี BLAST search (Basic Local Alignment Search Tool) จากฐานข้อมูลใน NCBI แก่ลำดับ sequence และนำมาต่อสายกันด้วยโปรแกรม CHROMASLITE (v.2.0) และ SeqMan (DNASTAR, Madison, Wisconsin) ตามลำดับ
- โดยในการศึกษานี้กำหนดให้ใช้ค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ วิธีแบบ Neighbor-joining, Model แบบ Nucleotide: Maximum Composite Likelihood และค่า bootstrapping เท่ากับ 1,000

การทำ Multiplex real-time PCR

ทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของแต่ละปฏิกิริยาทั้งสำหรับไวรัสชิคุนกุนยา และไวรัสแดงกีโดยปรับ ความเข้มข้นของ Primer ให้อยู่ในช่วง 0.2-0.8 μM , ความเข้มข้นของ probe ให้อยู่ในช่วง 0.2-0.5 μM และ ความเข้มข้นของ Mg ให้อยู่ในช่วง 0-5 mM จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง real-time PCR Corbett Research Rotor-Gene 3000 ในปริมาณทั้งหมด 10 μl โดยตั้งโปรแกรม denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตามด้วย 40 รอบของขั้น annealing และ extension โดยปรับอุณหภูมิในขั้น annealing ให้อยู่ระหว่าง 50°C และ 65°C โดยหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด แล้วนำปฏิกิริยาทั้งของไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสแดงกีมารวมทำปฏิกิริยากัน

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจากข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสชิคุนกุนยา ว่ามีความเหมือน หรือ แตกต่างจากที่ระบาดในประเทศเพื่อนบ้านหรืออย่างไร และสามารถนำมาออกแบบ primer และ probe ได้

วิเคราะห์ผลจากการทำ Multiplex real time RT-PCR จากการใช้ primers และ probe ของแต่ละไวรัส ว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดเดียวกันได้หรือไม่ เพื่อให้ได้ primers และ probe ที่เหมาะสมต่อการตรวจเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด อย่างมีประสิทธิภาพ

เปรียบเทียบความสามารถของการตรวจด้วยวิธี Multiplex real time RT-PCR กับวิธีอื่นๆ ว่ามีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) อย่างไร ดีกว่า วิธีอื่นๆหรือไม่ อย่างไร โดยอาศัยการคำนวณดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงการเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา

		วิธีการมาตรฐาน (PCR, Gold Standard)		Total
		ผลบวก (positive)	ผลลบ (negative)	
วิธีการที่ พัฒนาขึ้นมา (multiplex real- time PCR)	ผลบวก (positive)	TP	FP	TP+FP
	ผลลบ (negative)	FN	TN	FN+TN
Total		TP+FN	FP+TN	TP+FP+FN+TN

โดยคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

$$\text{ความไว (Sensitivity)} = TP / (TP+FN)$$

$$\text{ความจำเพาะ (Specificity)} = TN / (FP+TN)$$

$$\text{ความถูกต้อง (Accuracy)} = (TP+TN) / (TP+FP+FN+TN)$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

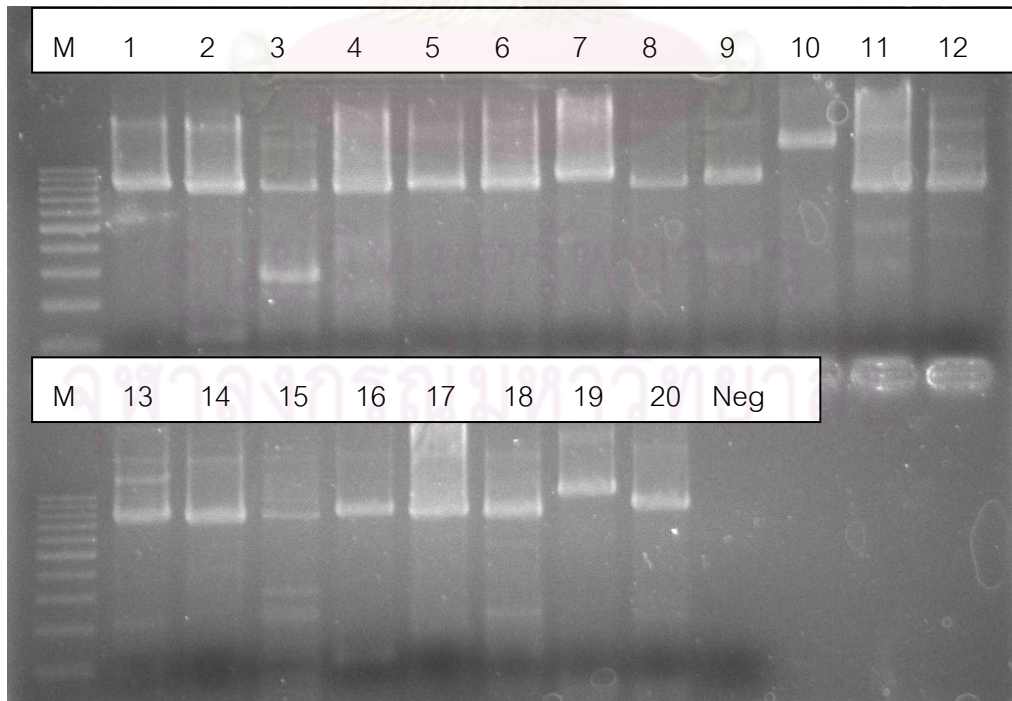
ผลการทดลองจากการทำ PCR เพื่อหา complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยา

เมื่อตรวจตัวอย่างที่สงสัยว่าน่าจะติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาแล้ว สุ่มเลือกตัวอย่างที่ต่างเวลา และต่างสถานที่กัน เพื่อทำ complete genome และตัวอย่างที่นำมาทำ complete genome ต้องมีปริมาณมากพอด้วย โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ข้อมูลตัวอย่างที่นำมาทำ complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยา

Sample code	วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	GenBank Accession#	ชนิดของตัวอย่าง
CU-Chik661	25 พค. 2009	นราธิวาส	GQ905863	Serum
CU-Ckik009*	4 กย. 2009	กรุงเทพ	GU301779	Serum
CU-Ckik10	21 ตค. 2008	นราธิวาส	GU301780	Serum
CU-Chik683	27 กค. 2009	นราธิวาส	GU301781	Culture isolate

*เป็นคนที่ใช้ที่เดินทางกลับมาจากทางภาคใต้ของไทย



รูปที่ 10 แสดงผลการแยก PCR product บน agarose gel
ตัวเลขที่แสดงคือแต่ละ fragment ซึ่งแต่ละ fragment ใช้ primer ดังตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์ Complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยา

เมื่อได้ผลลำดับ Sequence ของไวรัสชิคุนกุนยาทั้ง 4 ตัวอย่างจึงนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างไวรัสชิคุนกุนยาแรกทีพบ (S27) และตัวอื่นๆ ทีพบเมื่อเร็วๆนี้ ทั้งจากประเทศมาเลเซียพบว่า Sequence ของไวรัสชิคุนกุนยาทั้ง 4 ตัวมีความใกล้เคียงกันมากถึง 99.79-99.89% เมื่อเทียบกับตัวต้นแบบ (Prototype) ความใกล้เคียงกัน 97.0% และเมื่อเทียบกับตัวอย่างทีพบทีประเทศมาเลเซียมีความใกล้เคียงกันประมาณ 99.83% โดยมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนต่างๆทีมีการเปลี่ยนแปลงไปทั้งในส่วนทีถอดรหัสให้โปรตีนโครงสร้าง ได้แก่ ในช่วง C protein ได้แก่ P23S, V27I และK63R, ในช่วง E3protein ได้แก่ I24T, ในช่วง E2 protein ได้แก่ G57K, I74M, G79E, N160T, A164T, L181M, S194G, I211T, K252Q, M267R, S299M, T312M, A344T, S375T, และ V386A ในช่วง 6K protein ได้แก่ V8I และ I54V ในช่วง E1protein ได้แก่ A226V, M269V, D284E, และ V322A และในส่วนทีถอดรหัสโปรตีนในส่วนทีไม่ใช่โครงสร้าง ได้แก่ ในช่วง nsP1 protein ได้แก่ T128K, L172V, E234K, T376M, M383L, I384L, T481I, Q488R, และL507R ในช่วง nsP2 protein ได้แก่ S54N, H374Y, C582Y, S582N, L539S และ A793V ในช่วง nsP3 V175I, Y217H, P326S, V331A, T337I, K352E, I376T, A382T, L461P, S462N, และ P471S ในช่วง nsP4 ได้แก่ T75A, T254A, Q500L, I514T, V555I, และ V604I แต่การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ยังพบใน strain อื่นๆทีพบมาก่อนหน้านี้เช่นกัน (44) นอกจากนี้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตัวทีไม่ได้พบในไวรัสชิคุนกุนยาอื่นๆดังแสดงในตารางที 7

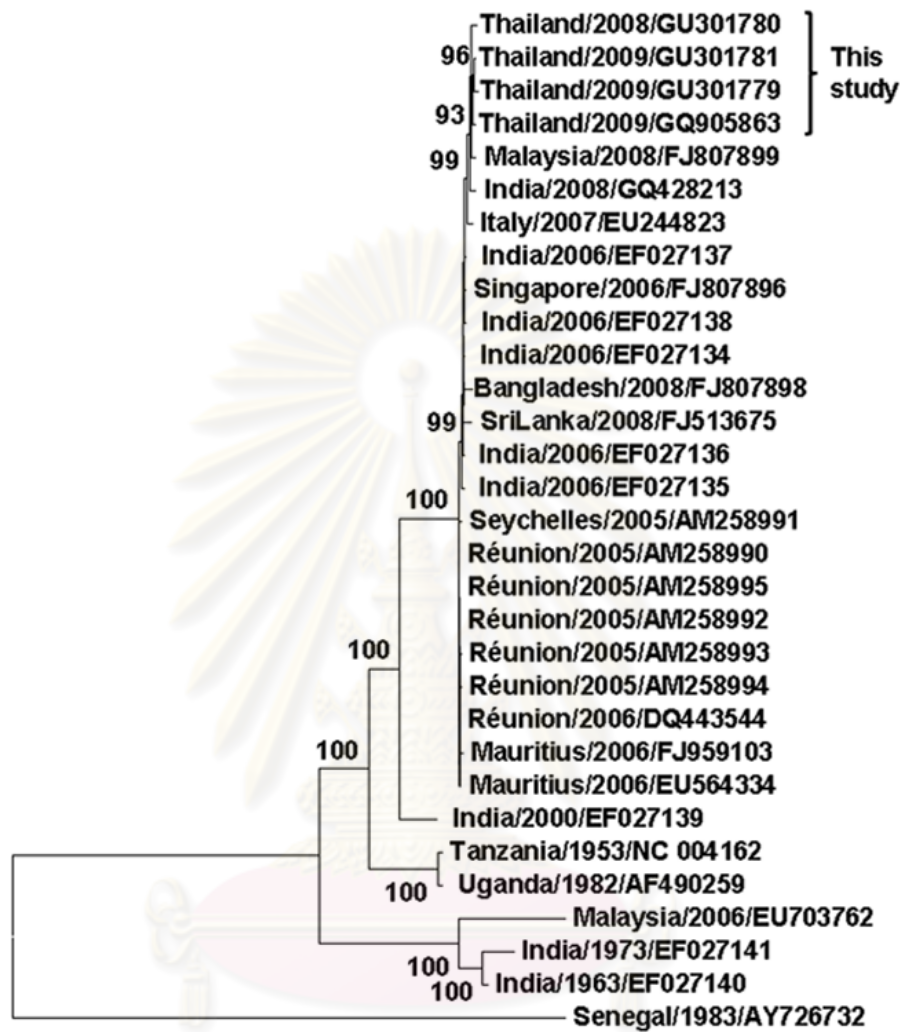
ในบริเวณทีไม่ถอดรหัสเป็นโปรตีน(3'UTR และ 5'UTR) ก็มีการเปลี่ยนแปลง พบว่า CU-Chik10 มีการเปลี่ยนแปลง T->A ทีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที 64 ทีบริเวณ 5'UTR ส่วนบริเวณ 3'UTR มีการหายไปของ A ทั้งสิ้น 19 ตัวทีตำแหน่ง 11,369-11,342 เมื่อเทียบกับ S27 แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ยังพบในไวรัสชิคุนกุนยาตัวอื่นๆทีพบเมื่อเร็วๆนี้ทีประเทศมาเลเซีย แสดงว่ามีความเหมือนกันของไวรัสซึ่งอาจจะเป็นแหล่งทีมาหรือการระบาดมาจากทีใดทีหนึ่ง

ตารางที่ 7 กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชิคุนคุนยาตัวแรก

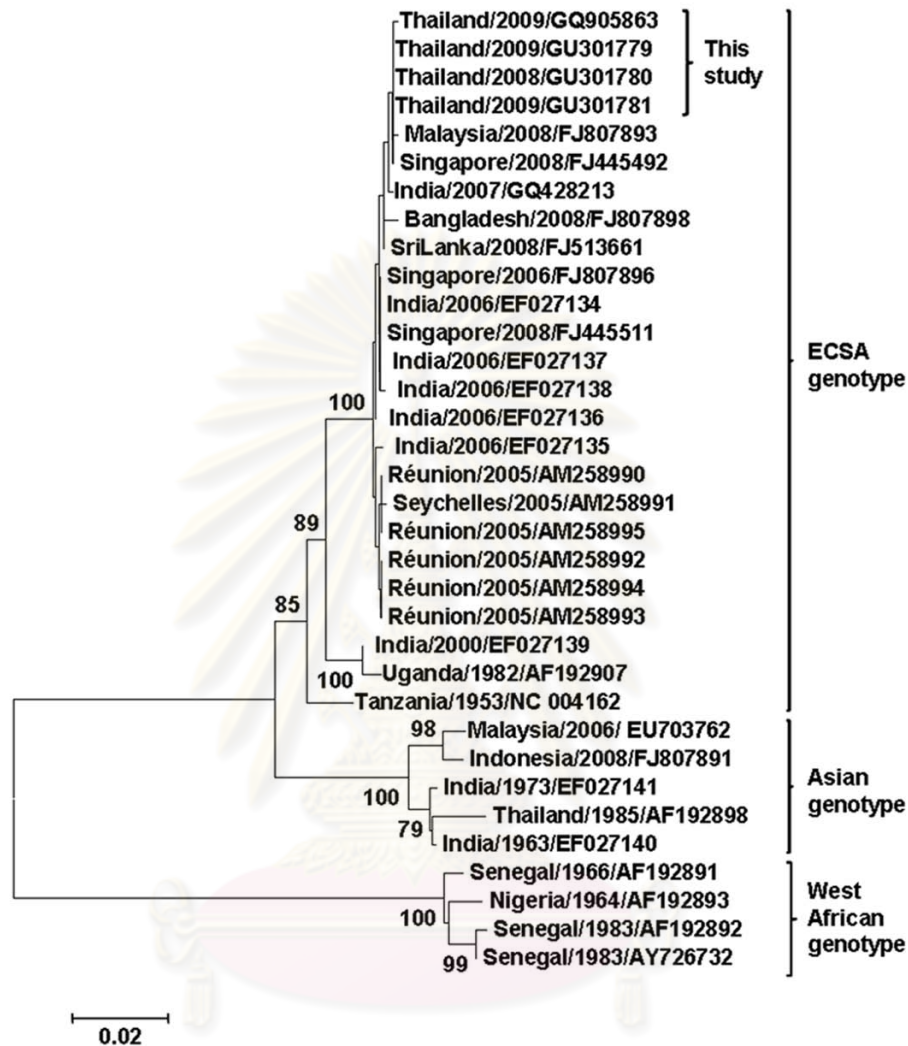
region	Polypeptide position	Protein position	S27	CU-Chik661	CU-Chik009	CU-Chik10	CU-Chik683
nsP1	29	29	P	.	.	S	.
	186	186	N	.	.	D	.
nsP2	614	79	P	.	.	S	.
nsP3	1671	338	T	.	.	M	.
nsP4	1950	87	Y	H	.	.	.
	2458	595	N	.	.	K	.
	2463	600	R	.	.	I	.
	2468	605	T	.	.	S	.
	2469	606	L	.	.	M	.
E3	290	30	K	.	R	.	.
E2	409	84	F	.	L	.	.
	632	307	Q	.	R	.	.

*ตัวอักษรที่แสดงในตารางคือกรดอะมิโนดังนี้ P=Proline, S=Serine, N=Asparagine, D=Aspartic acid, T=Threonine, M= Methionine, Y=Tyrosine, H=Histidine, K= Lysine, R= Arginine, I= Isoleucine, L= Lwucine, F= Phenylalanine, Q= Glutamine

นอกจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปของไวรัสชิคุนคุนยาแล้ว ยังทำการตรวจสอบวิเคราะห์ทาง phylogenetic ด้วย ซึ่งเป็นการหาว่ามีความเหมือนหรือใกล้เคียงกับไวรัส strain อื่นๆ อย่างไร โดยเปรียบเทียบทั้งแบบ complete genome (รูปที่ 11) และแบบเฉพาะบางส่วนของ E1 gene (รูปที่ 12) เนื่องจากการจำแนกสายสายพันธุ์ของไวรัสชิคุนคุนยา อาศัยความใกล้เคียงกัน E1 gene เป็นสำคัญ โดยจะเห็นว่าไวรัสชิคุนคุนยาในการศึกษานี้มีความใกล้เคียงกับไวรัสชิคุนคุนยาที่พบที่ประเทศมาเลเซีย(FJ807899)มากที่สุด



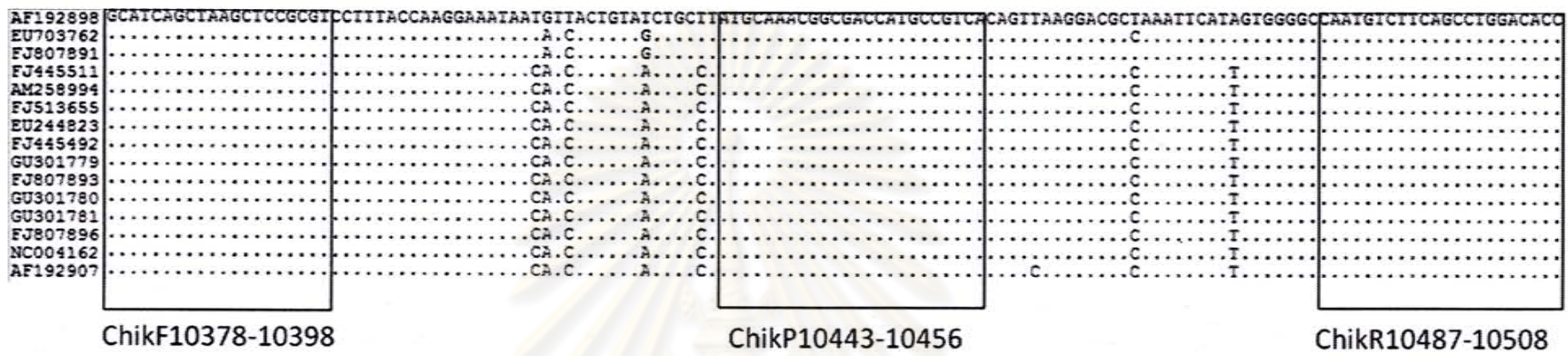
รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ทาง phylogenetic เมื่อเปรียบเทียบ complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยาตัวอื่นๆ



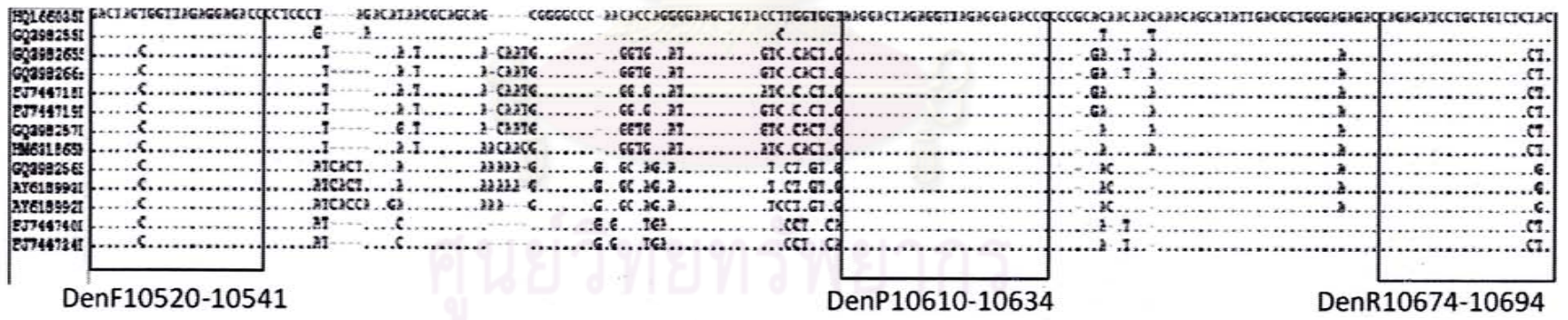
รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ทาง phylogenetic เมื่อเปรียบเทียบ E1 gene ของไวรัสชิคุนกุนยา

ผลการออกแบบ Primer และ probe

เมื่อวิเคราะห์ Complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยาโดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษานี้ และไวรัสเดงกีจากฐานข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 พบว่ามีส่วนที่มีความเหมือนกันระหว่างไวรัสแต่ละตัว จึงได้เลือกช่วงที่ออกแบบ primer และ probe ดังที่แสดงในตารางที่ 8 โดยมีช่วงที่เหมือนกันดังแสดงในรูปที่ 13 สำหรับไวรัสชิคุนกุนยา และรูปที่ 14 สำหรับไวรัสเดงกี



รูปที่ 13 แสดง alignment ของไวรัสชิคุนกุนยาและลำดับ oligonucleotide ที่ใช้ออกแบบ primer และ probe



รูปที่ 14 แสดง alignment ของไวรัสเดงกีและลำดับ oligonucleotide ที่ใช้ออกแบบ primer และ probe

ตารางที่ 8 primer, probe, ช่วงและตำแหน่งที่เลือกใช้ในการออกแบบ

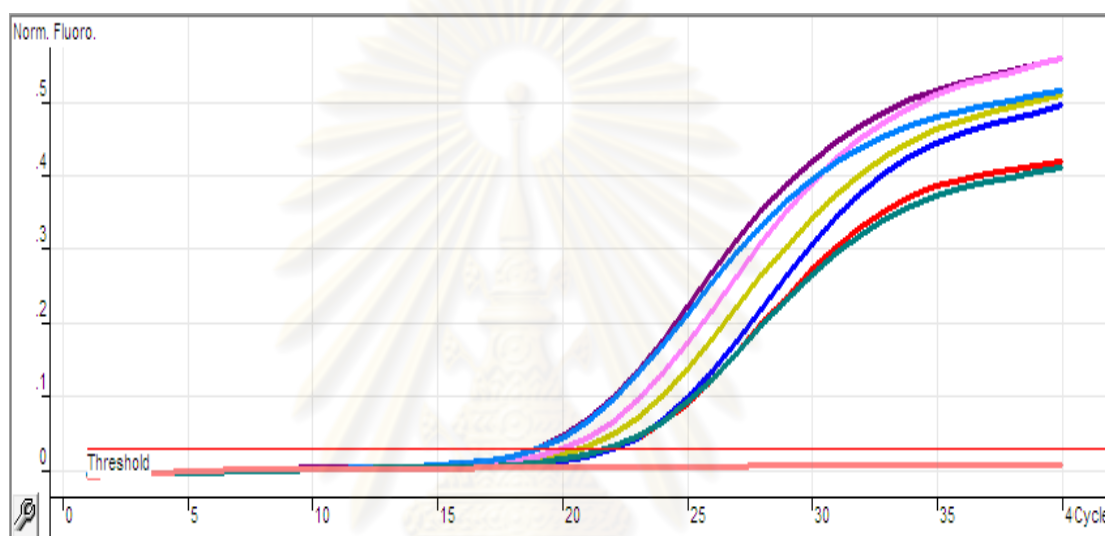
ไวรัส	Probe/primer	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	PCR product size (bp)	ตำแหน่ง*
CHIKV	ChikF10378-10398	GCATCAGCTAAGCTCCGGGTC	58.3	130	10378-10398
	ChikR10487-10508	CAATGTCTTCAGCCTGGACACC	56.7		10487-10508
	ChikP10443-10456	Cy5-ATGCAAACGGCGACCATGCCGTCA-BBQ	60.8		10433-10456
DENV	DenF10520-10541	GACTAGYGGTTAGAGGAGACC	56.3	174	10520-10541
	DenR10674-10694	GHRGAGACAGCAGGATCTCTG	58.3		10674-10694
	DenP10610-10634	JOE-AAGGACTAGMGGTTAGWGGAGACCC-BBQ	61.0		10610-10634

*ตำแหน่งที่ออกแบบอยู่ในช่วง E1 สำหรับไวรัสชิคุนกุนยาเมื่อเทียบกับ accession number NC_004162 และช่วง 3'UTR สำหรับไวรัสเดงกีเมื่อเทียบกับ accession number AF489932

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะและความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ทำ Real-time PCR

เมื่อทำการปรับความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ทำปฏิกิริยาแล้ว พบว่า ปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาเมื่อปริมาตรสุดท้ายคือ 10 μ l ดังตารางที่ 9 โดยการปรับความเข้มข้นของ primer และ probe ดังรูปที่ 15 และ 17 ตามลำดับ และค่า Ct ที่แสดง แต่ละสีแสดงในรูปที่ 16 และ 18 ตามลำดับ สำหรับไวรัสชิคุนกุนยา และสำหรับไวรัสแดงก็ดังรูป 19-22

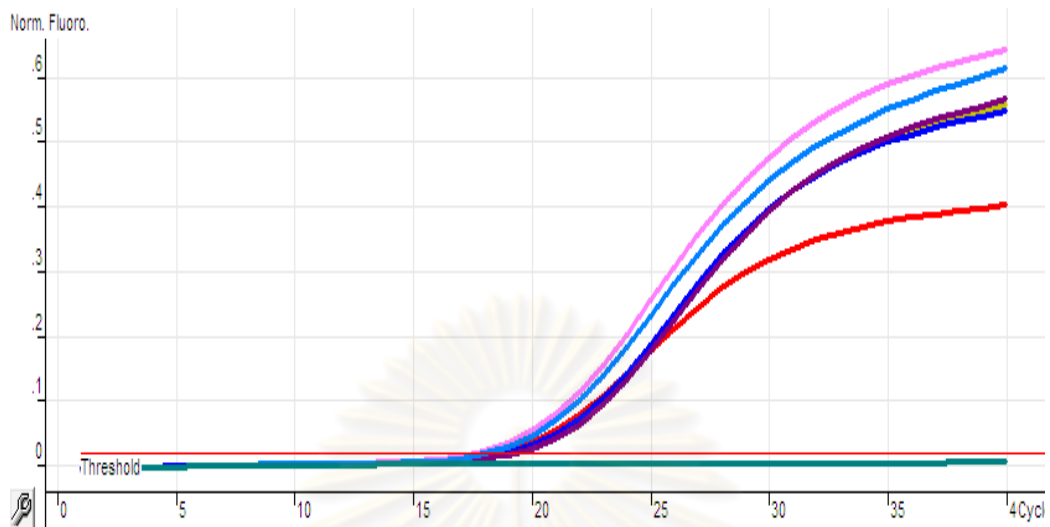


รูปที่ 15 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ primer ต่างๆของไวรัสชิคุนกุนยา

No.	C	Name	Ct
1	Red	pm0.2	22.22
2	Yellow	pm0.25	21.05
3	Blue	pm0.4	22.21
4	Purple	pm0.5	19.21
5	Pink	pm0.6	20.21
6	Cyan	pm0.8	19.23
7	Green	pm0.2mg0.5	22.02
8	Red	Negative	

รูปที่ 16 แสดงค่า Ct ของแต่ละความเข้มข้นของ primer ของไวรัสชิคุนกุนยาเมื่อเทียบกับแต่ละสี

*pm แสดงความเข้มข้นของ primer (μ M)

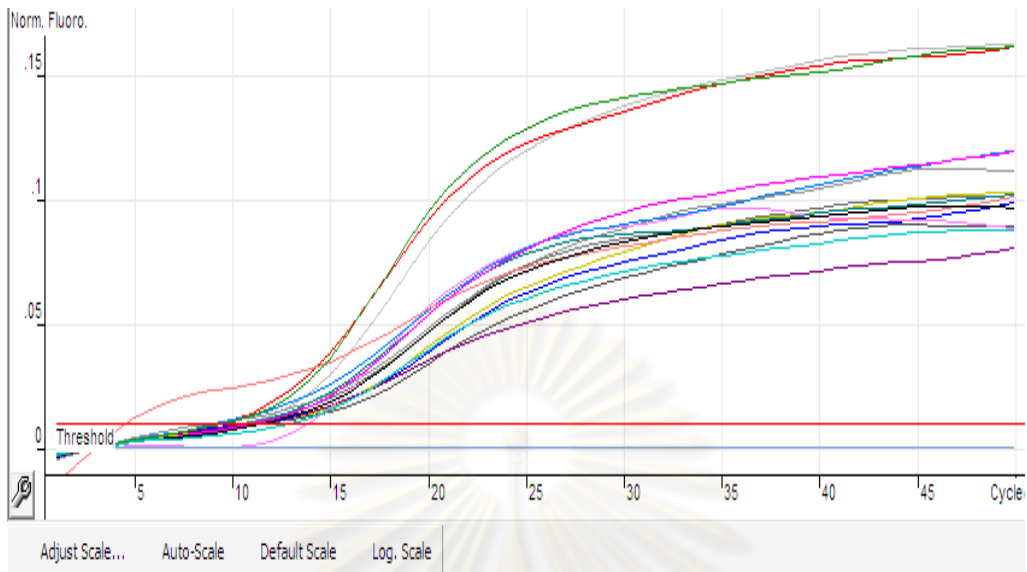


รูปที่ 17 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ probe ต่างๆของไวรัสชิคุนกุนยา

No.	C	Name	Ct
1	Red	probe0.1	18.80
2	Yellow-green	probe0.2	19.48
3	Blue	probe0.25	19.27
4	Purple	probe0.3	19.58
5	Pink	probe0.4	17.99
6	Light blue	probe0.5	18.41
7	Dark green	Negative	

รูปที่ 18 แสดงค่า Ct ของแต่ละปริมาตรของ probe ของไวรัสชิคุนกุนยาเมื่อเทียบกับแต่ละสี

*probe แสดงปริมาตรของ probe (μM)

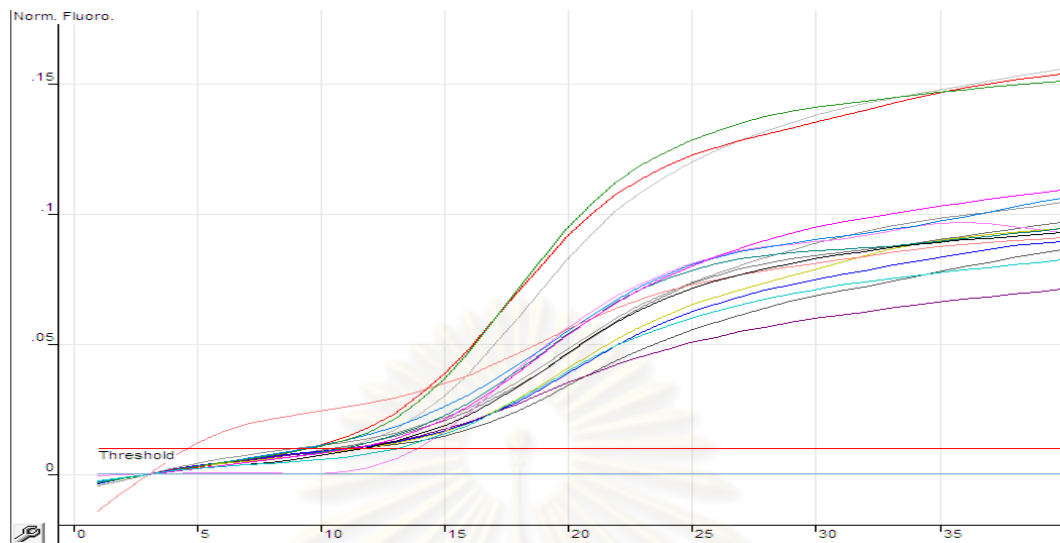


รูปที่ 19 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ primer ต่างๆของไวรัสแดงกี

No.	C	Name	Ct
1		Den1_0.25	10.79
2		Den2_0.25	9.11
3		Den3_0.25	10.71
4		Den4_0.25	11.86
5		Den1_0.3	9.61
6		Den2_0.3	11.86
7		Den3_0.3	11.29
8		Den4_0.3	11.25
9		Den1_0.4	13.99
10		Den2_0.4	9.45
11		Den3_0.4	10.99
12		Den4_0.4	4.67
13		Den1_0.6	9.76
14		Den2_0.6	11.34
15		Den3_0.6	11.78
16		Den4_0.6	13.17
17		Neg_0.25	
18		Neg_0.3	
19		Neg_0.4	
20		Neg_0.6	

รูปที่ 20 แสดงค่า Ct ของแต่ละความเข้มข้นของ primer ของไวรัสแดงกีแต่ละ serotype เมื่อเทียบกับแต่ละสี

*Den แสดงแต่ละ serotype แสดงความเข้มข้นของ primer (μM)



รูปที่ 21 แสดงกราฟของ real-time PCR เมื่อเทียบความเข้มข้นของ probe ต่างๆ ของไวรัสเดงกี

No.	C	Name	Ct
1		Den1_Probe0.4	10.79
2		Den2_Probe0.4	9.11
3		Den3_Probe0.4	10.71
4		Den4_Probe0.4	11.86
5		Den1_Probe0.5	9.61
6		Den2_Probe0.5	11.86
7		Den3_Probe0.5	11.29
8		Den4_Probe0.5	11.25
9		Den1_Probe0.6	13.99
10		Den2_Probe0.6	9.45
11		Den3_Probe0.6	10.99
12		Den4_Probe0.6	4.67
13		Den1_Probe0.8	9.76
14		Den2_Probe0.8	11.34
15		Den3_Probe0.8	11.78
16		Den4_Probe0.8	13.17
17		Probe0.4_Neg	
18		Probe0.5_Neg	
19		Probe0.6_Neg	
20		Probe0.8_Neg	

รูปที่ 22 แสดงค่า Ct ของแต่ละความเข้มข้นของ probe ที่ปริมาตรของไวรัสเดงกีที่ต่างกันของแต่ละ serotype เมื่อเทียบกับแต่ละสี

*Den แสดงแต่ละ serotype แสดงปริมาตรของ probe (μ l)

ตารางที่ 9 แสดงความปริมาตรและความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

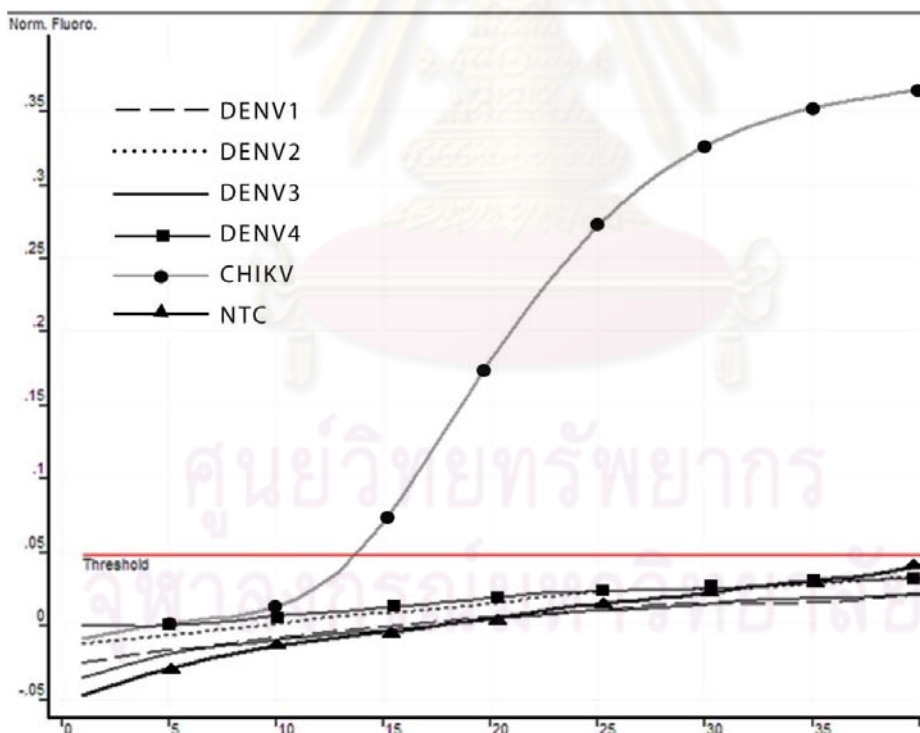
สาร	ปริมาตร/ความเข้มข้น
2X reaction mix	5 μ l
SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	0.2 μ l
ChikF10378-10398	0.5 μ M
ChikR10487-10508	0.5 μ M
ChikP10443-10456	0.2 μ M
DenF10520-10541	0.25 μ M
DenR10674-10694	0.25 μ M
DenP10610-10634	0.125 μ M
MgSO ₄	1.25 mM
distilled water	1.4 μ l
template	1 μ l
total	10 μ l

จากการปรับหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR พบว่าสามารถทำได้ดีที่อุณหภูมิ 72°C ดังตารางที่ 9 โดยแจกแจงแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาและเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงด้วย ซึ่งการตรวจจัสัญญาณของ probe ตรวจที่ขั้นตอนหลังจาก extension ที่ 72°C ในทุกรอบของปฏิกิริยา

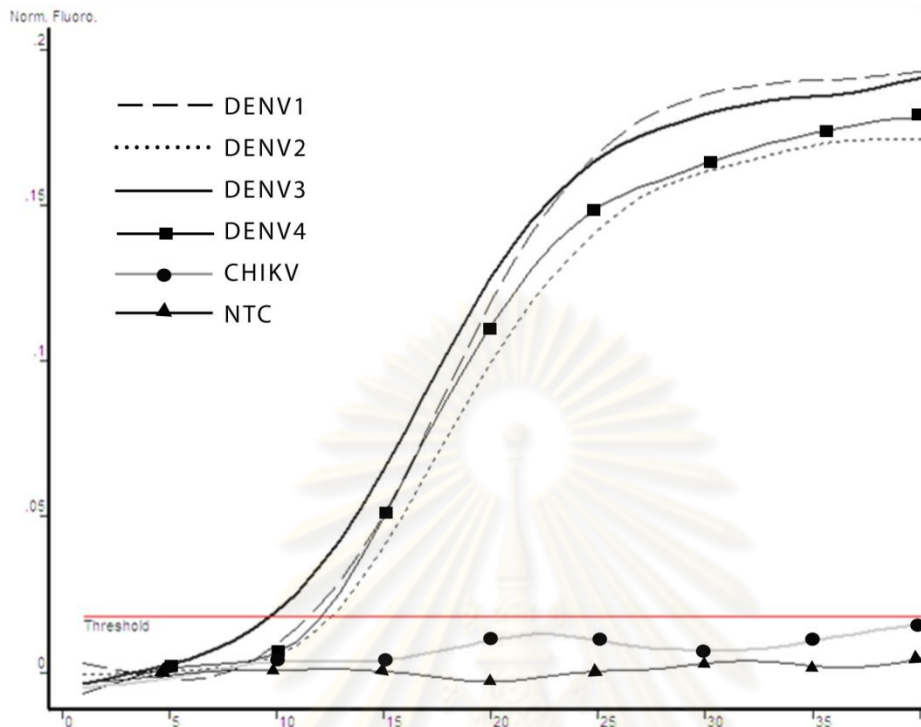
ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
pre-denaturation	95°C	2 นาที
denaturation	95°C	15 วินาที
annealing	55°C	10 วินาที
Second annealing	60°C	10 วินาที
Extension	72°C	20 วินาที

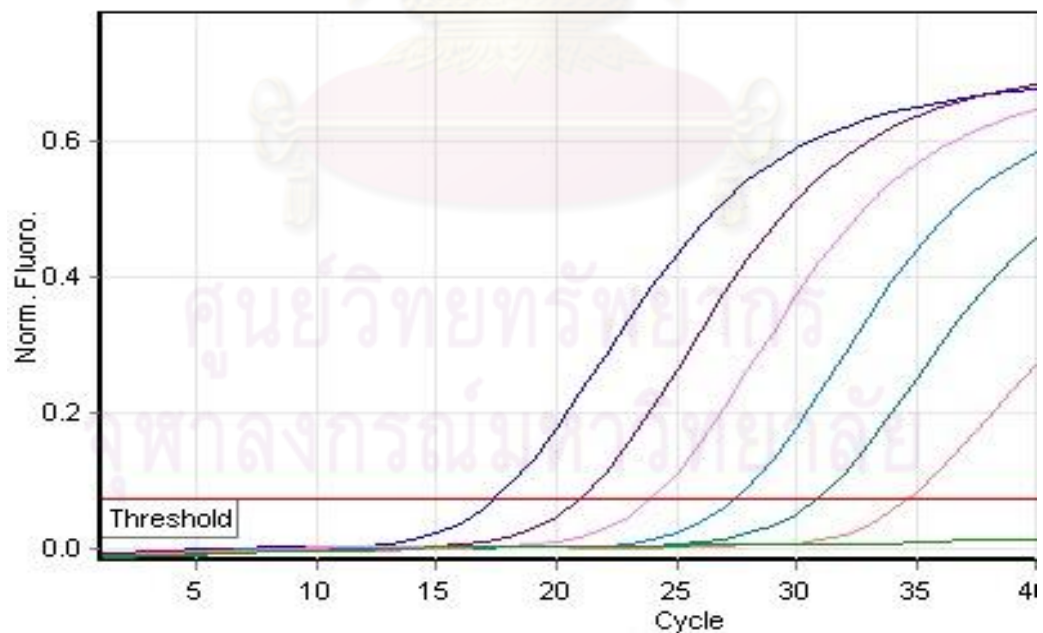
เมื่อทดสอบการเพิ่มปริมาณโดยวิธีการ Multiplex real-time PCR และดูสัญญาณของ probe ในช่องสัญญาณต่างๆ โดยของไวรัสชิคุนกุนยา ตรวจที่ช่องสัญญาณ Cy5 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ template ได้จริง และไม่เกิดการเพิ่มปริมาณของไวรัสแดงก็ดังแสดงในรูปที่ 22 เช่นเดียวกับเมื่อตรวจสอบที่ช่องสัญญาณ JOE พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไวรัสแดงก็ได้ทั้ง 4 serotype และไม่สามารถเพิ่มปริมาณของไวรัสชิคุนกุนยาดังแสดงในรูปที่ 23 โดยปฏิกิริยาที่ไม่มี Template ไม่แสดงสัญญาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อดูจากช่องสัญญาณ Cy5 และ JOE นอกจากนี้ปฏิกิริยาทั้งสองไม่เกิดการเพิ่มปริมาณที่ข้ามไวรัสกันแล้ว ยังตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้พบว่าสามารถตรวจหาได้ที่ปริมาณ template เข้มข้นต่ำถึง 10 copies/ μ l ดังแสดงในรูปที่ 24 สำหรับไวรัสชิคุนกุนยา และรูปที่ 25 สำหรับไวรัสแดงก็ โดยแสดงค่าทางสถิติ (R^2) ที่มีความน่าเชื่อถือ โดยกราฟของไวรัสชิคุนกุนยามีค่า $R^2 = 0.9941$ และของไวรัสแดงก็มีค่า $R^2 = 0.9993$



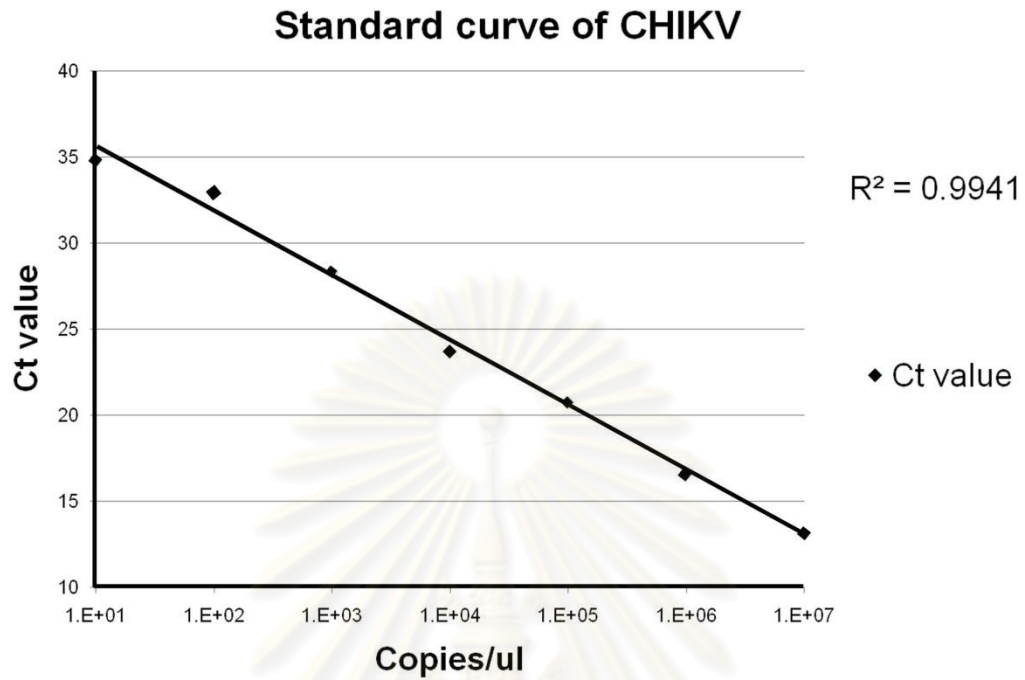
รูปที่ 23 ภาพสัญญาณของช่อง Cy5 แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของไวรัสชิคุนกุนยา



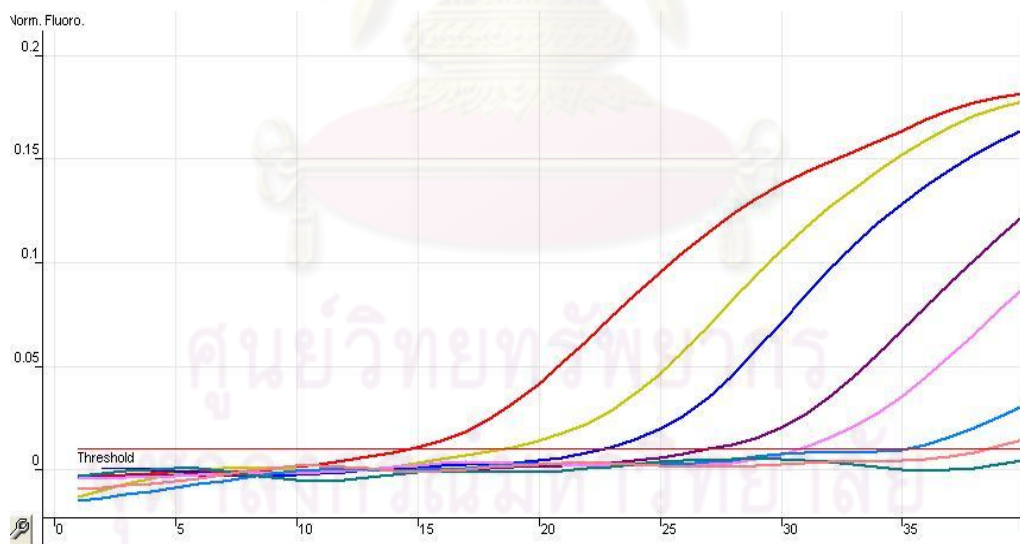
รูปที่ 24 ภาพสัญญาณของช่อง JOE แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณของไวรัสเดงกีทั้ง 4 serotype



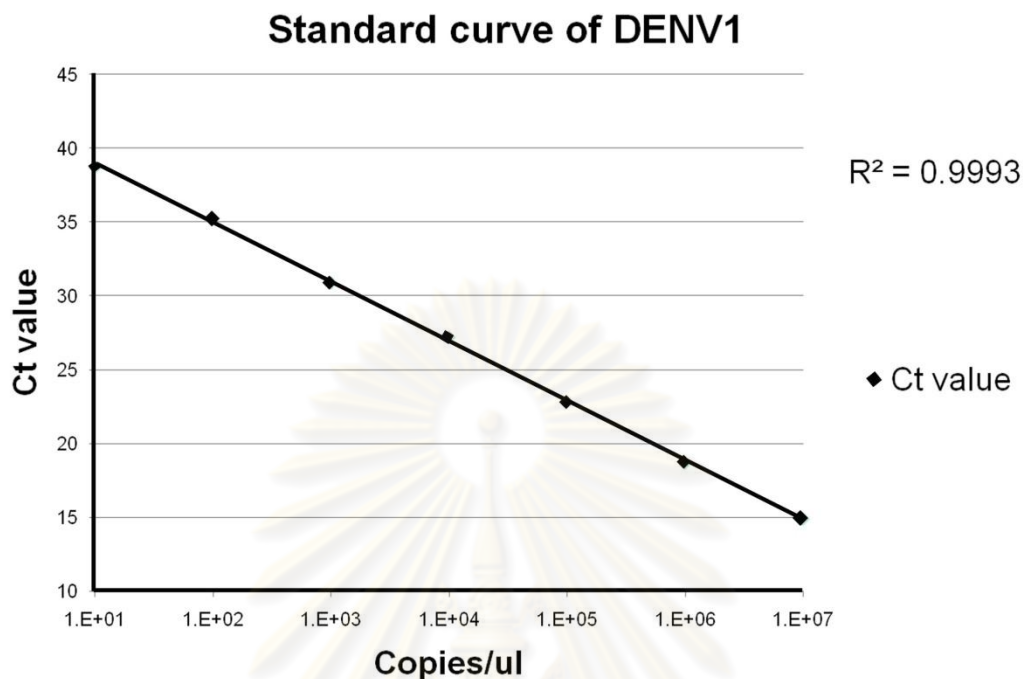
รูปที่ 25 แสดงภาพการทดลองการใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันโดยต่างกัน 10 เท่า ตั้งแต่ 10^1 - 10^6 copies/ μ l ของไวรัสชิคุนยา



รูปที่ 26 แสดง standard curve ของไวรัสชิคุนกุนยา และแสดงให้เห็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้



รูปที่ 27 แสดงภาพการทดลองการใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันโดยต่างกัน 10 เท่า ตั้งแต่ 10^1 - 10^7 copies/ul ของไวรัสเดงกี



รูปที่ 28 แสดง standard curve ของไวรัสเดงกีและแสดงให้เห็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้

การตรวจสอบกับตัวอย่างที่ยืนยันว่าเป็น Positive สำหรับไวรัสชิคุนกุนยาหรือเดงกีและทดสอบกับไวรัสชนิดอื่นๆ

เมื่อนำตัวอย่างที่ทราบผลแน่นอนแล้วว่ามี การติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาหรือไวรัสเดงกี โดยวิธี PCR และการตรวจ sequence จำนวน 39 ตัวอย่างของไวรัสชิคุนกุนยา และ 26 ตัวอย่างสำหรับไวรัสเดงกี และได้ส่งข้อมูลเข้าสู่ GenBank ตาม accession number ดังนี้ FJ882884–FJ882922(45) และ accession number JF274206-JF274231 และนอกจากนี้ยังตรวจกับไวรัสชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่ไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีอีก 38 ตัวอย่าง ได้แก่ ไวรัสตับอักเสบนชนิดซี 28 ตัวอย่าง, ไวรัสตับอักเสบนชนิดเอ 2 ตัวอย่าง ไวรัสตับอักเสบนชนิดอี 6 ตัวอย่าง และ Japanese encephalitis virus (JEV) 2 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า วิธีการนี้สามารถตรวจไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีได้ทุกตัวอย่าง และไม่พบผลบวกจากไวรัสชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพมาก

การตรวจสอบกับตัวอย่างทางคลินิก

เมื่อนำตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาหรือไวรัสเดงกีมาทดสอบเทียบกับวิธีการ PCR หรือ semi-nested PCR ซึ่งถือเป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับหรือ gold standard เทียบกับวิธีการ multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมา โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 290 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการ PCR สามารถตรวจหาไวรัสชิคุนกุนยาหรือไวรัสเดงกีได้ทั้งหมด 125 ตัวอย่าง โดยเป็นไวรัสชิคุนกุนยา 60 ตัวอย่างและไวรัสเดงกี 65 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ตรวจโดยวิธีการ PCR พบว่าเมื่อตรวจโดยวิธีการ multiplex real-time PCR สามารถตรวจได้ทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ตัวอย่างที่วิธีการ PCR ตรวจว่าไม่พบไวรัสทั้งสอง รวมทั้งสิ้น 162 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบโดยวิธีการ multiplex real-time PCR ได้อีก 12 ตัวอย่าง นั่นคือวิธีการ multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมา มีความไวมากกว่าวิธีการ PCR ปกติ

	Real-time/PCR (+/+)	Real-time/PCR (-/-)	Real-time/PCR (+/-)	Real-time/PCR (-/+)	total
CHIKV	60	50	3	3	116
DENV	65	100	9	0	174
total	125	150	12	3	290

รูปที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการ real-time PCR และ PCR

การคำนวณทางสถิติ

จากการคำนวณทางสถิติเมื่อเทียบกับวิธีการ PCR ปกติถือเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ พบว่า มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 97.65%, ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 92.59% และ ความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 95.82% โดยค่าที่ได้ก็นำมาจากตัวอย่างทางคลินิกที่สงสัยว่าผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาหรือไวรัสเดงกี

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลและอภิปรายผลจากการศึกษา Complete genome ของไวรัสชิคุนกุนยา

จากการผลการทดลองพบว่า Sequence ของไวรัสชิคุนกุนยาทั้ง 4 ตัวมีความใกล้เคียงกันมากถึง 99.79-99.89% เมื่อเทียบกับตัวต้นแบบ (Prototype) ความใกล้เคียงกัน 97.0% และเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่พบที่ประเทศมาเลเซียมีความใกล้เคียงกันประมาณ 99.83% แสดงว่าไวรัสไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปที่ไม่ซ้ำกับการค้นพบก่อนหน้านี้ได้แสดงในตารางที่ 6 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่รายงานจากประเทศมาเลเซียเมื่อไม่นานนี้พบว่า มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด นอกจากนี้ยังจัดตัวอยู่ในกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่พบจากการระบาดครั้งใหญ่ในบริเวณแถบมหาสมุทรอินเดีย ดังนั้นการระบาดของไวรัสชิคุนกุนยาทางภาคใต้ของประเทศไทย อาจมีความเกี่ยวข้องกับประเทศมาเลเซียและอินเดีย โดยเมื่อดูจากลักษณะทางภูมิภาคแล้ว ประเทศอินเดียอยู่ไม่ไกลจากประเทศมาเลเซียและประเทศไทยมากนัก อีกทั้งปัจจุบันการติดต่อค้าขายและการเดินทางระหว่างประเทศมีมากขึ้น ดังนั้น การระบาดในครั้งนี้ อาจเกิดการระบาดมาจากประเทศอินเดียและมาเลเซียก็เป็นได้

ทั้งนี้เมื่อดูในภาพรวมของ sequence ถือว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แสดงว่าไวรัสชนิดนี้มี nucleic acid มีความ conserve สูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการระบาดครั้งเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจของไวรัสชิคุนกุนยาคือการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ E1-A226V โดยพบว่า การระบาดในประเทศไทยมีการเปลี่ยนแปลงนี้ทั้งหมด (45) การเปลี่ยนแปลงที่ E1 protein นี้มีความสำคัญต่อไวรัส Semliki Forest Virus (SFV) ซึ่งเป็นไวรัสที่อยู่ใน family เดียวกับไวรัสชิคุนกุนยา โดยการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้ มีความสำคัญต่อการเข้าสู่ host ของไวรัส โดยผ่านกระบวนการ fusion ของ cell และการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้จะไปลดความต้องการคลอเรสเตอรอลของไวรัสที่ต้องใช้เพื่อเข้าสู่ host (cholesterol dependent) (46) ดังนั้นจึงไปช่วยให้ไวรัสสามารถเข้ายุงที่เป็น cholesterol-independent เป็นพาหะได้ เช่น *Ae. albopictus* นอกจากนี้เมื่อดู Complete genome และ E1 gene ของไวรัสชิคุนกุนยาแล้วพบว่า ไวรัสที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม ECSA strain ซึ่งในอดีตการระบาดในประเทศไทยเป็น Asian strain แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ที่ระบาดจากสายพันธุ์ Asian strain มาเป็น ECSA strain

สรุปผลและอภิปรายผลจากการพัฒนาวิธีการ Multiplex real-time PCR

การตรวจไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกีสามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น PCR, rapid test, ELISA, HI test และการเพาะเชื้อไวรัส ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่ความรวดเร็ว ประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือ เป็นสิ่งสำคัญต่อการตรวจทางการแพทย์ โดยก่อนหน้านี้ยังไม่มีวิธีการตรวจไวรัสทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกันและอาศัยเพียงปฏิกิริยาเดียวที่มีประสิทธิภาพน่าเชื่อถืออย่างเพียงพอ จึงได้พัฒนาวิธีการนี้ขึ้น เพื่อความรวดเร็ว และให้มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้นโดยอาศัยสมบัติความจำเพาะของ probe และ primer ตามแนวทางของวิธีทางชีวโมเลกุล อีกทางหนึ่งคือการตรวจวัดสารที่ระบบภูมิคุ้มกันสร้างขึ้นมาจำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสชนิดนั้นๆ เช่น IgG และ IgM แต่ทั้งนี้ทั้งนั้น การตรวจวัด IgM อาจได้ผลการตรวจที่ไม่ถูกต้องมากนัก เนื่องจาก IgM อาจไปคล้ายคลึงกับไวรัสอื่นๆที่อยู่ใน family เดียวกัน เช่น alphavirus เช่น ONNV กับ ไวรัสชิคุนกุนยา และ *Flaviviridae* family เช่น JEV กับไวรัสเดงกี และอีกวิธีหนึ่งที่น่าเชื่อถือ คือการเพาะเชื้อไวรัส แต่ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือ ต้องใช้เวลาทำนานกว่าวิธีอื่นๆ ดังนั้นการตรวจหาไวรัสมีความสำคัญต่อการรักษาผู้ป่วยเนื่องจากต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ เพื่อไม่ให้เสี่ยงต่อชีวิตของผู้ที่ติดเชื้อไวรัส อีกทั้งยังสำคัญต่อการศึกษาระบาดของไวรัสในประเทศด้วย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความน่าเชื่อถือได้ โดยตัวอย่างที่มีการยืนยันแล้วว่า มีไวรัสอยู่จริง วิธีการนี้ก็สามารถตรวจสอบได้ โดยไม่ได้มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดอื่นๆ และระหว่างไวรัสทั้งสองเอง (no cross-reaction) โดยจำนวนและลักษณะของไวรัสชนิดอื่นที่เลือกมาทำการทดสอบนั้นมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับไวรัสชิคุนกุนยาและไวรัสเดงกี เช่น มีลักษณะทางสารพันธุกรรมคล้ายกันคือ เป็น RNA สายเดี่ยว สายบอก และไวรัส JEV ที่มีความใกล้เคียงกับไวรัสเดงกีมาก โดยจัดอยู่ใน family และ genus เดียวกับไวรัสเดงกี ข้อจำกัดของจำนวนไวรัสตัวอื่นๆที่นำมาทำการทดลองคือ จำนวนที่นำมา มีน้อยเกินไป เนื่องจากข้อจำกัดที่ไวรัสเหล่านี้ มีการระบาดน้อย โดยวิธีการนี้ยังสามารถตรวจสอบไวรัสที่ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการ PCR ปกติได้ แสดงว่ามีความไวมากกว่า มีเพียงบางตัวอย่างที่วิธีการ real-time PCR ไม่สามารถตรวจได้ในขณะที่วิธีการ PCR ตรวจได้ อาจจะเนื่องมาจากที่ตัวอย่างดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงบางส่วนของนิวคลีโอไทด์และทำให้ วิธีการ real-time PCR ไม่สามารถตรวจได้ จึงต้องทดสอบเพื่อหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่่างดังกล่าวต่อไป เพื่อยืนยันว่าเป็นดังนี้หรือไม่ และนำมาพัฒนาและปรับปรุงวิธีการให้สามารถตรวจไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างบางส่วนได้ อีกทั้งความจำเพาะของวิธีการตรวจนี้ก็สูงด้วยเนื่องจากอาศัยความจำเพาะของการจับกันระหว่าง template, probe และ primers อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทำให้ลดความ

ไม่จำเพาะของปฏิกิริยาด้วย โดยปรับให้เหมาะสมกับไวรัสที่เราต้องการเพิ่มปริมาณเท่านั้น เมื่อดูจากค่าทางสถิติ ได้แก่ มีความไว (sensitivity) เท่ากับ 97.65%, ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 92.59% และ ความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 95.82%แล้ว พบว่า วิธีการนี้ มีความจำเพาะ ความไว และความถูกต้องที่น่าเชื่อถือ เช่น เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนๆ เช่น การศึกษาของ F. Nazea(47) ที่อาศัยการวัดจาก melting temperature พบว่าวิธีการนี้ น่าจะมีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากการออกแบบอย่างจำเพาะของ primer และ probe ทำการเลือกออกแบบในช่วงที่ conserve ระหว่าง strain หรือ serotype ของไวรัส ดังนั้น วิธีการนี้สามารถตรวจหาไวรัสชนิดอื่นๆได้ทุก strain และไวรัสแดงก็ได้ทุก serotype และการตรวจหา serotype ของไวรัสแดงก็ สามารถทำได้ต่อ โดยอาจใช้วิธีการ PCR แล้วหา sequence เพื่อมา BLAST เทียบกับฐานข้อมูลก็ได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- (1) Pongsiri P, Auksornkitti V, Theamboonlers A, Luplertlop N, Rianthavorn P, and Poovorawan Y. Entire genome characterization of Chikungunya virus from the 2008-2009 outbreaks in Thailand. Trop Biomed 27,2 (2010):167-176.
- (2) Guzmán MG and Kouri G. Dengue: an update., Lancet Infect Dis 2, 1 (2002); 33-42.
- (3) Strauss JH and Strauss EG . The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Microbiol Rev. 58,3 (1994):491-562.
- (4) Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, and Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. J Gen Virol. 83 (2002):3075–3084.
- (5) Faragher SG, Meek AD, Rice CM, and Dalgarno L. Genome sequences of a mouse-avirulent and a mousevirulent strain of Ross River virus. Virology. 163, 2 (1988):509-526.
- (6) Schlesinger SS and Schlesinger MJ. Formation and assembly of alphavirus glycoproteins. In Schlesinger SS, Schlesinger MJ (ed.) *The Togaviridae and Flaviviridae*, pp. 121–148. Plenum, New York, 1986.
- (7) Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, and Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. J Virol. 51, 1 (1984): 254-258.
- (8) Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, and Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol. 44 (1990):649-688.
- (9) Erik AH and J Robert P. The Dengue Viruses. MBio 3, 4 (1990): 376-396
- (10) Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. BMC Infect Dis. 28, 10 (2010):142.
- (11) Ross TM. Dengue Virus. Clin Lab Med. 30, 1 (2010):149-160.

- (12) Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 49,1 (1955):28-32.
- (13) Hammon WM and Sather GE. Virological findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (dengue) in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 13 (1964):629-641.
- (14) Powers AM and Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus, 2007. *J Gen Virol*. 88 (2007):2363-2377.
- (15) WHO. Chikungunya Fever, Chikungunya in South-East Asia. World Health Organization [Online]. 2009 Available from : http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section2246_13975.htm. [2010, Jan]
- (16) Ng LC, Tan LK, Tan CH, Tan SS, Hapuarachchi HC, Pok KY et al. Entomologic and virologic investigation of Chikungunya, Singapore. *Emerg Infect Dis*. 15, 8 (2009):1243-1249.
- (17) AbuBakar S, Sam IC, Wong PF, MatRahim N, Hooi PS, and Roslan N. Reemergence of Endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 13, 1 (2007):147-149.
- (18) Ungchusak K. Chikungunya: Thailand confirmed. 2008 [Online]. 2008. Available from: <http://www.promedmail.org, archive no.20081028.3407>. [2008, Oct]
- (19) Powers AM, Brault AC, Tesh RB, and Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships *J Gen Virol*. 81, 2 (2000):471-479.
- (20) Theamboonlers A, Rianthavorn P, Praianantathavorn K, Wuttirattanakowit N, and Poovorawan Y. Clinical and molecular characterization of chikungunya virus in South Thailand. *Jpn J Infect Dis*. 62, 4 (2009):303-305.

- (21) Field V, Gautret P, Schlagenhauf P, Burchard GD, Caumes E, Jensenius M, et al. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. BMC Infect Dis. 10 (2010):330.
- (22) Ahn A, Schoepp RJ, Sternberg D, and Kielian M. Growth and stability of a cholesterol-independent Semliki Forest virus mutant in mosquitoes. Virology. 262, 2 (1999): 452-456.
- (23) Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. Dengue: Its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. Philipp J Sci. 29 (1926):1-304.
- (24) Sabin AB. Dengue. In: Rivers TM, Horsball FL(ed.) Viral and rickettsial infections of man. pp. 361-373. Philadelphia, 1959.
- (25) Hammon WM, Rudnick A, Sather GE, Rogers KD, Chan V, Dizon JJ, et al. V. Proc. 9th Pacific Sci. Congr., Bangkok, Thailand. 1957: 67-72.
- (26) Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, et al. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. Emerg Infect Dis. 11, 5 (2005):742-749.
- (27) Carvalho SE, Martin DP, Oliveira LM, Ribeiro BM, and Nagata T. Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. Virus Genes. 40, 1 (2010):60-66.
- (28) Li DS, Liu W, Guigon A, Mostyn C, Grant R, and Aaskov J. Rapid Displacement of Dengue Virus Type 1 by Type 4, Pacific Region, 2007-2009. Emerg Infect Dis. 16, 1 (2010):123-125.
- (29) Chandak NH, Kashyap RS, Kabra D, Karandikar P, Saha SS, Morey SH, et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection Neurol India. 57,2 (2009):177-180.

- (30) Anand. Chikungunya Fever Guide [Online]. 2011. Available from :
<http://www.chikungunia.com/chikungunya-treatment-symptoms-prevention/chikungunia-is-much-deadlier-than-you-imagined/>. [2011, Jan]
- (31) Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, and Crance JM. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. Antiviral Res. 61, 2 (2004):111-117.
- (32) Brighton SW, Prozesky OW, and de la Harpe AL. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. S Afr Med J. 63, 9 (1983):313-315.
- (33) Lokireddy S, Sarojamma V, and Ramakrishna V. Genetic predisposition to Chikungunya—a blood group study in Chikungunya affected families. Virol J. 6 (2009):77.
- (34) WHO. Guidelines for treatment of Dengue fever/Dengue Hemorrhagic fever in small hospital World health organization. 1999.
- (35) Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, and Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. Am J Trop Med Hyg. 38, 1 (1988):172-180.
- (36) Innis BL. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Porterfield JS, (ed.) Exotic viral infections pp 103-146. Chapman & Hall, London, United Kingdom. 1995.
- (37) Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B. et al. Neurological manifestations of dengue infection. Lancet. 355, 9209 (2000): 1053-1059.
- (38) Gibbons RV and Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. BMJ. 324, 7353 (2002):1563-1566.
- (39) WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Delhi, India, 2009

- (40) Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, and Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. Emerg Infect Dis. 14, 3 (2008):416-422.
- (41) Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta. 63 (2006): 32-47.
- (42) M Naresh Kumar CV, Anthony Johnson AM, and R Sai Gopal DV. Molecular characterization of chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. Indian J Med Res. 126, 6 (2007): 534-540.
- (43) Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, and Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. J Virol Methods. 129, 1 (2005):8-15.
- (44) Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. PLoS Med. 3, 7 (2006): e263.
- (45) Rianthavorn P, Prianantathavorn K, Wuttirattanakowit N, Theamboonlers A, and Poovorawan Y. An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. Int J Infect Dis. 14 (2010): e161-e165
- (46). Ahn A, Schoepp RJ, Sternberg D, and Kielian M. Growth and stability of a cholesterol-independent Semliki Forest virus mutant in mosquitoes. Virology. 262, 2 (1999): 452-456.
- (47) Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P et al. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. J Virol Methods. 162,1-2 (2009): 1-7



ภาคผนวก (Appendices)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก (Appendix A)

การเตรียมสารเคมี

1. 5XTris borate buffer (5XTBE)

Tris-base 54 กรัม, Boric acid 27.5 กรัม, EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร, เติมน้ำกลั่นจนได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1XTris borate buffer (1XTBE)

5XTBE 200 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

3. 2%(w/v) agarose gel

Agarose Gel 4 กรัม, 1XTBE 200 มิลลิลิตร, เชยแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟจนกว่า gel จะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4. 10% Ethidium Bromide

Ethidium Bromide 30 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

5. Loading dye

0.25% Bromphenol blue, 40%(w/v) sucrose in water, เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C

6. PBS transport Media

PBS 50 มิลลิลิตร, Penocillin + Streptomycin 5,000 ไมโครลิตร, แบ่งใส่ microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร

7. LB agar 100 มิลลิลิตร

agar 1.5 กรัม, yeast extract 0.5 กรัม, peptone 1 กรัม, NaCl 0.5 กรัม, เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงแล้วเติม ampicilin 100 μ g/mL แล้วเทใส่ plate ประมาณ 35 มิลลิลิตร

8. LB broth 50 มิลลิลิตร

yeast extract 0.25 กรัม, peptone 0.5 dกรัม, NaCl 0.25 กรัม, เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave

9. SOC medium 100 มิลลิลิตร

yeast extract 0.5 กรัม, peptone 2 กรัม, NaCl 1 มิลลิลิตร และ KCl 0.25 mK เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกลูโคส 100 ไมโครลิตร และ Mg^{2+} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ข (Appendix B)

รายงานการตีพิมพ์ของวิทยานิพนธ์บางส่วนในวารสาร

1. ตีพิมพ์ในวารสาร Tropical Biomedicine หัวข้อ Entire genome characterization of Chikungunya virus from the 2008-2009 outbreaks in Thailand
2. ตีพิมพ์ในวารสาร Annals of Tropical Medicine and Parasitology หัวข้อ Whole-genome characterisation of Chikungunya virus from Aedes albopictus collected in Thailand
3. คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร Tropical Biomedicine หัวข้อ Multiplex real-time RT-PCR for detecting Chikungunya Virus and Dengue Virus



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Entire genome characterization of Chikungunya virus from the 2008-2009 outbreaks in Thailand

Pongsiri, P.,¹ Auksornkitti, V.,¹ Theamboonlers, A.,¹ Luplertlop, N.,³ Rianthavorn, P.,^{1,2} Poovorawan, Y.^{1*}

¹ Centre of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

² Department of Pediatrics, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society

³ Department of Tropical Hygiene, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

* Corresponding author email: Yong.P@chula.ac.th

Received 8 January 2010; received in revised form 22 February 2010; accepted 24 February 2010

Abstract. The resurgence of Chikungunya virus (CHIKV) in the southern, northeastern and northern parts of Thailand, inflicting approximately 46,000 reported cases since October 2008 until December 2009, has raised public health concerns. In the present study, we characterized nearly complete genome sequences of four CHIKV isolates obtained from 2008 to 2009 outbreaks in Thailand. Phylogenetic analysis was performed to determine the relationships of the study viruses with previously reported isolates. Results showed that 2008-2009 Thailand isolates belonged to the East, Central and South African genotype and were most closely related to isolates detected in Malaysia and Singapore in 2008. This was in contrast to isolates from all previous outbreaks in Thailand which were caused by an Asian genotype. We describe several novel mutations in Thailand isolates that warrants further investigation on characterization of CHIKV from different parts of the country to better understand the molecular epidemiology of Chikungunya fever outbreaks in Thailand.

INTRODUCTION

Chikungunya Virus (CHIKV) is an enveloped, single-stranded RNA virus of positive polarity with a genome of ≈11.8 kb (Khan *et al.*, 2002) and belongs to the family *Togaviridae* and genus *Alphavirus* (Strauss & Strauss, 1994). The 5' two-thirds of the genomic RNA encode the non-structural proteins while the 3' one-third serves as mRNA for the synthesis of viral structural proteins (Faragher *et al.*, 1988).

CHIKV is responsible for chikungunya fever (CHIKF), of which main clinical features are fever, chills, headache, myalgia, maculopapular rash and arthralgia (Mohan, 2006). Although many of these features are non specific, arthralgia seems to be more specific to CHIKF than any other clinical findings (Rianthavorn *et*

al., 2010). Phylogenetic analysis of the CHIKV genome based on partial *E1* gene sequences has identified three genotypes of CHIKV; West African, Asian and East, Central and South African (ECSA) genotypes (Powers *et al.*, 2000). CHIKV was first isolated from a febrile patient during an epidemic of dengue-like illness in Tanzania (previously Tanganyika) in 1952–1953 (Robinson, 1955).

The virus is understood to have come from Africa and was subsequently introduced to many regions of Asia (Carey, 1971). The first isolation of CHIKV in Asia was reported from Thailand in 1958 (Hammon & Sather, 1964). Since 2004, several outbreaks have occurred with millions of reported cases, involving new geographical areas (Powers & Logue, 2007) such as Kenya in 2004, Comoros in 2005

(Sergon *et al.*, 2007), and several Indian Ocean islands in 2005 (Schuffenecker *et al.*, 2006). Furthermore, India reported an outbreak of unprecedented magnitude with more than 1.38 million cases in 2006-2007 (Lahariya & Pradhan, 2006; WHO, 2008). Furthermore, CHIKV has caused large epidemics in Southeast Asia with cases reported in Indonesia in 2001-2008 (WHO, 2008), Singapore in 2008 (Ng *et al.*, 2009), Malaysia in 2006 (AbuBakar *et al.*, 2007) and Thailand in 2008 (Ungchusak, 2008). Virus strains circulating in Asia were of the Asian genotype until a shift to the ECSA genotype occurred in India in late 2005.

In Thailand, outbreaks of CHIKV have occurred in Prachinburi (1976), Surinn (1988), Khon Khen (1991), Loei & Prayao (1993), and Nongkhai & Nakorn Sri Thammaraj (1995). From late September to October 2008, CHIKV outbreaks occurred in many provinces of Southern Thailand. The initial outbreaks spread over five villages, affecting 82 individuals, the majority of whom used to travel regularly to Malaysia (Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Thailand, 2008). The area mostly affected by CHIKV was Narathiwat, the Southernmost province of the country. There are plenty of *Aedes albopictus*, the vector of CHIKV, in plantation areas abundant in Southern Thailand, from where CHIKV was isolated from *Ae. albopictus* during the initial outbreaks (Ungchusak, 2008). We have already reported the clinical and viral molecular characteristics of initial CHIKV outbreaks in Thailand (Theamboonlers *et al.*, 2009). The same study indicated that CHIKV strains involved in the initial outbreaks in Thailand belonged to the ECSA genotype reported from the rest of Southeast Asia after 2005. These isolates harbored the E1-A226V mutation (Theamboonlers *et al.*, 2009; Rianthavorn *et al.*, 2010) that is known to increase the virus transmissibility via *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2007). By December 2009, CHIKV spread to the Central (17 provinces), Northeastern (15 provinces) and Northern (11 provinces) parts of the country affecting more than 46,000

individuals. The estimated rate of infection was 75.40 people per 100,000 people (Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Thailand, 2008).

In this study, we established nearly the whole genome sequence of CHIKV detected in four serum samples obtained in 2008 and 2009. In addition, the phylogenetic origin and the diversity of CHIKV strains responsible for the re-emergence of CHIKV in Thailand were examined.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

An outbreak of CHIKV was reported in the Southern Thailand in 2008. Samples were randomly picked up from sera that were tested positive for CHIKV by RT-PCR. We randomly selected one positive serum sample (CU-Chik10) reported in 2008. In 2009, with the outbreaks still ongoing, we received more sera and selected 3 serum samples for genetic characterization; two (CU-Chik661 and CU-Chik683) from Narathiwat, and one serum sample, CU-Chik009, from a patient who had returned from Nakhonsrithammaraj. Both areas were provinces in the Southern Thailand. Sample details are shown in Table 1. The details and molecular characterization of *E1* gene have been reported elsewhere (Theamboonlers *et al.*, 2009, Rianthavorn *et al.*, 2010).

Cell preparation

African green monkey, *Cercopithecus aethiops* kidney cells, Vero cells, and Rhesus monkey kidney, *Macaca mulatta*, LLC-MK₂ cells were used to propagate the virus from serum samples. These cells were maintained in growth medium, DMEM (Sigma, USA), supplemented with 10% heat inactivated (56°C for 30 min.) fetal bovine serum (Sigma, USA), 1.1 g/l sodium bicarbonate, 2mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin). Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidified CO₂ incubator.

Virus propagation

CHIKV infected serum samples were diluted 1:5 in RNase free PBS solution (final pH 7.2–7.4) before grinding in RNase free PBS solution (final pH 7.2–7.4) and filtered through a 0.22 µm filter. Only the CU-Chik683 sample was propagated in Vero cell culture and was passaged once before sequencing. The rest of analyzed isolates (n=3) were sequenced directly from sera. Briefly, confluent monolayer Vero cells, approximately 5×10^5 cells per T₂₅ flask, were inoculated with prepared samples for 90 min at 37°C on a rocker platform. The monolayer infected Vero cells were maintained in growth medium, DMEM (Sigma, USA), supplemented with 10% heat inactivated (56°C for 30 min) fetal bovine serum (Sigma, USA), 1.1 g/l sodium bicarbonate, 2mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), and incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidified CO₂ incubator. Once 70-80% cytopathic effect (CPE) was observed – approximately 5-7 days post inoculation – the culture supernatants were collected into bio-freeze vials and kept at -80°C for viral RNA detection by RT-PCR and viral titration assay by plaque titration on LLC-MK2 cells.

Plaque titration assay

LLC-MK2 cells were used for the plaque assay, modifying the protocol originally described by Malewicz & Jenkin (1979). Briefly, LLC-MK2 cells were maintained in DMEM (Sigma, USA), supplemented with 10% heat inactivated (56°C for 30 min) fetal bovine serum (Sigma, USA). Ten-fold dilutions of the infected Vero cell supernatant were diluted in 5% RPMI-1640 serum free medium (Sigma, USA). Subsequently, 70-80% confluent LLC-MK2 cells in a 6 well culture plate were washed once with Hanks' balanced salt solution and then inoculated with 250 µL of ten-fold diluted samples at 37°C for 90 min. After that, the first overlay agar medium was incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidified CO₂ incubator for 3-5 days until plaque formation. The second overlay

containing 4% neutral red was added and incubated as above for 24 hours for plaque identification.

Whole genome characterization

RNA extraction and RT-PCR

CHIKV was isolated directly from the patient's sera (n=3) or from cell cultures (n=1) originating from the first passage Vero cells (Table 1). Viral RNA was extracted using the Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) according to the manufacturer's protocol and amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), using the Superscript III platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA). The reaction mixture consisted of 2 µl of extracted RNA, 5 µl of 2x reaction mix, 0.25 µl of superscript reverse transcriptase III platinum *Taq* polymerase, 0.5 µM of each primer, and 6 µl of nuclease-free water. The RT step and PCR amplification were performed in an Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) under the following conditions: reverse transcription at 50 C for 30 min; subsequently, initial denaturation at 95°C for 3 min; followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, primer annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min; and concluded by final extension at 72°C for 7 min. All primers, except for the reverse primer of fragment 21, are previously published (Schuffenecker *et al.*, 2006). The sequence of the newly designed reverse primer of fragment 21 was 5'CTCCTACGTCCCTGTGGG3'. The amplified PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel in TBE buffer and stained with ethidium bromide. The expected products were visualized under UV light, excised from the gel and purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The purified PCR products were then used for direct sequencing by First BASE Laboratories SDN BHD (Selangor Darul Ehsan, Malaysia).

Assembly of Genome Sequences and Sequence Analysis

Genome sequences were analyzed using the BLAST programme available in NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Subsequently, they were edited and assembled in CHROMASLITE (v.2.0) and SeqMan (DNASTAR, Madison, WI) software. All sequences were aligned using Clustal X version 1.83 and phylogenetic trees were constructed applying the neighbor-joining method and Kimura's two-parameter with 1,000 bootstrapping method implemented in the MEGA 3.1 program.

RESULTS

Complete genome analysis of CHIKV in Thailand

We analyzed the nearly complete genome sequences of four CHIKV isolates representative of the 2008 and 2009 outbreaks in Thailand (Table 1). Novel amino acid changes detected in Thailand strains as compared to S27 are shown in Table 2. The length of genome sequences of four isolates presented in this paper was 11,811 base pairs except for the isolate CU-Chik661 with a sequence of 11,738 base pairs. Subsequently, they were aligned with 27 complete genome sequences available in GenBank. Overall, the genome structures of these four isolates were consistent with the previous work. The isolates analyzed in this study were very closely related, showing a nucleotide identity of 99.79-99.89% with one another. Furthermore, they showed an average whole genome nucleotide similarity of 97.0% to the S27

prototype, 99.83% to a Malaysian isolate (Accession number FJ807899) and 99.81% to a Singapore isolate (Accession number FJ807896).

Non-structural region

Compared to S27, the CU-Chik661, CU-Chik009, CU-Chik10 and CU-Chik683 isolates displayed 32 identical substitutions in the non-structural region: nine in nsP1 (T128K, L172V, E234K, T376M, M383L, I384L, T481I, Q488R, and L507R), six in nsP2 (S54N, H374Y, C582Y, S582N, L539S and A793V), eleven in nsP3 (V175I, Y217H, P326S, V331A, T337I, K352E, I376T, A382T, L461P, S462N, and P471S) and six in nsP4 (T75A, T254A, Q500L, I514T, V555I, and V604I). These changes were also found in other isolates from the Indian Ocean Islands in 2006 and 2007 (Schuffenecker *et al.*, 2006), Kerala, South India in 2006-2008 (Sreekumar *et al.*, 2009), Sri Lanka, Singapore (Hapuarachchi *et al.*, 2010) and Malaysia (Huang *et al.*, 2009).

Interestingly, at codon 524 of nsP3, there was an opal stop codon (UGA) in the present isolates that was not observed in S27 and Ross strains. This opal stop codon was also detected in related alphaviruses and previously reported CHIKV isolates (Schuffenecker *et al.*, 2006). It is believed to have an important role in regulating the expression of nsP4 by read-through mechanism (Strauss & Strauss, 1994). Additional specific changes were also observed in CU-Chik10 (nsP1-P29S, nsP1-N186D, nsP2-P79S, nsP3-T338M, nsP4-N595K, nsP4-R600I, nsP4-T605S, and nsP4-L606M) and CU-Chik661 (nsP4-Y87H) isolates. There was also a unique nucleotide substitution in the isolates of this

Table 1. Sample details

Sample code	Date of collection	Place	GenBank Acc. No.	Sample type
CU-Chik661	25 May 2009	Narathiwat	GQ905863	Serum
CU-Chik009*	4 Sep 2009	Bangkok	GU301779	Serum
CU-Chik10	21 Oct 2008	Narathiwat	GU301780	Serum
CU-Chik683	27 Jul 2009	Narathiwat	GU301781	Culture isolate

* patient returned from Nakhonsrithammaraj, the province in the Southern Thailand.

Table 2. Novel amino acid substitutions identified in Thailand CHIKV isolates

Region	polypeptide position	protein position	S27	CU-Chik661	CU-Chik009	CU-Chik10	CU-Chik683
nsP1	29	29	P	.	.	S	.
	186	186	N	.	.	D	.
nsP2	614	79	P	.	.	S	.
nsP3	1671	338	T	.	.	M	.
nsP4	1950	87	Y	H	.	.	.
	2458	595	N	.	.	K	.
	2463	600	R	.	.	I	.
	2468	605	T	.	.	S	.
	2469	606	L	.	.	M	.
E3	290	30	K	.	R	.	.
E2	409	84	F	.	L	.	.
	632	307	Q	.	R	.	.

study; a synonymous change from A to G at nucleotide position 6811 in the nsP4 region.

Structural region

Analysis of amino acid changes of the structural polyprotein showed 25 positions that were common to all four isolates: three in C (P23S, V27I and K63R), one in E3 (I24T), fifteen in E2 (G57K, I74M, G79E, N160T, A164T, L181M, S194G, I211T, K252Q, M267R, S299M, T312M, A344T, S375T, and V386A), two in 6K (V8I and I54V) and four in E1 (A226V, M269V, D284E, and V322A) proteins. The only isolate displaying specific changes was CU-Chik009 with three unique amino acid changes (E3-K30R, E2-F84L and E2-Q307R). At nucleotide position 9138, isolates of this study had reverted back to wild type nucleotide (T), which had mutated to C in all previously reported recent CHIKV isolates.

5' and 3' UTRs

The 5' UTRs of all four isolates were largely similar to recently described isolates. Only CU-Chik10 showed a mutation (T→A) at nucleotide position 64. Neither insertion nor deletion was observed.

Within the 3'UTR, the sequences determined in this study showed a 14-nucleotide (A) deletion in a stretch of 19 nucleotides (A) from positions 11,369 to 11,342 as compared to S27. The same deletion was previously reported in the 2006 Indian Ocean isolates (Schuffenecker *et al.*, 2006). However, CU-Chik661 isolates showed only a single nucleotide (A) deletion in this region.

Phylogenetic analyses

Figure A1 illustrates the phylogenetic tree based on full genome analysis. Our isolates (CU-Chik009, CU-Chik10, CU-Chik683 and CU-Chik661) were most closely related to isolates from Malaysia (Accession No. FJ807899). Moreover, they cluster together with isolates from 2007-2008 Indian, Sri Lankan, Italian and Singapore outbreaks. We also determined the partial *E1* gene sequences as this region has been extensively used to infer the phylogenetic relationships of CHIKV. The phylogenetic tree based on the partial *E1* gene sequence showed all study isolates within the ECSA phylogenetic group (Figure A2). In contrast, the 1958 outbreak in Thailand had been ascribed to a strain of the Asian genotype.

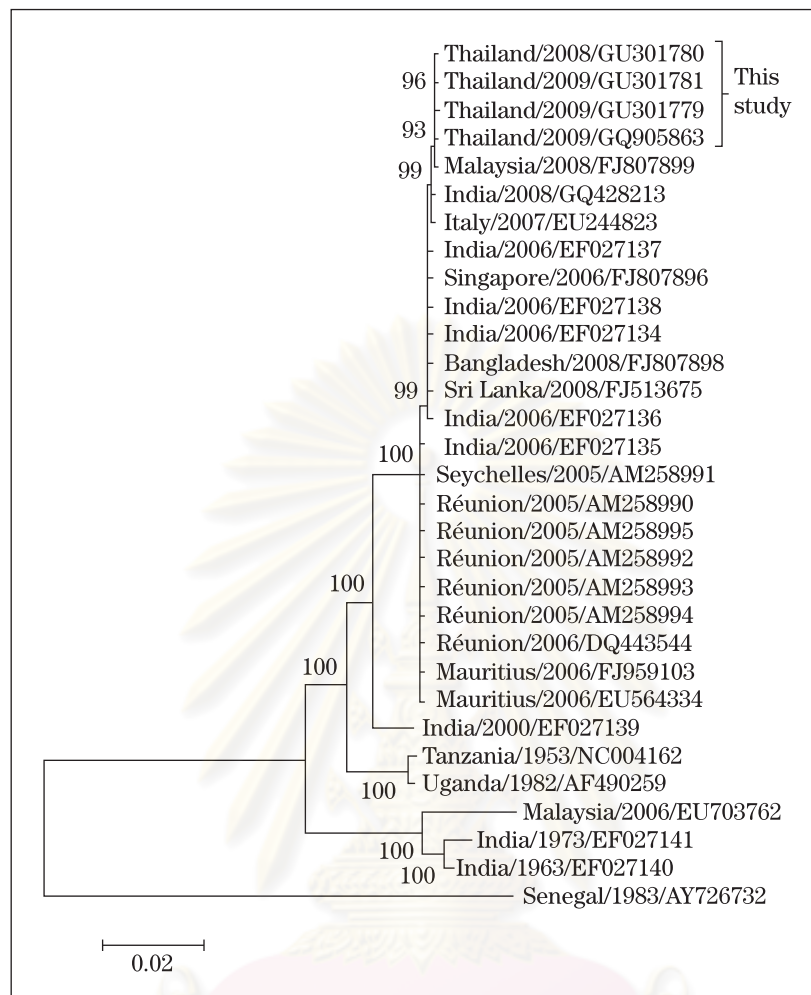


Figure A1. Phylogenetic tree based on the whole genome of CHIKV. Viruses were identified by using the nomenclature of country/year of isolation/GenBank accession number. Scale bar in the bottom indicates the genetic distance in nucleotide substitutions per site. Numbers represent the bootstrap support obtained for respective branches

DISCUSSION

In Thailand, CHIKV was first described in Bangkok in 1958 (Hammon & Sather, 1964) and was an Asian genotype strain (Powers *et al.*, 2000). Subsequently, CHIKV emerged in Thailand with gaps of 2-18 years between outbreaks: Prachinburi (1976), Surinn (1988), Khon Khen (1991), Loei and Prayao (1993), and Nongkhai & Nakorn Sri Thammaraj (1995). All these outbreaks were caused by CHIKV of the Asian genotype (Powers *et al.*, 2000). CHIKV is

presently causing one of the largest outbreaks reported in the past 50 years. Starting in October 2008, a cluster of patients from several villages presenting with fever, rash and severe arthralgia was detected at Laharn health center in Narathiwat. CHIKV was suspected and subsequently confirmed by the HI (Hemagglutination inhibitor) test and RT-PCR methods (Ungchusak, 2008). Since then, CHIKV has been spreading to the adjacent and nearby provinces of Narathiwat including Songkhla, Pattani and

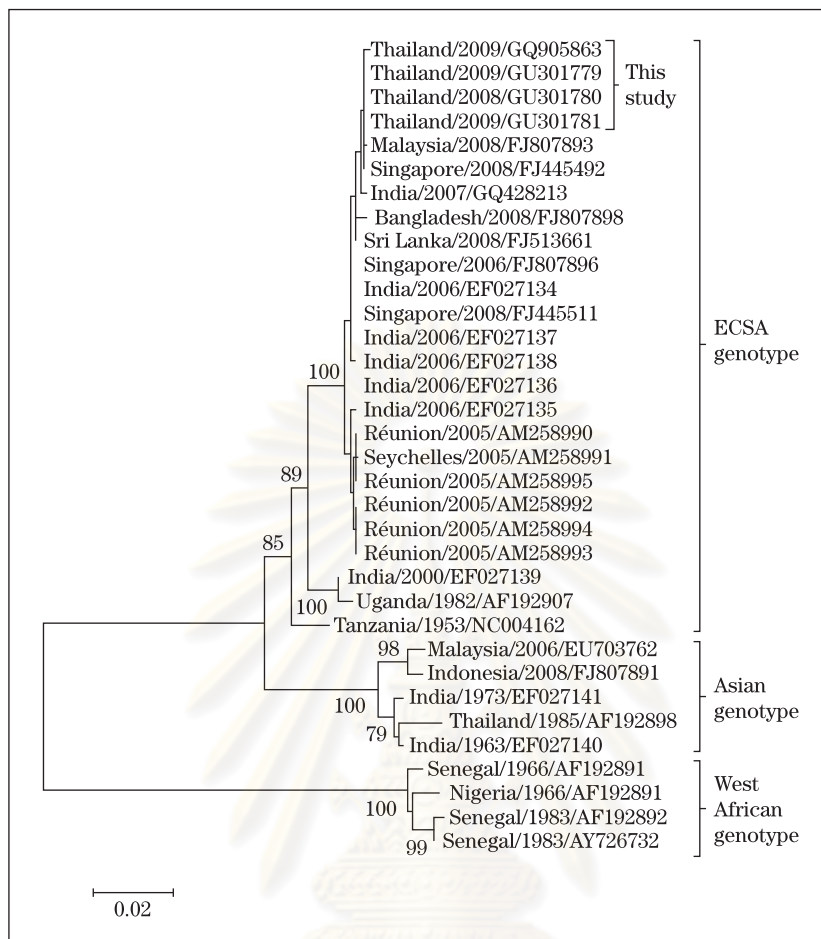


Figure A2. Phylogenetic tree based on the partial E1 gene sequences. Viruses were identified by using the nomenclature of country/year of isolation/ GenBank accession number. Scale bar in the bottom indicates the genetic distance in nucleotide substitutions per site. Numbers represent the bootstrap support obtained for respective branches

Yala with several thousands of cases reported in each area. Not only has CHIKV been disseminated in the nearby area of Narathiwat but is also circulating in other parts of Thailand including the Southeast, Central, North and East regions of the country having caused more than 46,000 infected cases (Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Thailand, 2008). Due to their magnitude, these epidemics have raised a public health concern in Thailand. Consequently, the Bureau of Epidemiology, Thailand included CHIKV as one of the notifiable diseases and launched a nationwide passive

surveillance programme involving all government and some private hospitals in November 2008. Considering the preceding outbreaks in Malaysia, it was assumed that CHIKV might have been introduced from Malaysia into the Southern parts of Thailand where both countries share the border.

This study has demonstrated a high level of similarity among CHIKV isolates detected during the same outbreak. As compared to high levels of genetic drift expected in an RNA genome, this low level of genetic variation suggested a high level of conservation of this RNA virus in the course of a particular outbreak.

Our study represents the first molecular epidemiological analysis, to our knowledge, of a CHIKV outbreak in Thailand. In this study, the phylogenetic analysis based on partial glycoprotein E1 sequences further confirmed that recent CHIKV dissemination in Thailand was caused by a virus of the ECSA genotype. The same genotype has been identified during recent outbreaks in Malaysia, Singapore, Indonesia, Sri Lanka, Reunion, Seychelles, Mayotte, Madagascar, Mauritius, and India. This is in contrast to the Asian genotype virus strains that were responsible for previous outbreaks in Asia.

Interestingly, all CHIKV isolates analyzed during the current outbreak in Thailand have shown the E1-A226V substitution (Rianthavorn *et al.*, 2010). In Semliki Forest Virus (SFV), which belongs to the same family as CHIKV, protein E1 mediates the entry of the virus into host cells via fusion process, and cholesterol plays an important role in mediating the binding of the viral envelop to the target membranes (Waarts *et al.*, 2002). Previous studies have shown that the E1-A226V mutation of SFV did abolish the cholesterol dependence of the virus (Vashishtha *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 1999). This substitution, therefore, enables the virus to evade cholesterol-independent mosquitoes such as *Ae. albopictus*. Correspondingly, the most predominant mosquito species transmitting the wild-type (E1-A226) CHIKV used to be *Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer*, and *Aedes taylori* in Africa and mostly *Aedes aegypti* in Asia. However, recent reports have demonstrated *Ae. albopictus* as the predominant species in many CHIKV outbreak areas, which coincided with the spread of mutant CHIKV (E1-A226V). In addition, during more recent outbreaks, CHIKV has spread to several regions of the world, where *Ae. albopictus* is existent, but not *Ae. aegypti*, further indicating the potential of *Ae. albopictus* mosquitoes in transmitting the virus (Kumar *et al.*, 2008).

Another interesting observation was the presence of an opal stop codon in nsP3 region. The same observation has been

reported in all recently reported CHIKV isolates. It is known that the population of quasispecies of viruses could seep from repeated *in vitro* passages. Therefore, restricting the number of passages is very important because the infecting viral population may keep up a correspondence to a quasispecies (Domingo & Holland, 1997). Accordingly, the appearance of an Arg codon instead of the opal stop codon in S27 is perhaps explained by numerous *in vitro* passages of S27. This is further explained in a previous experiment, which has shown that the Opal stop codon could change to Arg in ONN viruses (Lanciotti *et al.*, 1998).

Though the analyzed CHIKV isolates from Thailand were genetically closest to those described recently in Malaysia and Singapore (Hapuarachchi *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2009), we detected several novel amino acid substitutions in our small cohort of viruses. As the virus is still circulating in certain parts of Thailand, further evolution is expected within the Thailand CHIKV population. This warrants further investigation of a large cohort of CHIKV from different parts of the country, in order to better understand the evolution of CHIKV in Thailand.

Acknowledgements. We would like to express our gratitude to the Commission on Higher Education, Ministry of Education, and the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University, CU Centenary Academic Development Project and King Chulalongkorn Memorial Hospital for their generous support. We would like to thank Ms. Petra Hirsch for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Abu Bakar, S., Sam, I., Wong, P., Mat Rahim, N., Hooi, P. & Roslan, U. (2007). Reemergence of Endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 147–149.
- Ahn, A., Schoepp, R.J., Sternberg, D. & Kielian, M. (1999). Growth and stability

- of a cholesterol-independent Semliki Forest virus mutant in mosquitoes. *Virology* **262**: 452–456.
- Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Thailand (2008). [cited 2010 Jan 10]. Available from <http://203.157.15.4/chikun/>.
- Carey, D.E. (1971). Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* **26**: 243–262.
- Domingo, E. & Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* **51**: 151–178.
- Faragher, S.G., Meek, A.D.J., Rice, C.M. & Dalgarno, L. (1988). Genome sequences of a mouse-avirulent and a mouse-virulent strain of Ross River virus. *Virology* **163**: 509–526.
- Hapuarachchi, H.C., Bandara, K.B., Sumanadasa, S.D., Hapugoda, M.D., Lai, Y.L., Lee, K.S., Tan, L.K., Lin, R.T., Ng, L.F., Bucht, G., Abeyewickreme, W. & Ng, L.C. (2010). Re-emergence of Chikungunya Virus in Southeast Asia: Virologic evidence from Sri Lanka and Singapore. *The Journal of General Virology* doi:10.1099/vir.0.015743-0 (in press).
- Hammon, W.M. & Sather, G.E. (1964). Virological findings in the hemorrhagic fever epidemic (dengue) in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **13**: 629–641.
- Huang, J.H., Yang, C.F., Su, C.L., Chang, S.F., Cheng, C.H., Yu, S.K., Lin, C.C. & Shu, P.Y. (2009). Imported Chikungunya Virus Strains, Taiwan, 2006–2009. *Emerging Infectious Diseases* **15**(11): 1854–1856.
- Khan, A.H., Morita, K., del Carmen Parquet, M., Hasebe, F., Mathenge, E.G.M. & Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology* **83**: 3075–3084.
- Kumar, N.P., Joseph, R., Kamaraj, T. & Jambulingam, P. (2008). A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *The Journal of General Virology* **89**: 1945–1948.
- Lahariya, C. & Pradhan, S.K. (2006). Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: a review. *Journal of Vector Borne Diseases* **43**: 151–160.
- Lanciotti, R.S., Ludwig, M.L., Rwaguma, E.B., Lutwama, J.J., Kram, T.M., Karabatsos, N., Cropp, B.C. & Miller, B.R. (1998). Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: Genetic characterization of the virus. *Virology* **252**: 258–268.
- Malewicz, B. & Jenkin, H.M. (1979). Development of dengue virus plaques under serum-free overlay medium. *Journal of Clinical Microbiology* **9**: 609–614.
- Mohan, A. (2006). Chikungunya fever: clinical manifestations & management. *Indian Journal of Medical Research* **124**: 471–474.
- Ng, L.C., Tan, L.K., Tan, C.H., Tan, S.S., Hapuarachchi, H.C., Pok, K.Y., Lai, Y.L., Lam-Phua, S.G., Bucht, G., Lin, R.T., Leo, Y.S., Tan, B.H., Han, H.K., Ooi, P.L., James, L. & Khoo, S.P. (2009). Entomologic and virologic investigation of Chikungunya, Singapore. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 1243–1249.
- Powers, A.M., Brault, A.C., Tesh, R.B. & Weaver, S.C. (2000). Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology* **81**: 471–479.
- Powers, A.M. & Logue, C.H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology* **88**: 2363–2377.

- Rianthavorn, P., Prianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N., Theamboonlers, A. & Poovorawan, Y. (2010). An outbreak of Chikungunya in south Thailand from 2008-2009 caused by African strains with A226V mutation. *International Journal of Infectious disease* (in press).
- Robinson, M.C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **49**: 28-32.
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M.C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J.M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M.P., Bréhin, A.C., Cubito, N., Desprès, P., Kunst, F., Rey, F.A., Zeller, H. & Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Medicine* **3**: 1058-1070.
- Sergon, K., Yahaya, A.A., Brown, J., Bedja, S.A., Agata, N., Allaranger, Y., Ball, M., Powers, A.M., Ofula, V., Onyango, C., Konongi, L.S., Sang, R., Njenga, M.K. & Breiman, R.F. (2007). Seroprevalence of chikungunya virus infection on Grande Comore Island, Union of the Comoros, March 2005. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **76**: 1189-1193.
- Sreekumar, E., Issac, A., Nair, S., Hariharan, R., Janki, M.B., Arathy, D.S., Regu, R., Mathew, T., Anoop, M., Niyas, K.P. & Pillai, M.R. (2009). Genetic characterization of 2006-2008 isolates of Chikungunya virus from Kerala, South India, by whole genome sequence analysis. *Virus Genes* **40**: 14-27.
- Strauss, J.H. & Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiological Reviews* **58**: 491-562.
- Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Praianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N. & Poovorawan, Y. (2009). Clinical and molecular characterization of chikungunya virus in South Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **62**: 303-305.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E. & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens*. **3**:1895-1906.
- Ungchusak, K. (2008). Chikungunya: Thailand confirmed. ProMed. 2008 Oct 28. Available from <http://www.promedmail.org>, archive no. 20081028.3407.
- Vashishtha, M., Phalen, T., Marquardt, M.T., Ryu, J.S., Ng, A.C. & Kielian, M. (1998). A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. *The Journal of Cell Biology* **140**: 91-99.
- Waarts, B.L., Bittman, R. & Wilschut, J. (2002). Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion. Lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 38141-38147.
- WHO. (2008). Chikungunya Fever, Chikungunya in South-East Asia. World Health Organization. [cited 2010 Jan 30]. Available from http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section2246_13975.htm.

SHORT COMMUNICATION

Whole-genome characterisation of Chikungunya virus from *Aedes albopictus* collected in Thailand

Chikungunya fever (CHIKF) is an important public-health problem in several countries. The causative agent, Chikungunya virus (CHIKV), is an enveloped, single-stranded RNA virus in the genus *Alphavirus*, of the family *Togaviridae*, and was initially discovered 58 years ago, in Tanzania (Ross, 1956; Griffin, 2001). The clinical signs and symptoms of CHIKF include high fever, arthralgia, myalgia, headache and rash (Jupp and McIntosh, 1988; Johnston and Peters, 1996), with the arthralgia, which can persist for several months or even years, more specific to CHIKF than any of the other symptoms (Rianthavorn *et al.*, 2010). Some cases may also show haemorrhagic signs, such as epistaxis or gingivorrhagia (Schuffenecker *et al.*, 2006).

The first known outbreak of CHIKF in Thailand was confirmed, by antibody testing, in the 1960s (Hammon and Sather, 1964). Since then, there have been outbreaks reported in many of the country's provinces, especially in the south, where the latest epidemic began in late 2008 (Thavara *et al.*, 2009; Theamboonlers *et al.*, 2009; <http://203.157.15.4/chikun/>; www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:4499468516694014::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,74552). The two species of mosquito that are considered to be the main vectors of CHIKV, *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*, are both abundant in the southern provinces of Thailand, especially in the many rubber-tree plantations. *Aedes albopictus* may be the most important vector generally (Charrel *et al.*, 2007; Thavara *et al.*, 2009). Although the CHIKV that were recently isolated from patients in the southern part of Thailand harbored a mutation —

A226V in their E1 genes — that enhances the transmissibility of the virus by this species (Pongsiri *et al.*, 2010; Rianthavorn *et al.*, 2010), little is known about the CHIKV carried by mosquitoes in Thailand. In this study, the entire genome of CHIKV isolated from *Ae. albopictus* collected in Uthai Thani province, in western–central Thailand (Fig. 1), was characterised, allowing the viral isolates from the mosquitoes to be compared with those previously collected from humans in the south of Thailand (Pongsiri *et al.*, 2010).

MATERIALS AND METHODS

In August 2009, human bait and sweep nets were used to collect mosquitoes both inside the houses of the sporadic CHIKF cases then occurring in Uthai Thani province, and outside (within 100 m) of the same houses. The mosquitoes were divided by species, gender and collection location (i.e. inside or outside) and subsequently pooled into five groups: one of four female *Ae. albopictus* collected inside, one of seven male *Ae. albopictus* collected outside, one of seven female *Ae. albopictus* collected outside, one of two male *Ae. aegypti* collected inside, and one of six female *Ae. aegypti* collected inside.

All the pools of mosquitoes were kept at -70°C until checked for CHIKV by culture. The legs and wings of the mosquitoes were removed before each of the pools of the insects was ground in RNase-free phosphate-buffered saline at pH 7.2. Each resultant suspension was centrifuged (at $9500 \times g$ for 5 min) before the resultant supernatant solution was filtered through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ -pore



FIG. 1. Map of Thailand showing the location of the mosquito-collection site in Uthai Thani, and the area affected by epidemic Chikungunya fever in the last 2 years (■).

membrane filter. Each filtrate was transferred onto a culture of the C6/36 (larval *Ae. albopictus*) cell line, growing in Medium 199 containing 10% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum, 1% (v/v) of a commercial mixture of non-essential amino acids (Sigma), 2 mM L-glutamine, and 1% (v/v) of a solution containing 100 U penicillin and 100 µg streptomycin/ml. Each culture was incu-

bated at 28°C in an atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ (Pongsiri *et al.*, 2010). Approximately 5–7 days post-inoculation, the medium from each culture was collected and checked for CHIKV RNA by reverse-transcriptase PCR (Pongsiri *et al.*, 2010). The viral RNA detected was subjected to whole-genome sequencing (Pongsiri *et al.*, 2010), before the ‘new’ sequence was anal-

ysed, edited, assembled and compared with the relevant old sequences, using the BLAST programme (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) and the Chromas Lite (Technelysium, Tewantin, Australia) and SeqMan (DNASTAR, Madison, WI) software packages. The subsequent phylogenetic analyses were performed using MEGA 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

Only one of the five pools of mosquitoes that were tested — that of the seven female *Ae. albopictus* collected outside — was found PCR-positive for CHIKV RNA. The genome sequence for the CHIKV in this sample was almost completely characterised and submitted to the GenBank database under accession number GU908223. This sequence showed 97% similarity with the S27 prototype, and a mean similarity of 99.8% with CHIKV isolates from cases of CHIKF investigated in Thailand (GQ905863, GU301779, GU301780 and GU301781). In the 5' cap region, the genomes of the isolates from infected patients in Thailand displayed 100% nucleotide similarity with the 'new' sequence of the CHIKV from female *Ae. albopictus*.

Although, compared with the S27 prototype and the other CHIKV sequences in the GenBank database, the 'new' sequence did not show any novel amino-acid substitutions in its non-structural region, it did have four synonymous nucleotide substitutions: A1681G, T2656C, T3607C and T5443C. The T3607C substitution was also seen in CHIKV isolated from *Ae. furcifer* in Senegal (accession AY726732).

The structural region of the genome of the CHIKV from female *Ae. albopictus* showed two amino-acid changes, from alanine to valine at protein position 4 in the E3 region (the result of a nucleotide change from cytosine to thymine) and from alanine to valine at position 226 in the E1

region. The A226V change, which has been seen in some other recent isolates of CHIKV from Thailand (Pongsiri *et al.*, 2010; Rianthavorn *et al.*, 2010), is known to increase the transmissibility of CHIKV via *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2007). The genome of the CHIKV from female *Ae. albopictus* also showed a synonymous substitution at G10932T.

The detection of CHIKV in wild-caught *Ae. albopictus* in the present study is not convincing proof that *Ae. albopictus* are transmitting the virus in Thailand because the virus detected may have been present, in one or more recent bloodmeals, in one or more of the abdomens of the tested mosquitoes. The presence of the A226V substitution in the CHIKV isolate does, however, support the probability that *Ae. albopictus* are transmitting CHIKV in the study area.

A 39-bp deletion, from positions 11,520–11,558 at the 3' non-translated region, was seen in the genome of the CHIKV from female *Ae. albopictus*. This deletion has not been seen in any other CHIKV sequences. When the relevant fragment (positions 11,520–11,558) was cloned, using the PGEM vector (Promega, Madison, WI), and seven of the resultant clones were sequenced, only five of the clones showed the 39-bp deletion seen in the sequence directly obtained from the PCR product (unpubl. obs.). It is possible, however, that the cultured viruses originated from more than one of the mosquitoes in the positive pool.

A phylogenetic tree based on the E1 gene indicated that the CHIKV isolated in this study was of an East Central/South Africa (ECSA) strain (data not shown). Another tree, based on the whole genome (Fig. 2), also clustered the 'new' isolate with others of the ECSA strain, and indicated that this isolate was very closely related to CHIKV isolates from humans in southern Thailand (GU301781), Singapore (FJ445484), Malaysia (FJ807899) and China (GU199353). The CHIKF in western–

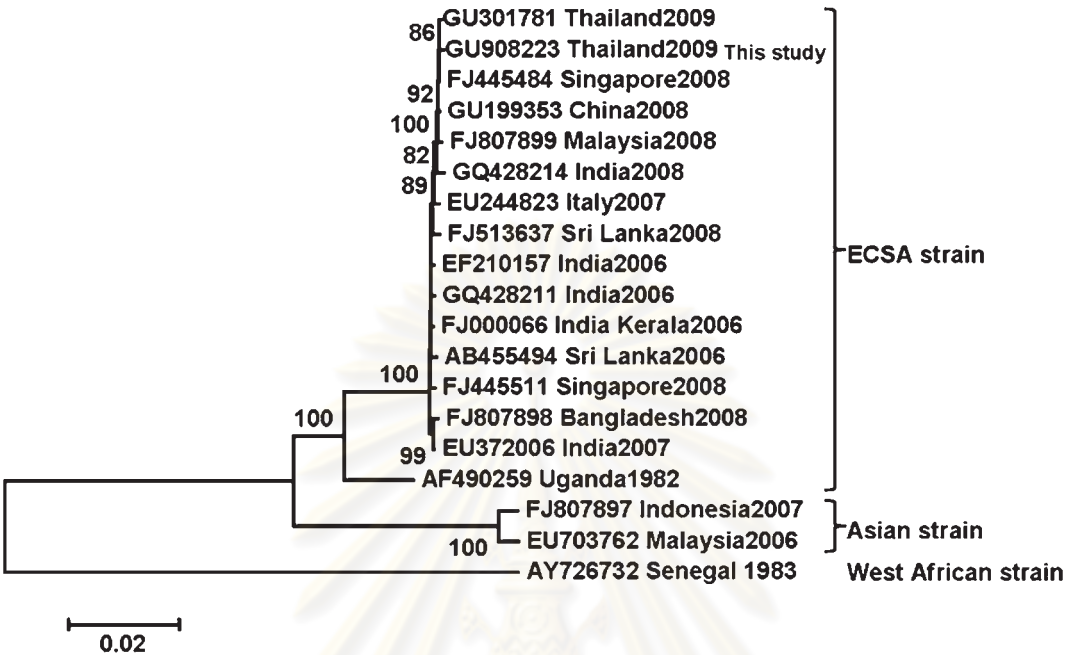


FIG. 2. A phylogenetic tree based on the whole-genome sequences of various isolates of Chikungunya virus, each identified by its GenBank accession number and the country and year of its isolation. The numbers represent the bootstrap support. ECSA, East Central/South Africa.

central Thailand probably represents spread from the south of the country and, previously, from Malaysia.

The most recent outbreak of CHIKF in Thailand began in October 2008, in the south of the country, close to the border with Malaysia, (www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:4499468516694014::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,74552), and soon spread to many provinces in the south (Fig. 1), with some sporadic outbreaks further north. The present study appears to be the first in which the genome of CHIKV from mosquitoes caught in central Thailand has been characterised. The sequence seen shows the same amino-acid changes (nsP2-L539S, nsP4-R82S and E2-K252Q) as seen in the sequences of viruses collected, from cases of CHIKF, in outbreaks in Thailand, Singapore and Malaysia (Ng *et al.*, 2009; Hapuarachchi *et al.*, 2010; present study). Although, in the present study, one of the five pools of

mosquitoes collected in an area of central Thailand affected by CHIKF (i.e. one of the three pools of female mosquitoes) was found infected with CHIKV, the CHIKF in this area remains sporadic, perhaps because the climate during the rainy months, when *Ae. albopictus* generally thrive, is cooler than in the south of Thailand. Attempts to limit transmission in this area, by removing potential breeding sites for the vectors, also seem to have met with some success (www.thaivbd.org/cms/images/situation/mn_chi.pdf). CHIKV has recently been detected in male *Ae. albopictus*, indicating that vertical transmission of this virus may occur (Thavara *et al.*, 2009). Vector control remains a reasonable intervention against CHIKF, however, even if vertical transmission does occur.

ACKNOWLEDGEMENTS. The authors are grateful to the Ministry of Education's Commission on Higher Education, the Center of Excellence in Clinical Virology at

Chulalongkorn University, the Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project, the King Chulalongkorn Memorial Hospital and Mahidol University's Faculty of Tropical Medicine, for their generous support. They also thank P. Hirsch for reviewing the manuscript.

V. AUKSORNKITTI

P. PONGSIRI

A. THEAMBOONLERS

P. RIANTHAVORN

Y. POOVORAWAN

Centre of Excellence in Clinical Virology,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn
University, Bangkok 10330, Thailand

K. MANUJUM

Eighth Office of Disease Prevention and
Control, Ministry of Public Health,
Nakhonsawan 60000, Thailand

N. LUPLERTLOP

Department of Tropical Hygiene, Faculty
of Tropical Medicine, Mahidol
University, Bangkok 10400, Thailand

Received 1 March 2010,

Revised 15 March 2010,

Accepted 16 March 2010

Reprint requests to: Y. Poovorawan.

E-mail: yong.p@chula.ac.th.

REFERENCES

- Charrel, R. N., de Lamballerie, X. & Raoult, D. (2007). *Journal of General Virology*, **356**, 769–771.
- Griffin, D. E. (2001). In *Virology*, 4th Edn, eds Knipe, D. M. & Howley, R. M. pp. 917–962. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Hammon, W. M. & Sather, G. E. (1964). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **13**, 629–641.
- Hapuarachchi, H. C., Bandara, K. B., Sumanadasa, S. D., Hapugoda, M. D., Lai, Y. L., Lee, K. S., Tan, L. K., Lin, R. T., Ng, L. F., Bucht, G., Abeyewickreme, W. & Ng, L. C. (2010). *Journal of General Virology*, in press.
- Johnston, R. E. & Peters, C. J. (1996). In *Fields Virology, Volume 1*, 3rd Edn, eds Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roisman, B. & Straus, S. E. pp. 843–898. Philadelphia, PA: Lippincott Raven.
- Jupp, P. G. & McIntosh, B. M. (1988). In *The Arbovirus: Epidemiology and Ecology, Volume 2*, ed. Monath, T. P. pp. 137–157. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ng, L. C., Tan, L. K., Tan, C. H., Tan, S. S. Y., Hapuarachchi, H. C., Pok, K. Y., Lai, Y. L., Lam-Phua, S. G., Bucht, G., Lin, R. T. P., Leo, Y. S., Tan, B. H., Han, H. K., Ooi, P. L. S., James, L. & Khoo, S. P. (2009). *Emerging Infectious Diseases*, **15**, 1243–1249.
- Pongsiri, P., Auksornkitti, V., Theamboonlers, A., Luplertlop, N., Rianthavorn, P. & Poovorawan, Y. (2010). *Tropical Biomedicine*, in press.
- Rianthavorn, P., Prianantathavorn, K., Wuttirattanakit, N., Theamboonlers, A. & Poovorawan, Y. (2010). *International Journal of Infectious Diseases*, in press.
- Ross, R. W. (1956). *Journal of Hygiene*, **54**, 177–191.
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Veney, M. C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Brehin, A. C., Cubito, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F. A., Zeller, H. & Brisse, S. (2006). *PLoS Medicine*, **3**, e263.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Thavara, U., Tawatsin, A., Pengsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., Molito, C., Chomposri, J., Thammapalo, S., Sawanpanyalert, P. & Siriyasatien, P. (2009). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **40**, 951–962.
- Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Praianantathavorn, K., Wuttirattanakit, N. & Poovorawan, Y. (2009). *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **62**, 303–305.
- Tssetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E. & Higgs, S. (2007). *PLoS Pathogen*, **3**, e201.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล:	นางสาว ปิยธิดา พงษ์ศิริ
เกิด:	10 มิถุนายน 2529
สถานที่เกิด:	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา:	
พ.ศ.2547-2550	วิทยาศาสตร์บัณฑิต(วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2552-2553	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(วท.ม.) หลักสูตรวิทยาศาสตรจารย์ แพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัย

Pongsiri P, Auksornkitti V, Theamboonlers A, Luplertlop N, Rianthavorn P, Poovorawan Y. Entire genome characterization of Chikungunya virus from the 2008-2009 outbreaks in Thailand. *Tropical Biomedicine*, 2010. 27(2):167-176.

Auksornkitti V, Pongsiri P, Theamboonlers A, Rianthavorn P, Poovorawan Y, Manujum K, Luplertlop N. Whole-genome characterisation of Chikungunya virus from *Aedes albopictus* collected in Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2010.104(3):265-269.

Tontulawat, P., Pongsiri, P., Thongmee, C., Theamboonlers, A., Kamolvarin, N. & Poovorawan, Y. (2011) Evaluation of the rapid test for NS1 and anti-Dengue IgM, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of Dengue virus. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. In Press.