

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในยุ้งลายที่เก็บจาก หลายพื้นที่ของ  
ประเทศไทย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Genetic diversity of chikungunya virus with *Aedes* mosquitoes from various geographical regions of Thailand

Mr. Kitsanaphong Thammakosol



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

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส  
ซิกนิกันยาในยุ้งลายที่เก็บจาก หลายพื้นที่ของประเทศไทย  
โดย นายฤทธิพงษ์ ธรรมโกศล  
สาขาวิชา ประสิตวิทยาทางการแพทย์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. วิวรพรรณ สรรประเสริฐ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(พันเอก ศาสตราจารย์ มติรุท มุ่งถิ่น)



# # 5674005330 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS: CHIKUNGUNYA VIRUS / E1 GENE / E1 GENE A226V / CHIKV / AEDES MOSQUITO

KITSANAPHONG THAMMAKOSOL: Genetic diversity of chikungunya virus with *Aedes* mosquitoes from various geographical regions of Thailand. ADVISOR: ASST. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D., 72 pp.

Chikungunya (CHIK) fever is caused by chikungunya virus (CHIKV) through the bite of infected *Aedes* mosquitoes. The outbreak of CHIK fever in Thailand was first reported since 1958 and it re-emerged of CHIKV in the southern region in 2009. Previous reports found that ESCA genotype CHIKV infections in human was reported in Thailand. In this study, we detected CHIKV in natural mosquitoes at the region of *E1: A226V* gene by using Nested RT-PCR technique. The results showed that among 1,285 samples of the mosquitoes collected from 6 provinces in Thailand, 9 samples were CHIKV positive, which 8 samples found mutation at *E1: A226V* gene. In addition, the phylogenetic tree indicated that CHIKV in mosquito samples were India Ocean Clade and East/South African Clade and also present in the ESCA genotype. Data obtained from this study could be used for studying of epidemiology, prevention, and effective control for CHIKV vector in Thailand.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department: Parasitology

Student's Signature .....

Field of Study: Medical Parasitology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณา และความอนุเคราะห์จาก บุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำสั่งสอนแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนเป็นผู้มอบโอกาสในการเรียน การทำวิจัยตลอดการทำงานวิจัย แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทั้งของผู้ทำวิจัย และของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ดร. อัจฉรา ภูมิ ที่คอยแนะนำเทคนิค คอยช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมถึงคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย และขอบคุณสมาชิกนิสิตปริญญาทั้งเอก และโท ผู้ร่วมห้องปฏิบัติการหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมา

อีกทั้งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้โดยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในทุนวิจัยแกนนำของ ศ. นพ. ชีระวัฒน์ เหมะจุธา อีกทั้งได้รับความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างจาก ดร. อุษาวดี ถาวรระ และ ดร. อภิวิทย์ รัชชสิน และเจ้าหน้าที่ฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา กลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และบุคลากร จากหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาการควบคุมป้องกันโรคชุกุนกันยาต่อไป

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	11
สารบัญรูปภาพ.....	12
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	14
บทที่ 1 .....	15
บทนำ.....	15
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	15
1.2 คำถามของการวิจัย .....	16
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	16
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	17
1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	17
1.6 คำสำคัญ .....	18
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย .....	18
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	18
บทที่ 2 .....	19
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อไวรัส.....	19
2.2 วงจรชีวิตของของงูลาย และเชื้อไวรัส ชิคุนกุนยา.....	20
2.3 การติดต่อและอาการของโรค .....	28

2.4 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์ .....	30
บทที่ 3 .....	33
วิธีดำเนินการวิจัย .....	33
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
3.4 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล .....	35
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	35
3.6 การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา.....	37
3.7 การโคลนนิ่งยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	42
3.8 การสกัด Plasmid .....	44
3.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) .....	44
3.10 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis).....	45
3.11 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	45
3.12 การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	45
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	45
บทที่ 4 .....	46
ผลการทดลอง .....	46
4.1 ผลจากการเก็บประชากรตัวอย่าง.....	46
4.2 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสซิกนกันยาด้วยวิธี Nested RT-PCR .....	47
4.3 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) และการทำแผนภูมิ ต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis).....	48
4.4 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม .....	49



บทที่ 5 .....	51
สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	51
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก.....	55
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย .....	55
1. ชุดสกัด viral RNA ของ Invisorb <sup>®</sup> Spin Virus RNA Mini Kit บริษัท STRATTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี .....	55
2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ของ Invisorb <sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two ประเทศ เยอรมนี.....	55
3. สารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT- PCR ใช้ชุดสารละลาย ของบริษัท Invitrogen; SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq .....	55
4. สารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR.....	55
5. ชุดโคลนสำหรับ PCR product (DNA ligation).....	56
6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB agar ปริมาตร 1 ลิตร.....	56
7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SOB ปริมาตร 100 ml และ SOC solution.....	56
8. การเตรียมยา ampicillin 100 mg/ $\mu$ l (stock solution) .....	57
9. การเตรียมสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 1 L.....	58
10. การเตรียม 6X loading buffer.....	58
11. การเตรียมสารละลาย 20 mg/ml X-gal.....	58
12. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG .....	58
13. การเตรียมสารเคมี Medium A เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell.....	59
14. การเตรียมสารเคมี Medium B เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell.....	59
15. การเตรียม competent cell เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA cloning.....	59
16. pGEM <sup>®</sup> - T easy Vector System I, Promega <sup>®</sup> .....	60

ญ

หน้า

ภาคผนวก ข.....	61
รายการอ้างอิง.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	72



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1: แสดง Primer ในส่วนของ ขั้นตอน RT-PCR ซึ่งมีขนาดของ cDNA product 1014 bp	28
ตารางที่ 2: แสดง Primer ในส่วนของขั้นตอน PCR ปกติเพื่อเพิ่มจำนวนของ DNA ที่ได้ ขนาดของ DNA product 539 bp	30
ตารางที่ 3: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR	30
ตารางที่ 4: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	31
ตารางที่ 5: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในขั้นตอน DNA ligation	32
ตารางที่ 6: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการทำ Colony PCR	33
ตารางที่ 7: จำนวนของตัวอย่างยุงลายที่เก็บจากธรรมชาติในแต่ละภาคของประเทศไทย	36
ตารางที่ 8: แสดงผลการเปรียบเทียบ percentage identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลการ ทดลอง กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลอ้างอิง (GenBank : NCBI)	38

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1: ลักษณะทั่วไปของยุง	10
รูปที่ 2: ลักษณะสำคัญในการแยกเพศยุง	11
รูปที่ 3: ลักษณะสำคัญของตัวอ่อนยุง	12
รูปที่ 4: ลักษณะของยุงลายบ้าน ( <i>Aedes aegypti</i> )	12
รูปที่ 5: ลักษณะของยุงลายสวน ( <i>Aedes albopictus</i> )	13
รูปที่ 6: วงจรชีวิตของยุงลาย	13
รูปที่ 7: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงลาย	14
รูปที่ 8: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจาก “ ยุงสู่ยุง ”	14
รูปที่ 9: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจาก “ คนสู่คน ”	15
รูปที่ 10: อวัยวะ และเซลล์เป้าหมายต่างๆของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในมนุษย์	16
รูปที่ 11: โครงสร้างในส่วนของ capsid protein, glycoprotein E1 และ glycoprotein E2	17
รูปที่ 12: การจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา	17
รูปที่ 13: การแสดงผลกราฟ chromatogram จากเครื่อง automate	20
รูปที่ 14: ตัวอย่างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ	21
รูปที่ 15: ตัวอย่างยุงลายที่เก็บได้จากธรรมชาติในแหล่งต่างๆ ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว หรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C	25

- รูปที่ 16: การเก็บรักษาตัวอย่างยูงลายที่ได้ในอุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  หรือ เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 26
- รูปที่ 17: แสดงการคัดเลือกตำแหน่งของ primer ที่จำเพาะกับยีน *E1* : A226V 29
- รูปที่ 18: Agarose gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการทำ Nested RT-PCR 37
- รูปที่ 19: Sequence alignment ของ amino acid ของยีน *E1* ของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่ตรวจพบในตัวอย่างยูงลายทั้ง 9 ตัวอย่าง 38
- รูปที่ 20: Clade และ Genotype ต่างๆ ของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่มีในปัจจุบันเปรียบเทียบกับตัวอย่างงานวิจัยทั้ง 9 ตัวอย่าง 40



## สัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ M	Micromolar
bp	Base pair
CHIKV	Chikungunya virus
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
ddNTP	dideoxyribonucleotide triphosphate
ddH <sub>2</sub> O	deionized distilled water
g	Gram
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Milliliter
mM	Millimolar
cDNA	Complementary DNA
PCR	Polymerase chain reaction
RT- PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
rpm	revolutions per minute
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus หรือ CHIKV) มีโครงสร้างพันธุกรรมแบบ single strand-RNA เป็นไวรัสที่อยู่ในสกุล (genus): *Alphavirus* วงศ์ (family): *Togaviridae* มีความยาวของสาย RNA ประมาณ 11.8 kb ลักษณะของยีนมีส่วนประกอบเป็น 5' cap-nsP1-nsP2-nsP3- nsP4-(junction region)-C-E3-E2-6K-E1-poly (A) 3' <sup>(1)</sup> ซึ่งไวรัสชิคุนกุนยานี้ แบ่งออกได้เป็น 3 genotype คือ West African genotype, East, Central, and South African (ECSA) genotype และ Asian genotype โดยไวรัสชิคุนกุนยาก่อให้เกิดโรคชิคุนกุนยา หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โรคปวดข้อยุลงลาย <sup>(2)</sup> ซึ่งโรคนี้อาจติดต่อโดยยุงพาหะเช่น ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และ ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) โดยเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจะเข้าสู่ตัวยุงผ่านการดูดกินเลือดของผู้ป่วยในระยะไข้สูง เนื่องจากเป็นระยะที่มีเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือด เชื้อไวรัสเดินทางเข้าสู่กระเพาะของยุง เพิ่มจำนวน แล้วเดินทางเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง เชื้อไวรัสจะอยู่ในตัวยุงได้ตลอดจนหมดอายุขัย (ประมาณ 8-10 วัน) <sup>(1)</sup> เมื่อยุงมีเชื้อมาดูดกินเลือดคนหรือสัตว์ก็สามารถทำให้เกิดโรคชิคุนกุนยาได้ โดยอาการของโรคชิคุนกุนยานี้ ผู้ป่วยจะมีไข้ขึ้นสูง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน กล้ามเนื้ออ่อนแรง มีอาการปวดบวมตามข้อ อาจมีการอักเสบบริเวณข้อ หรืออาจเจ็บจนไม่สามารถขยับข้อได้ เนื่องจากเกิดการโค้งงอของข้อ โดยปกติแล้วอาการดังกล่าวจะหายไปเองภายในหนึ่งสัปดาห์ ในผู้ป่วยบางรายอาการปวดข้ออาจกลับมาอีกหลังจากหายไปแล้ว 2-3 สัปดาห์ หรือบางรายอาจมีอาการอยู่นานเป็นปี <sup>(3)</sup>

การวินิจฉัยโรคชิคุนกุนยาทางห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี อาทิเช่น การเพาะเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา การทดสอบปฏิกิริยาน้ำเหลือง เช่น hemagglutination inhibition (HI) <sup>(4)</sup> และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) <sup>(5)</sup> ซึ่งเทคนิคดังกล่าวค่อนข้างใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยากำลังเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาเป็นเทคนิคที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว เช่น เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Real time RT-PCR <sup>(6)</sup> ซึ่งสามารถทำในตัวอย่างผู้ป่วยและตัวอย่างยุงพาหะได้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นการตรวจเพื่อสนับสนุนและใช้ในการศึกษาการระบาดและควบคุมโรคให้ได้ประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้พบเป็นครั้งแรกทางตอนใต้ของประเทศแทนซาเนีย (Tanzania) ในปีคริสต์ศักราช 1952 <sup>(7)</sup> ส่วนในประเทศไทยพบการแพร่ระบาดของเชื้อครั้งแรกในปีคริสต์ศักราช 1958 <sup>(8)</sup> หลังจากนั้นต่อมาได้มีการระบาดของโรคชิคุนกุนยาในประเทศไทยอีกอย่างต่อเนื่อง ตามรายงานการระบาดของสำนักกระบาดวิทยา ในปีคริสต์ศักราช 2009 พบว่า มีผู้ป่วยติดเชื้อโรคชิคุนกุนยาจาก 58 จังหวัดในประเทศไทย เป็นจำนวนกว่า 50,000 ราย <sup>(9)</sup>

ในการศึกษาเกี่ยวกับการระบาดของโรคชิคุนกุนยาในแต่ละประเทศทั่วโลก รวมถึงการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาของเชื้อไวรัส เช่น ในงานวิจัยของ Schuffereenecker I, (2006) ที่พบว่ายีน envelope gene หรือ ยีน E1 ซึ่งเป็นยีนในส่วน structural proteins นั้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงจากเบส alanine เป็น valine ที่ตำแหน่ง 226 (A226V) ซึ่งยีนนี้มีหน้าที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเพิ่มการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้นในแถบคาบสมุทรมุทธรินเดียในปีคริสต์ศักราช 2006<sup>(10)</sup> แม้แต่ในประเทศไทยก็มีการศึกษาวิจัยโดยใช้ยีน E1 เกี่ยวกับการระบาดของโรคชิคุนกุนยาในจังหวัดบึงกาฬ ในปีคริสต์ศักราช 2013 ด้วยเทคนิค RT-PCR ทำให้พบว่า เชื้อไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ตำแหน่งยีน E1 A226V (THA/Bueng Kan strains) และจากการวิเคราะห์ทาง phylogenetic tree ทำให้ทราบอีกว่าเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่พบในจังหวัดบึงกาฬนี้ อยู่ในกลุ่ม ESCA genotype<sup>(11)</sup> อย่างไรก็ตามโรคชิคุนกุนยายังไม่มีวัคซีน หรือยารักษาโรคอย่างเฉพาะเจาะจง จึงต้องรักษาตามอาการ การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของโรคหรือการเฝ้าระวังแมลงพาหะที่ก่อโรคชิคุนกุนยาเป็นสิ่งจำเป็น

ดังนั้นการศึกษานี้ได้ทำการสำรวจยุงลายที่เก็บจากหลายพื้นที่ในประเทศไทยเพื่อศึกษาการติดเชื้อ เปรียบเทียบและวิเคราะห์ความผันแปรและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสชิคุนกุนยาที่พบในยุงลายที่ตำแหน่งยีน E1 A226V โดยใช้เทคนิค Nested RT-PCR และจำแนกความหลากหลายของไวรัสชิคุนกุนยาในยุงลายด้วยรูปแบบแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง ติดตาม การควบคุมและป้องกันโรคชิคุนกุนยาและนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถนำไปใช้ต่อไปในอนาคตได้

## 1.2 คำถามของการวิจัย

- 1.2.1 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน E1 จากตัวอย่างยุงลายที่เก็บจากหลายพื้นที่ของประเทศไทยหรือไม่
- 1.2.2 เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงลายที่เก็บได้จัดอยู่ในกลุ่มใดบ้าง
- 1.2.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในช่วงที่ไม่มีการระบาดแตกต่างจากการตรวจหาเชื้อไวรัสในช่วงที่มีการระบาดอย่างไร

## 1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

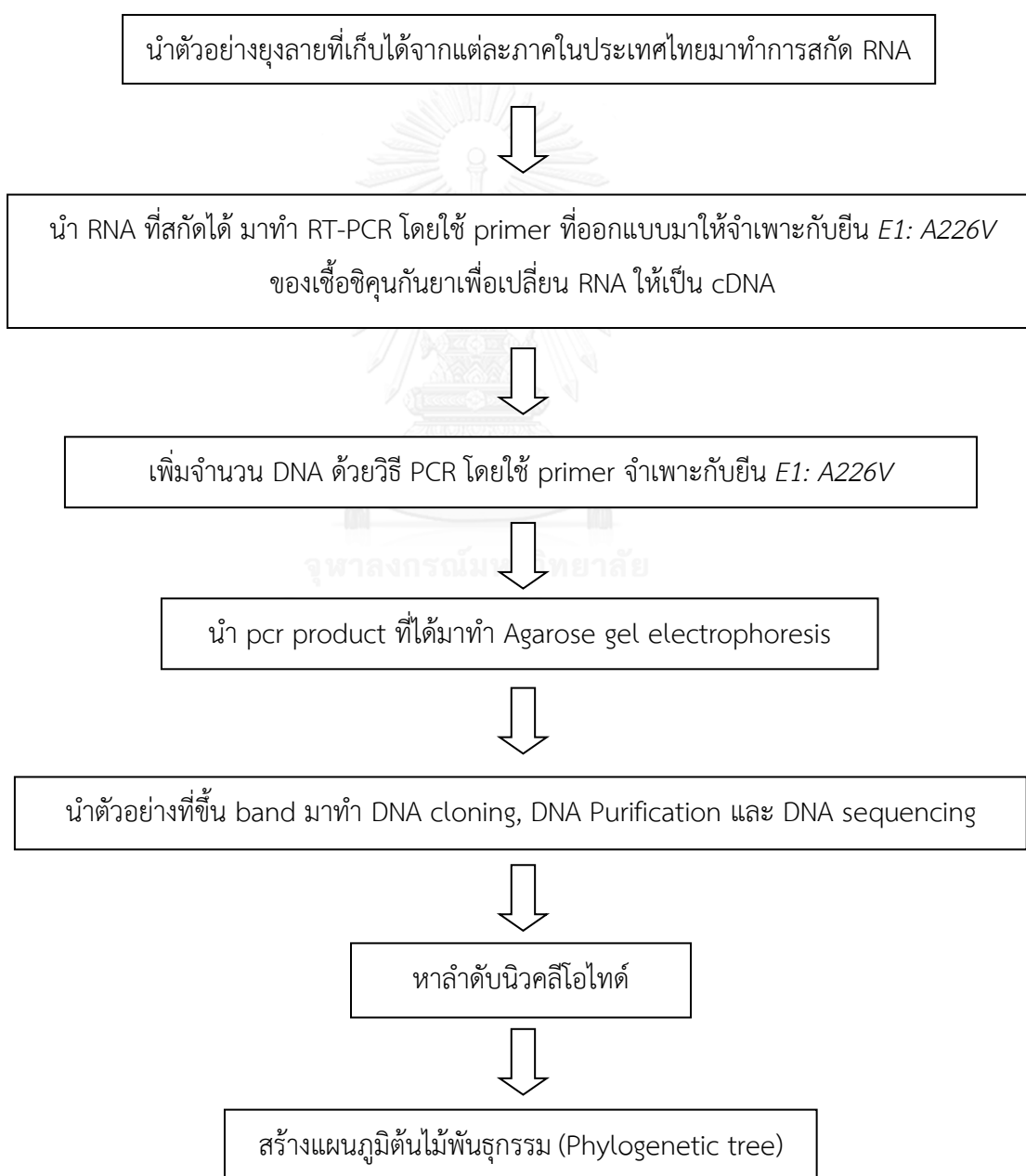
- 1.3.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่ตำแหน่งยีน E1 จากตัวอย่าง ยุงลายที่เก็บจากหลายพื้นที่ในประเทศไทย
- 1.3.2 เพื่อหาความสอดคล้องของอัตราการติดเชื้อชิคุนกุนยาในยุงลายในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ แม้ว่า จะไม่มีรายงานการระบาดของเชื้อไวรัสในขณะนั้นก็ตาม
- 1.3.3 เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาโดยใช้แผนภูมิวิวัฒนาการ Phylogenetic tree



#### 1.4 สมมติฐานของการวิจัย

- 1.4.1 สามารถตรวจหาและจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาที่ตำแหน่งยีน *E1* จากตัวอย่างยุงลายที่เก็บได้ในประเทศไทยด้วยวิธี RT-PCR ได้
- 1.4.2 สามารถจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาที่เก็บจากยุงลายตามธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยจากแผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ Phylogenetic tree ที่ตำแหน่งยีน *E1* ได้

#### 1.5 กรอบแนวความคิดการวิจัย



## 1.6 คำสำคัญ

Chikungunya virus, E1 gene, E1 gene A226V, CHIKV

## 1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

**1.7.1 Chikungunya virus (ไวรัสชิคุนกุนยา)** คือ เชื้อไวรัสในกลุ่ม single strand-RNA มี ยุงลาย (*Ae. aegypti* และ *Ae. albopictus*) เป็นแมลงพาหะ อยู่ใน genus *Alphavirus* family *Togaviridae* มีความยาวของสาย RNA ประมาณ 11.8 kb ลักษณะของยีนมีส่วนประกอบ เป็น 5' cap-nsP1-nsP2-nsP3- nsP4-(junction region)-C-E3-E2-6K-E1-poly (A) 3' เชื้อชิคุน กุนยาแบ่งออกได้เป็น 3 genotype คือ West African genotype, East, Central, and South African (ECSA) genotype และสุดท้ายคือ Asian genotype

**1.7.2 *Aedes aegypti*, *Ae. Albopictus*** คือ ยุงลายบ้าน และยุงลายสวน เป็นแมลงพาหะนำ โรคที่สำคัญของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา อยู่ใน ชั้น (Class) : Insecta อันดับ (Order) : Diptera วงศ์ (Family) : Culicidae สกุล (Genus): *Aedes* มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ใช้เวลาเจริญเติบโตจากไข่-ตัวเต็มวัย ประมาณ 7 – 10 วัน กินเลือด(ยุงตัวเมีย) และน้ำหวานเป็นอาหารหลัก

**1.7.3 Reverse transcription PCR (RT-PCR) คือวิธี**สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) ที่เริ่มต้นจากแม่พิมพ์เป็น RNA จะต้องทำการสังเคราะห์ cDNA (complementary strand DNA) ด้วย reverse transcriptase enzyme ก่อนแล้วจึงนำ cDNA ที่ได้เข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ตามปกติ วิธีนี้จะเรียกว่า Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว จะต้องทำการตรวจดูผลโดยนำ PCR product มา ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

**1.7.4 Phylogenetic tree** เป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการและจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ถ้าสิ่งมีชีวิตที่มีต้น กำเนิดร่วมกันจะมีข้อมูลของโปรตีนและระดับของดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงกัน

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

- 1.8.1 จากผลการทดลองทำให้เราสามารถประเมินสาเหตุของการติดเชื้อชิคุนกุนยาของยุงว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในคนในประเทศไทยได้
- 1.8.2 จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อชิคุนกุนยาอาจทำให้เราเห็นลักษณะการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันของเชื้อในแต่ละจังหวัดของประเทศไทย ใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาค้นคว้าต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของ (+)ssRNA virus

Family: Togaviridae

Genus: Alphavirus

Species: Chikungunya virus

มีความยาวของสาย RNA ประมาณ 11.8 kb ลักษณะของยีนมีส่วนประกอบเป็น 5' caps-nsP1-nsP2-nsP3- nsP4-(junction region)-C-E3-E2-6K-E1-poly (A) 3' <sup>(1)</sup> เชื้อชิคุนกุนยาแบ่งออกได้เป็น 3 genotype คือ West African genotype, East, Central, and South African (ECSA) genotype และสุดท้าย Asian genotype เป็นเชื้อไวรัสที่มีแมลงพาหะนำโรค (Arbovirus) คือ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. Albopictus*) <sup>(12)</sup>

ถิ่นแพร่ระบาดของโรคพบได้ทั้ง อเมริกา ยุโรป แอฟริกา และเอเชีย โดยเฉพาะเอเชีย พบได้บ่อยในอินเดียและแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ <sup>(13-15)</sup> พบการระบาดของเชื้อไวรัสครั้งแรกที่ประเทศแทนซาเนีย (Tanzania) <sup>(7)</sup> ซึ่งภายหลังได้มีการวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ศึกษาการระบาดของโรคชิคุนกุนยาในปีคริสต์ศักราช 2008-2009 ที่ประเทศอินเดีย ซึ่งถือว่าเป็นการระบาดใหญ่ในรอบ 3 ปี มีผู้ป่วยเป็นโรคชิคุนกุนยาเฉลี่ยปีละกว่า 60000 ราย และในเมือง Karnataka มีผู้ป่วยเป็นโรคไวรัสชนิดนี้ถึง 46,510 ราย การศึกษาถึงที่มาของการระบาดของโรค และเพื่อหาทางป้องกันการระบาดในครั้งต่อไปจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทางคณะผู้วิจัยได้ตรวจพบยีนกลายพันธุ์ E1: A226V ในเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่กำลังระบาด รวมถึงสาเหตุของการระบาดมาจากยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ในประเทศอินเดีย <sup>(16)</sup>, ในประเทศอิตาลีนักวิจัยได้ทำการตรวจหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างยุงลายที่จับได้และตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคชิคุนกุนยาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอิตาลี โดยใช้ยีน E1 <sup>(17)</sup>, ในประเทศจีนศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกลายพันธุ์ E1: A226V ของไวรัสชิคุนกุนยาเปรียบเทียบกับระหว่างการระบาดของเชื้อไวรัสที่พบใน Dongguan และ Yangjiang ในมณฑลกวางตุ้งโดยใช้ความสัมพันธ์ของยีน E1: A226V <sup>(18)</sup> และในประเทศไทยพบการแพร่ระบาดของเชื้อครั้งแรกในปีคริสต์ศักราช 1958 หลังจากนั้นได้มีการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในประเทศไทยอีกอย่างต่อเนื่อง เช่น การตรวจหาความสอดคล้องของการระบาดของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาทางภาคใต้ของประเทศไทยกับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์แอฟริกา A226V ระหว่างปีคริสต์ศักราช 2008-2009 โดยใช้วิธี Semi-nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) และ ELISA กับตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่อยู่ในระยะแรกของการติดเชื้อ <sup>(19)</sup>, การตรวจสอบการแพร่ระบาดของโรคชิคุนกุนยา

จากตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยรวมทั้งตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ที่เก็บได้จากภาคใต้ของประเทศไทย โดยเก็บแยกตัวอย่างยุงแบ่งตามสายพันธุ์ และเพศ ซึ่งในตัวอย่างซีรัมทั้งหมดพบตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาประมาณ 50% ในขณะที่ตัวอย่างยุงลาย ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา 5.5–100 % ตามลำดับ และผลการทดลองนี้ยังพบว่า ในตัวอย่างยุงลายเพศผู้ พบเชื้อไวรัสชิคุนกุนยามากกว่าในตัวอย่างยุงลายเพศเมีย แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสภายในประชากรของยุงลายด้วยตัวเอง<sup>(20)</sup>, การตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา พร้อมทั้งหาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ยีน E1 และ E2 จากตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยในภาคกลางของประเทศไทย<sup>(21)</sup> หรือการตรวจหาการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา โดยใช้ยีน E1 กับตัวอย่างซีรัมที่เก็บได้จากผู้ป่วยในจังหวัดบึงกาฬในประเทศไทย<sup>(11)</sup> เป็นต้น

## 2.2 วงจรชีวิตของของยุงลาย และเชื้อไวรัส ชิคุนกุนยา

### 2.2.1 วงจรชีวิตของของยุง

ยุงเป็นแมลงที่จัดอยู่ใน

Phylum Arthropoda

Class Insecta (Hexapoda)

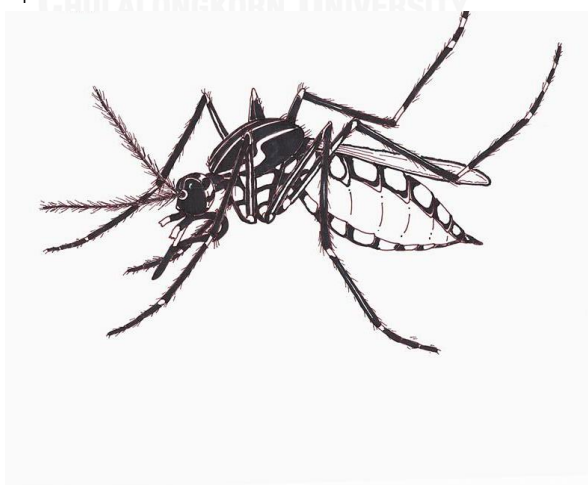
Order Diptera

Suborder Nematocera

Family Culicidae

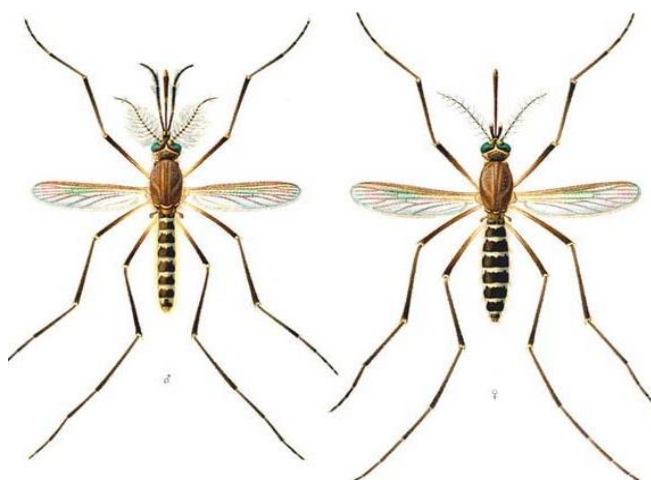
- Subfamily Toxorhynchitinae
- Subfamily Culicinae
- Subfamily Anophelinae

ลักษณะสำคัญทั่วไปของยุงคือ



รูปที่ 1: ลักษณะทั่วไปของยุง

- ร่างกายแบ่งเป็น 3 ส่วน แยกออกจากกันเห็นได้ชัดเจน คือ ส่วน หัว ส่วนอก และส่วนท้อง
- ขา 3 คู่ ปีก 2 คู่ อยู่บริเวณส่วนอก ปีกคู่แรกบางใส ปีกคู่หลังหดเล็กลง เป็นตุ่มเล็ก เรียกว่า halter ทำหน้าที่เกี่ยวกับการทรงตัว (organ of balancer)
- การเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) มีระยะไข่ ระยะตัวอ่อน (ลูกน้ำ) ระยะดักแด้ (ตัวโม่ง) และระยะตัวเต็มวัย
- ลักษณะของปาก เป็นแบบแทงดูด (piercing and sucking)
- ตัวผู้มีหนวดแบบ plumose ตัวเมียมีหนวดแบบเส้นด้าย (pilose) หนวดของยุงมีความสำคัญในการแยกเพศ



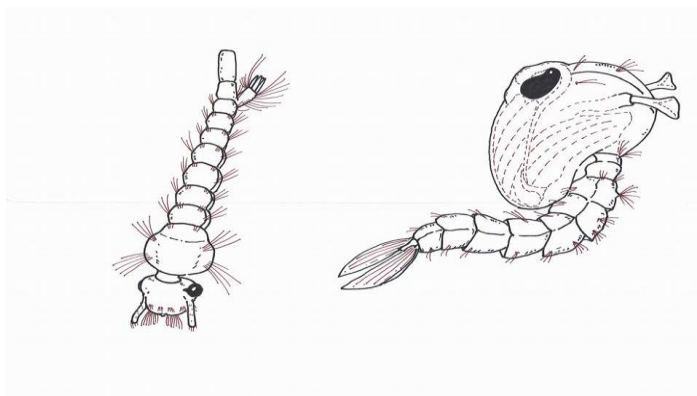
รูปที่ 2: ลักษณะสำคัญในการจำแนกเพศของยุง (ซ้ายเพศผู้, ขวาเพศเมีย)

(<http://www.manager.co.th/asp-bin/Image.aspx?ID=2093585>)

#### Subfamily Culicinae

ยุงใน Subfamily Culicinae หรือ culicines เป็นแมลงพาหะที่สำคัญของ arboviruses เช่น ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) นำโรคไข้เหลือง โรคไข้เลือดออก โรคชิคุนกุนยา (โรคปวดข้อยุงลาย) ยุงบางชนิดเป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (filariasis) เช่น *Culex quinquefasciatus* นำเชื้อ *Wuchereria bancrofti* และ *Mansonia uniformis* นำเชื้อ *Brugia malayi* เป็นต้น

ตัวเต็มวัยของแมลงในวงศ์ Culicinae นี้มี Scentillum เป็น 3 ท่อน (trilobe) ซึ่งแต่ละท่อนจะมีขนแข็ง (bristle) ยื่นออกมา ส่วนท้องจะถูกปกคลุมด้วยเกล็ดซึ่งมีลักษณะกว้าง เรียงตัวในแนวราบ ตัวอ่อนมีท่ออากาศ หรือ siphon ตรงทางชัดเจน ด้านข้างของโคนท่อหายใจจะมี หนามแข็ง (pecten) และตรงท่อหายใจจะมีแผงของขน (hair tuft) 1 อันหรือมากกว่า (รูปที่ 3) ลักษณะการวางไข่ของยุงมีหลายแบบแล้วแต่สายพันธุ์ เช่น เป็นแผงหรือแพ (raft like mass) บนผิวของน้ำ หรือวางเดี่ยวเหนือระดับน้ำ เป็นต้น



รูปที่ 3: ลักษณะสำคัญของตัวอ่อนยุง

Culicines ประกอบด้วยยุงประมาณ 1,700 ชนิด และมากกว่า 20 สกุล ทั่วโลก ซึ่งจากในทั้งหมดนี้พบว่า 2 ใน 3 ส่วนของชนิดยุงเป็นพวกยุงรำคาญ (*Culex*) และยุงลาย (*Aedes*) ยุงใน Subfamily นี้ จัดเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

- *Culex* group
- *Aedes* group
- *Mansonia* group
- *Subethine* group
- *Urotaenia* group

แมลงที่เป็นพาหะนำโรคชิคุนกุนยา คือยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) แมลงทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่ใน ชั้น (Class) : Insecta อันดับ (Order) : Diptera วงศ์ (Family) : Culicidae สกุล (Genus): *Aedes* มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis)



รูปที่ 4: ลักษณะของยุงลายบ้าน: *Aedes aegypti*

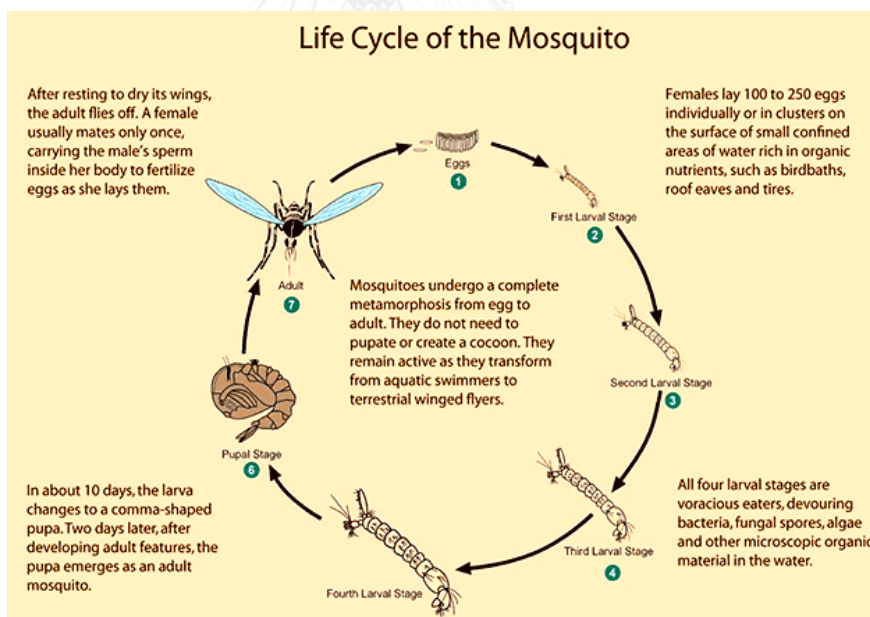
(<http://www.1morenews.com/images/contents/R09PDeSBbO.jpeg>)



รูปที่ 5: ลักษณะของยุงลายสวน: *Aedes albopictus*

(<http://www.straitstimes.com/sites/straitstimes.com/files/20140708/Sgdengue080714e.jpg>)

วงจรชีวิตของยุงลาย หลังจากยุงลายเพศเมียวางไข่ มีช่วงเวลาในการเจริญเติบโตของยุงลาย จะแบ่งเป็น 6 ช่วงด้วยกัน ในช่วงเวลาดังแต่ยังเป็นตัวอ่อน (ลูกน้ำ) ระยะที่ 1 จนถึงระยะที่ 4 นั้น ใช้เวลาในการเจริญเติบโต ประมาณ 7-10 วัน หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งระยะนี้จะใช้เวลาเพียง 2 วัน เพื่อเข้าสู่ระยะโตเต็มวัย (รูปที่ 6)



รูปที่ 6: วงจรชีวิตของยุงลาย

(<http://www.globalpest.com.ph/wp-content/uploads/mosquito-life-cycle.jpg>)

อาหารที่สำคัญคือ เลือดของมนุษย์ (โดยเฉพาะยุงลายบ้าน : Anthropophilic) เลือดของสัตว์เลี้ยงจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ยุงลายสวน Zoophilic; Gratz NG, 2004) น้ำหวานจากเกสรดอกไม้ ช่วงเวลาหากินของยุงลาย คือตั้งแต่ช่วง 9.00 น. – 11.00 น. ลักษณะทางกายภาพส่วนใหญ่ของยุงลายบ้านและยุงลายสวนนั้นคล้ายคลึงกัน แต่ก็สามารถแยกยุงลายทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ง่าย ๆ จากตัวเต็มวัย

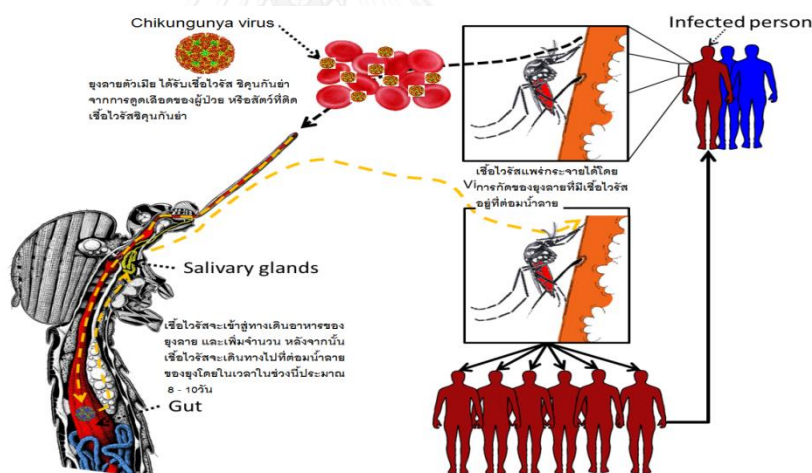
ยุงลายบ้าน : มีลวดลายสีขาวยกเว้นที่ด้านหลังของส่วนอก (รูปที่ 4)

ยุงลายสวน : ลวดลายสีขาวยจะเป็นแถวตรงตลอดแนวสันหลังส่วนอกไม่เป็นแฉกหรือลายอื่นแยกออกมา (รูปที่ 5)

## 2.2.2 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงลาย:

เชื้อไวรัสเข้าสู่ยุงลายเพศเมียได้โดยการดูดกินเลือดของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาอยู่ในกระแสเลือด เชื้อไวรัสจะใช้เวลาในการฟักตัวเพิ่มจำนวนตัวเองอยู่ในทางเดินอาหารของยุงลายเป็นเวลาประมาณ 8-10 วัน ก่อนที่จะเดินทางไปอยู่ที่ต่อมน้ำลาย (รูปที่ 7)



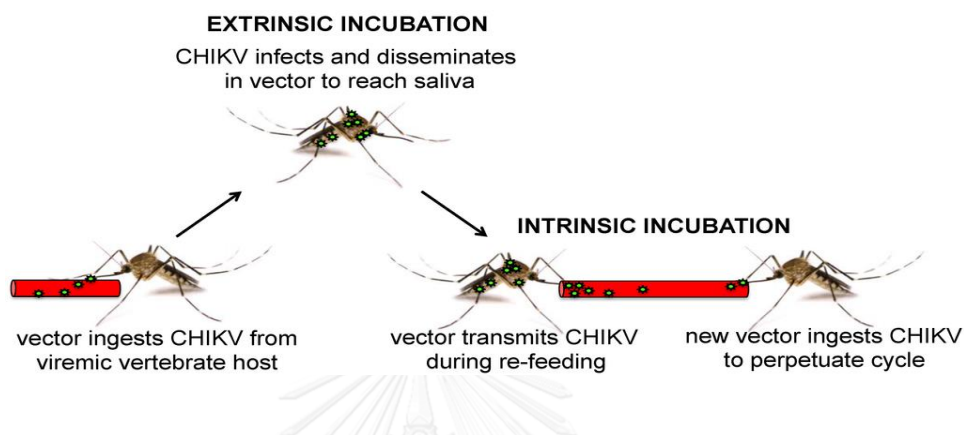
รูปที่ 7: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงลาย

(<http://www.oxitec.com/wp-content/uploads/Dengue-life-cycle.png>)

วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจาก “ ยุงสู่ยุง ” โดยเริ่มต้นจากยุงลายเพศเมียได้รับเชื้อไวรัสจากการดูดเลือดของสัตว์หรือคนที่เป็นโรคชิคุนกุนยา เชื้อไวรัสจะเคลื่อนที่จากทางเดินอาหารของยุงไปอยู่ที่บริเวณต่อมน้ำลาย เมื่อยุงลายที่มีเชื้อไวรัสไปดูดกินอาหารก็จะปล่อยเชื้อไวรัสออกมาพร้อมกับน้ำลาย ยุงลายตัวอื่นที่มาดูดกินอาหารบริเวณนั้นก็จะได้รับเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนมากับน้ำลายของยุงลายที่เป็นพาหะได้โดยง่าย (รูปที่ 8) และจากการศึกษางานวิจัยของ Thavara U et al, (2009) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงไม่จำกัดอยู่เฉพาะในยุง



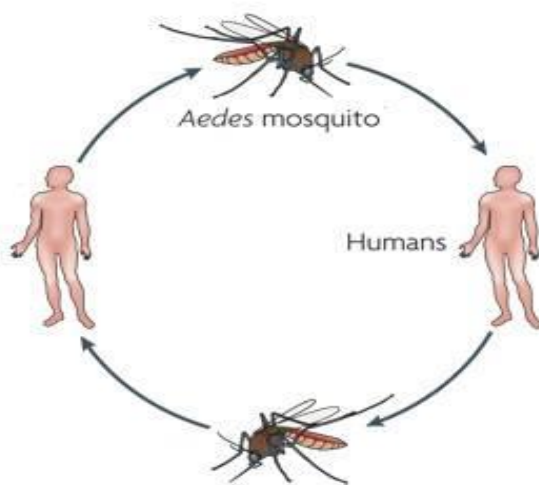
เพศเมียเท่านั้นยังสามารถพบการระบาดของเชื้อไวรัสในยุงลายเพศผู้ได้อีกด้วย ต่อมามีการพิสูจน์แล้วว่าเชื้อไวรัสซิกุนกันยา Indian Ocean Lineage ยังสามารถถ่ายทอดจากแม่ยุง *Ae. aegypti* และ *Ae. albopictus* สู่ลูกยุง *Ae. aegypti* และ *Ae. albopictus* จนกระทั่งรุ่นที่ 5 และ 6 ตามลำดับ โดยที่ยุงไม่ต้องการรับเชื้อจากคนอื่นอีก นอกจากนี้เชื้อยังสามารถถ่ายทอดจากยุงตัวผู้สู่ยุงตัวเมียได้อีกด้วย<sup>(22)</sup>



รูปที่ 8: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจาก “ ยุงสู่ยุง ”

([http://www.mdpi.com/viruses/viruses-06-04628/article\\_deploy/html/images/viruses-06-04628-g002-1024.png](http://www.mdpi.com/viruses/viruses-06-04628/article_deploy/html/images/viruses-06-04628-g002-1024.png))

วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจาก “ คนสู่คน ” โดยมียุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และ ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) เป็นแมลงพาหะ โดยเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจะเคลื่อนที่จากต่อน้ำลายของยุงลายเพศเมียเข้าสู่กระแสเลือดของคนผ่านทาง การดูดกินเลือด และหากยุงลายเพศเมียตัวอื่นมาดูดกินเลือดของคนที่ติดเชื้อก็อาจนำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสต่อไปได้ (รูปที่ 9)

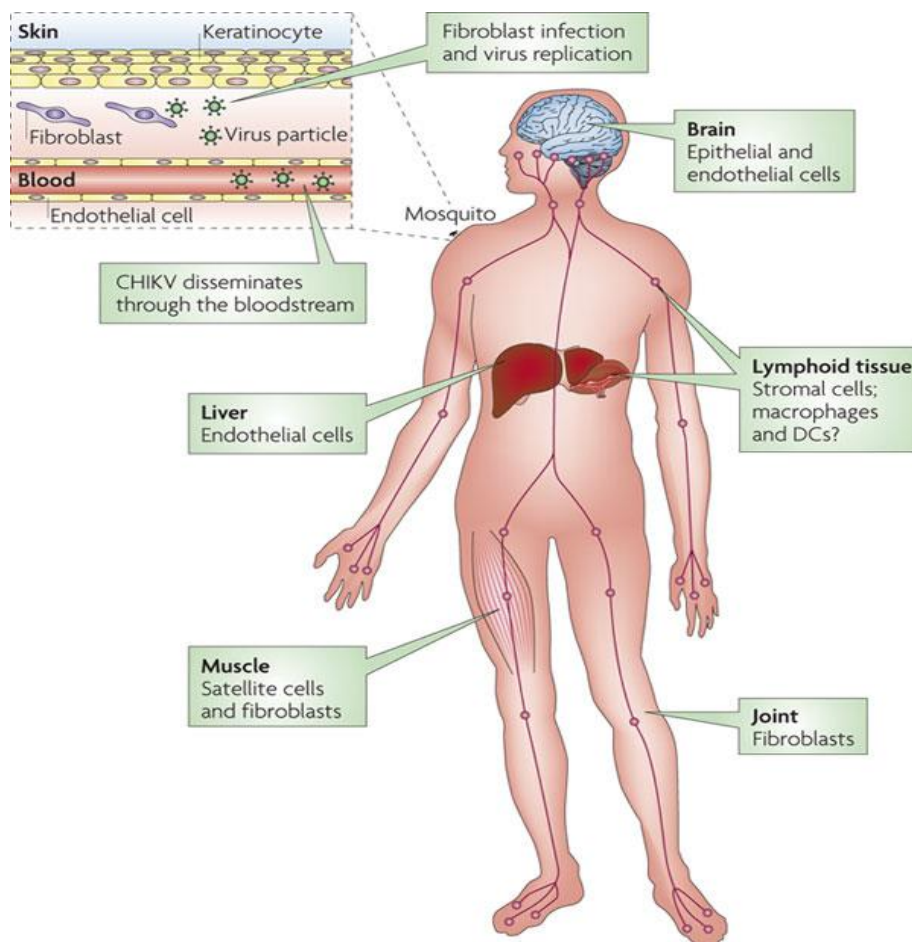


รูปที่ 9: วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจาก “ คนสู่คน ”

(<http://vikaspedia.in/health/diseases/dengue-transmission>)

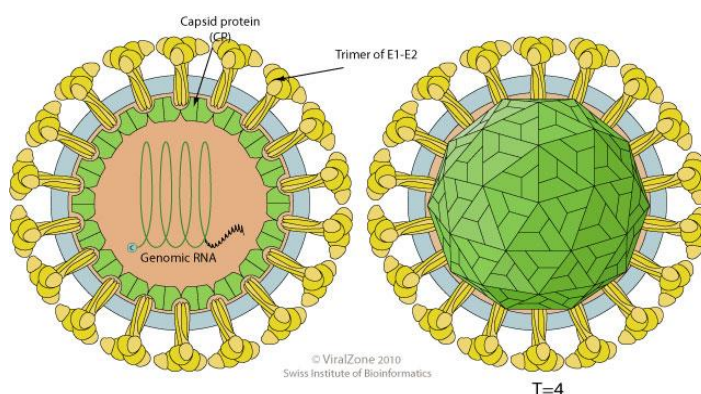
วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสซิกนกันยาในคน และความสำคัญของยีน *E1*:

เมื่อถูกยุงลายเพศเมียที่มีเชื้อไวรัสกัด (รูปที่ 10) เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด มีระยะฟักตัวประมาณ 2-4 วัน จากนั้นเชื้อไวรัสซิกนกันยาจะแพร่กระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกายตามเซลล์ที่เป็นเป้าหมายของเชื้อ<sup>(3)</sup> ได้แก่ epithelial cell, endothelial cell, fibroblast cells<sup>(23)</sup>, muscle satellite cells<sup>(24)</sup>, cells of the joint synovium<sup>(25)</sup>, monocytes cell<sup>(26)</sup> และ macrophages cell<sup>(27)</sup> ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยใช้ โปรตีน *E1* และ *E2* (รูปที่ 11) ซึ่งเป็นโปรตีนในส่วนของ structural proteins (capsid, *E1*, และ *E2*) โปรตีน *E1* (glycoprotein *E1*) ทำให้เชื้อไวรัสมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก<sup>(10)</sup> ช่วยให้เชื้อไวรัสซิกนกันยาสามารถแพร่กระจายเข้าไปอยู่ในเซลล์เป้าหมาย (endocytosis) โดยทำงานคู่กับโปรตีน *E2* (glycoprotein *E2*) มีหน้าที่เป็น protein receptor ระหว่างเชื้อไวรัสซิกนกันยากับเซลล์เป้าหมาย<sup>(28)</sup> (รูปที่ 12)



Nature Reviews | Microbiology

รูปที่ 10: อวัยวะ และเซลล์เป้าหมายต่างๆของเชื้อไวรัสซิกนกันยาในมนุษย์  
(<https://www.nature.com/article-assets/npg/nrmicro/journal/v8/n7/images/nrmicro2368-f2.jpg>)



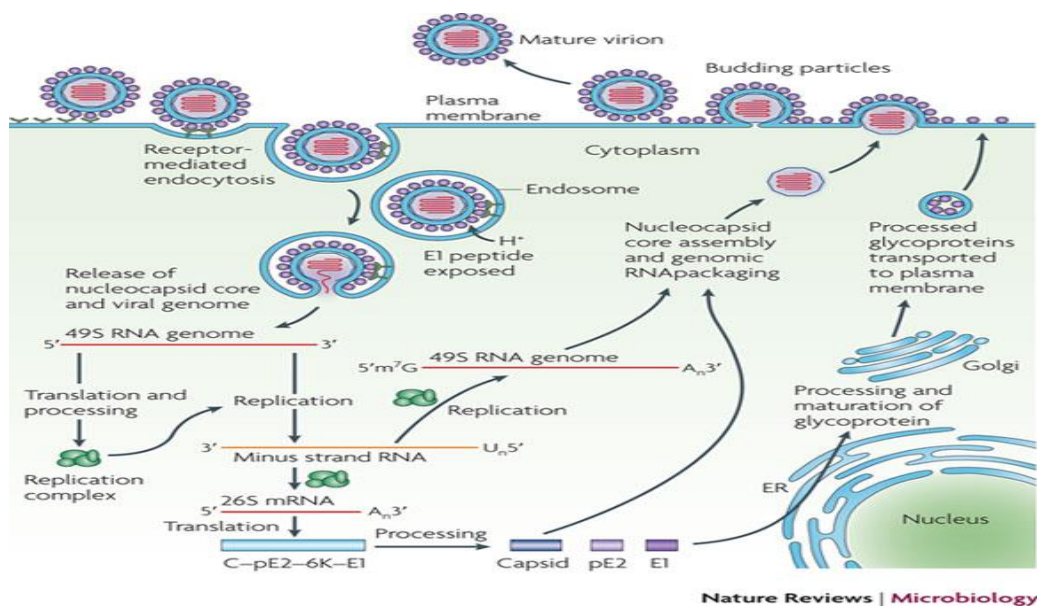
รูปที่ 11: โครงสร้างในส่วนของ capsid protein, glycoprotein *E1* และ glycoprotein *E2*  
(<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n7/images/nrmicro2368-f2.jpg>)

เมื่อเชื้อไวรัสซิกนัยาเคลื่อนที่ไปถึงเซลล์เป้าหมาย จะทำการ endocytosis เข้าไปในเซลล์ ในสถานะที่เป็นกรดของ endosome จะเป็นตัวกระตุ้นโปรตีน *E1* ให้เกิดการ expose ของ envelope ของไวรัส เพื่อปล่อยสารพันธุกรรมออกมา<sup>(29)</sup> และเริ่มกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส โดย mRNA ของไวรัสจะทำการสร้างในส่วนของ non-structural proteins (nsPs) ขึ้นมา ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้าง nsPs1-nsPs4 โครงสร้างในส่วนของ nsPs1 จะมีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์สาย RNA และ RNA capping<sup>(30)</sup> โครงสร้างในส่วนของ nsPs2 จะแสดงให้เห็นในส่วนของ RNA helicase กิจกรรมต่างๆของ RNA triphosphatase (RNA 5'-triphosphatases หรือ RTPases), เอนไซม์ proteinase และ ป้องกันไม่ให้เกิดการจำลองตัวเองของ host cell<sup>(31)</sup>, nsPs3 และ nsPs4 คือส่วนของ replicase unit อื่นๆ และเอนไซม์ RNA polymerase การสร้างโครงสร้างในส่วนของ 5'-cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4 จะมีความยาวประมาณ 2 ใน 3 ของความยาวของสารพันธุกรรมของ RNA ไวรัส<sup>(32)</sup>

การจำลองตัวเองของไวรัสซิกนัยานี้จะแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ (รูปที่ 12)

- 1) การสร้าง nucleocapsid core และ genomic RNA
- 2) การสร้าง glycoproteins

จากความสามารถในการกลายพันธุ์ของ glycoprotein *E1* จะทำให้เชื้อไวรัสซิกนัยาสามารถเกิดกระบวนการจำลองตัวเองในเซลล์ยูกลายสาวนได้ ซึ่งปกติแล้วเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีแมลงพาหะคือยุงลายบ้าน<sup>(10)</sup>



รูปที่ 12: การจำลองตัวเองของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

(<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n7/images/nrmicro2368-i1.jpg>)

### 2.3 การติดต่อและอาการของโรค

ติดต่อสู่มนุษย์โดยมียุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) เป็นแมลงพาหะ เมื่อยุงลายเพศเมียดูดเลือดผู้ป่วยที่อยู่ในระยะไข้สูงซึ่งเป็นระยะที่มีไวรัสอยู่ในกระแสเลือดมาก เชื้อไวรัสจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของยุง และทำการเพิ่มจำนวน จากนั้นเชื้อไวรัสจะเดินทางเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง เมื่อยุงลายที่มีเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาไปดูดกินเลือดเหยื่อรายอื่นก็จะปล่อยเชื้อไวรัสไปยังเหยื่อรายนั้นพร้อมกับน้ำลาย และทำให้เกิดอาการของโรคในเวลาต่อมา แต่สำหรับในทวีปแอฟริกา การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยามีอยู่ 2 วงจรด้วยกัน คือ ชนิตวงจรในเมือง (Urban cycle) เป็นการแพร่เชื้อปกติโดยมียุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) เป็นแมลงพาหะ และชนิตวงจรชนบท (rural cycle or sylvatic cycle) คือวงจรการแพร่เชื้อระหว่าง ผู้ป่วยที่เป็นโรคชิคุนกุนยา ยุงลายที่เป็นแมลงพาหะ และลิง โดยจะมี *Cercopithecus* monkeys หรือ Baboon เป็น amplifier host<sup>(19)</sup> ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสสู่ชุมชนเมืองได้

## โรคซิกุนกันยา แยกออกได้เป็น 2 ระยะ คือ

### ระยะเฉียบพลัน

เป็นระยะแรกเริ่มของการติดเชื้อ ระยะนี้ถือว่าเป็นระยะติดต่อเพราะมีจำนวนของเชื้อไวรัสในกระแสเลือดมาก ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงเฉียบพลัน ปวดหัวอย่างรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดข้อ (ในผู้ใหญ่) บางกรณีก็จะมีผื่นคล้ายจุดเลือดออกตามลำตัว อาการมีไข้สูงจะหายได้เองภายในไม่กี่วัน หรือบางรายอาจใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์

### ระยะเรื้อรัง

ระยะนี้ เป็นระยะที่ผู้ป่วยมีอาการปวดข้อนานเกินสัปดาห์ เป็นเดือน หรือบางรายอาจเป็นปี อายุของผู้ป่วยเองก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อความรุนแรงและอาการของโรค ยิ่งผู้ป่วยที่มีอายุมากอาการดังกล่าวก็จะรุนแรงขึ้นจนอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ อีกทั้งในผู้ป่วยบางรายอาจพบอาการแทรกซ้อนที่หัวใจ ระบบประสาท ทางเดินอาหาร เช่น เกิดการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจ การอักเสบของสมอง และไขสันหลัง เป็นต้น<sup>(33)</sup>

นอกจากนี้ในการประชุมเชิงปฏิบัติการการเฝ้าระวังโรคไข้ปวดข้อยุ่งลายในหญิงตั้งครรภ์และทารก ในปีคริสตศักราช 2009 พบว่า มารดาที่ตั้งครรภ์และป่วยเป็นโรคไข้ปวดข้อยุ่งลาย จำนวน 86 ราย มีทารกที่คลอดจากมารดาตั้งครรภ์ที่ป่วยเป็นโรคไข้ปวดข้อยุ่งลาย จำนวน 26 ราย และมีทารก 10 ราย ที่มีอาการของโรค กล่าวคือ มีไข้สูง (สูงสุด 40 °C) ซ้อบวม ไม่ค่อยขยับตัว มีผื่นขึ้น หายใจเร็วขณะมีไข้ (จากการนำเสนอในการประชุมเชิงปฏิบัติการการเฝ้าระวังโรคไข้ปวดข้อยุ่งลายในหญิงตั้งครรภ์และทารก ในปีคริสตศักราช 2009 ของ พญ.วันทนา ไทรงาม กุมารแพทย์ โรงพยาบาลตรัง, 2009)

### การวินิจฉัย

ใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ตรวจหา IgM หรือ IgG antibody หรืออาจใช้วิธีทางอณูชีววิทยา Reverse transcriptase-polymerase chain reaction ในการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้เช่นเดียวกัน

### การป้องกันโรค

หลีกเลี่ยงการถูกยุงกัด กำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ของลูกน้ำยุ่งลาย ใช้สารไล่แมลง เป็นต้น

### การรักษา

รักษาตามอาการของโรค ไม่มียากิน ยาทา หรือวัคซีนในการรักษาอย่างเฉพาะเจาะจง

## 2.4 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอนุพันธุศาสตร์

### 2.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction หรือ PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA อย่างมีความจำเพาะ ที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยการเลียนแบบกระบวนการธรรมชาติที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ก่อนการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะเริ่มจาก DNA เพียงชิ้นเดียวหรือเซลล์เพียงเซลล์เดียว ปัจจัยสำคัญในการทำ PCR คือต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ปลายทั้ง 2 ข้าง (3' และ 5') ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อที่จะสร้างสาย Primer หรือนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆขนาดประมาณ 18-30 bp จำนวน 2 เส้นที่จำเพาะกับเส้นยีนเป้าหมายที่เราต้องการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ปฏิกิริยา PCR จำเป็นที่ต้องใช้เอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนสำหรับเป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างสาย DNA สายใหม่ โดย DNA polymerase ที่นิยมใช้ได้จากแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนมีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้จะต้องอาศัย  $Mg^{2+}$  เป็น cofactor และนอกจากนี้แล้วปฏิกิริยา PCR ยังต้องการนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดคือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP เป็นสารตั้งต้นและมี buffer เป็นตัวควบคุมให้ปฏิกิริยาอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

ปฏิกิริยา PCR นั้นจะเกิดขึ้นเป็นรอบ (cycle) ซึ่งแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้  
Denaturation

ขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการแยกสายของ DNA สายคู่โดยทำลายโครงสร้างของ DNA ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 95°C เพื่อให้ได้ DNA สายเดี่ยวที่ primer จะสามารถเข้ามาเกาะได้ในขั้นตอนต่อไป

Annealing

เป็นขั้นตอนที่สาย primer เข้ามาเกาะกับสาย DNA ต้นแบบทั้ง 2 เส้น โดยในขั้นตอนนี้จะลดอุณหภูมิลงมาเหลือประมาณ 50-60 °C (อาจมากหรือน้อยกว่านี้ขึ้นอยู่กับความยาวและองค์ประกอบของเส้น primer และอาจเกิดการกลับมาจับคู่กันใหม่ (reannealing) ของ DNA ต้นแบบ แต่เนื่องจาก primer มีขนาดเล็กกว่าสาย DNA ต้นแบบและมีปริมาณที่มากกว่าและเป็นคู่สม (complementary) จึงมีโอกาสที่จะเกิดการจับคู่กับ DNA ต้นแบบได้ก่อน

Extension

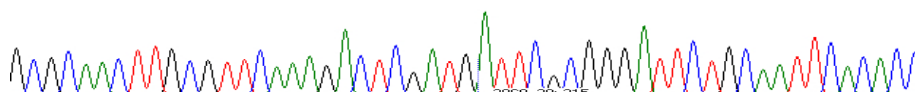
เป็นขั้นตอนในการต่อสายนิวคลีโอไทด์โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้ายที่อยู่ด้านปลาย 3' ของเส้น primer ทั้งสองข้าง โดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 72 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase โดยจะทำการสร้างสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3'

เมื่อครบปฏิกิริยา PCR แล้วจะวนกลับไปเริ่มต้นใหม่จากขั้นตอนแรกโดยจะทำซ้ำประมาณ 30-40 รอบ เราก็จะได้ชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่สนใจ ในปัจจุบันเครื่อง thermocycler ได้มีการพัฒนาให้เพิ่มลดอุณหภูมิได้เร็วขึ้น ซึ่งสามารถเสร็จปฏิกิริยา PCR ได้ในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง โดยปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ได้ในแต่ละรอบของ PCR จะเพิ่มแบบ  $2^n$  โดยเมื่อ  $n$  คือจำนวนของรอบของการทำ PCR

#### 2.4.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sequencing

เทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาย DNA มีการศึกษาและพัฒนาขึ้นหลากหลายวิธี ซึ่งในปัจจุบันพบว่าวิธีที่นิยมมากที่สุดคือวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Frederick sanger *et al.*, (1977) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถเติมนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในรูปของ dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate) ใน DNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นซึ่งจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเกิดการต่อสายไปเรื่อยๆ แต่ถ้ามีการเติม dideoxyribonucleotide triphosphate (ddNTP) จะทำให้ DNA polymerase ไม่สามารถที่จะเติมนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปในการสร้างสายใหม่ได้ เนื่องจากขาดหมู่ OH ที่ตำแหน่ง 3' ในโมเลกุลของน้ำตาลดีออกซีไรโบสซึ่งมีความจำเป็นในการสร้างพันธะ phosphodiester กับ dNTP ตัวถัดไปซึ่งเราเรียกการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการใช้ ddNTP ว่ากระบวนการ dideoxy chain termination DNA sequencing

300 G C C A A C T T G C 310 G T T C A A A G A C T C G A T G A T T C 320 C G C G G G A T T C T G C A A T T C A C A C C 330 340 350



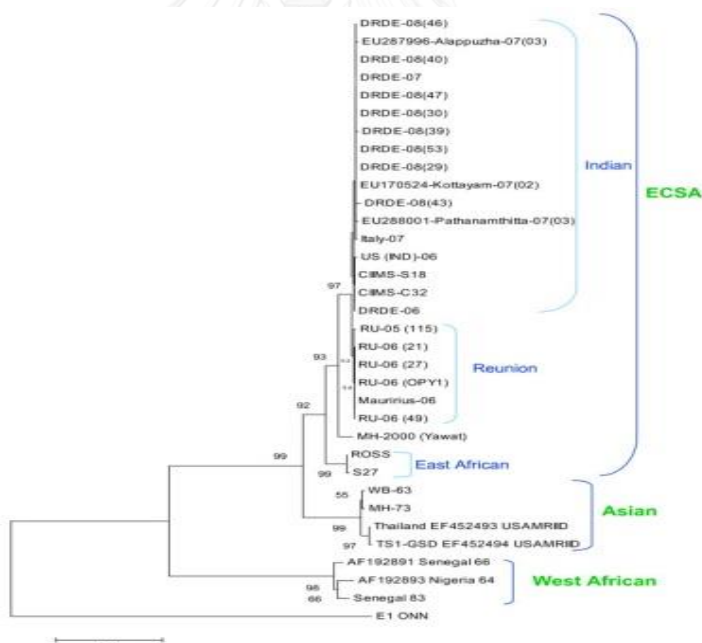
รูปที่ 13: การแสดงผลกราฟ chromatogram จากเครื่อง automate

#### 2.4.3 การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)

การวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) เป็นการศึกษาประวัติหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับของโปรตีน (amino acid) จากยีนชนิดต่างๆของสิ่งมีชีวิต ลักษณะของ phylogenetic tree มีลักษณะคล้ายต้นไม้ซึ่งประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) โดยที่ก้านแต่ละก้านอาจแตกออกเป็นแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ซึ่งตำแหน่งที่ก้านแตกแขนงออกไปเป็นกิ่งย่อยเรียกว่า โหนด (node) โดยที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบสหรือลำดับของโปรตีนของสายพันธุ์หรือ species ของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า แทกซอน (taxon) ซึ่งกลุ่มของแทกซอนที่กำเนิดมาจาก

บรรพบุรุษเดียวกันหรือร่วมกันจะเรียกว่า เคลด (clade) ในการสร้าง phylogenetic tree อาจจะมี clade เพียง clade เดียวซึ่งเรียกว่า monophyletic tree หรือมี clade หลาย clade จะเรียกว่า polyphyletic tree ใน phylogenetic tree อาจมีจุดกำเนิดร่วมหรือมีราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งรวมของ taxa ทั้งหมดสามารถบอกได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดกันมา และรูปแบบที่ไม่มีราก (unrooted tree) ไม่สามารถระบุได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดกันมาไม่สามารถบอกถึงความใกล้ชิดกันหรือความสัมพันธ์กัน เพราะไม่ทราบว่าจะเริ่มต้นวิวัฒนาการอยู่ที่ตำแหน่งใด สำหรับรูปแบบของ phylogenetic tree มี 2 แบบคือ phylogram ซึ่งเป็น tree ที่มีความยาวของกิ่งไม่เท่ากันจะแสดงถึงระยะเวลาในการเกิดวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน แบบที่ 2 เรียกว่า cladogram ซึ่งจะบอกเพียงลำดับของ taxon แต่ไม่แสดงระยะเวลาที่เกิดวิวัฒนาการ<sup>(34)</sup>

การสร้าง phylogenetic tree ยังสามารถนำมาใช้ศึกษาทางด้านระบาดวิทยาและการควบคุมโรคติดต่อ หรือใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของ species ใหม่ที่เพิ่งถูกค้นพบ หรือ species ที่ยังไม่มีการศึกษา เป็นต้น



รูปที่ 14: ตัวอย่างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ<sup>(35)</sup>



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Veriti บริษัท GenPlus® ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Master Cyclern PROS บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
3. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C รุ่น LG บริษัท LG® ประเทศไทย
4. ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C รุ่น Whirlpool บริษัท Sanyo® ประเทศไทย
5. ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C รุ่น Forma 900 series บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker รุ่น Innova®43 บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5430 R บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5417 R บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี
9. เครื่องไมโครเวฟ, รุ่น LG บริษัท LG ประเทศจีน
10. เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex รุ่น FINEVORTEX (FinePCR) ประเทศเกาหลี
11. เครื่อง Dry bath Incubator บริษัท Cleaver Scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เครื่อง gel electrophoresis รุ่น Biorad sub-cell® RT บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องถ่ายรูป gel documentation รุ่น Gel Doc™ XR บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000c บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. เครื่องซั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius ประเทศเยอรมนี
16. เครื่อง Autoclave (ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HIRAYAMA HA-3D ประเทศญี่ปุ่น
17. เครื่อง Autoclave (ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HVE-50 ประเทศญี่ปุ่น
18. ตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย บริษัท Memmert
19. ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR cabinet) รุ่น PCR-01 ประเทศไทย

20. ไมโครปิเปตขนาด 0.1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000  $\mu\text{l}$  บริษัท eppendorf® ประเทศเยอรมนี

### 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml บริษัท ExtraGene, Inc®
2. หลอด PCR ขนาด 0.2 ml บริษัท ExtraGene, Inc®
3. ปิเปตทิป ขนาด 0.1-10, 200 และ 1000  $\mu\text{l}$
4. หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml
5. ปากคีบ (forceps)
6. ถูมมือยาง
7. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
8. Loop เขี่ยเชื้อและ spreader
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100, 500 และ 1000 ml
11. กล้องโคมสำหรับใส่น้ำแข็ง
12. นาฬิกาจับเวลา
13. กระดาษทิชชูสำหรับทำความสะอาด
14. หยอดหยด (dropper)
15. พาราฟิล์ม (parafilm)
16. ครอบแก้วตัวอย่าง แบบฝาเกลียว
17. หลอดทนความเย็น (cryotube) ขนาด 1.8 ml

### 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ใช้ชุดสกัด viral RNA ของ Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี
2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี)
3. ชุดโคลนสำหรับ PCR product บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. ชุดสารละลายของบริษัท Invitrogen; SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq.
5. ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR บริษัท Biorline ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB medium)
7. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร SOB และ SOC medium

8. สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ )
9. สารเคมีสำหรับเตรียม gel electrophoresis
10. Ethanol ความเข้มข้น 70% และ 95%
11. Liquid nitrogen

หมายเหตุ: รายละเอียดและวิธีการเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก

### 3.4 โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 3.4.1 BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9

เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และอ่านกราฟ chromatogram จากผล sequencing และสามารถวิเคราะห์ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยแสดงค่าออกเป็นค่า sequence identity matrix

#### 3.4.2 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA 6.0)

เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

#### 3.4.3 Nucleotide blast (BLASTN)

ใช้ในการวิเคราะห์ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะเทียบกับลำดับนิวโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล genbank

#### 3.4.4 BankIt

เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้สำหรับส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อขอเลขทะเบียน (accession number) เพื่อเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

### 3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.5.1 ประชากรและการสุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างยุงลายโดยใช้กระบอกเก็บที่มีฝาปิดมิดชิด หลังจากนั้นนำยุงลายที่เก็บได้ไปใส่ใน cryogenic tube เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อไวรัสซิกกันยาในยุง ได้อาศัยข้อมูลจากการตรวจพบเชื้อซิกกันยาของตัวอย่างยุงที่ผ่านมาของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นข้อมูลเปรียบเทียบโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10%

การคำนวณขนาดตัวอย่างจากสูตรของ William Gemmell Cochran

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}{e^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (0.1) \times (0.9)}{(0.015)^2}$$

$$= 1083 \text{ ตัวอย่าง}$$

n = ขนาดตัวอย่าง

$\alpha$  = ค่าความผิดพลาดในการสรุปผลอ้างอิงจากตัวอย่างประชากร

Z = confidence coefficient ได้จากระดับความเชื่อมั่นที่

กำหนด ( $1-\alpha$ ) กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ  $\alpha = 0.05$

( $Z_{\alpha/2} = 1.96$ )

P = ค่าสัดส่วนจากการศึกษาที่ผ่านมา

e = ค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยอมรับได้ระหว่างสัดส่วนใน

ประชากร กำหนดให้ e = 0.015 (ยอมรับให้เกิดความ

คลาดเคลื่อนได้ 1.5 %)

การสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละจังหวัดอาศัยข้อมูลการระบาดของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, MoPH, Thailand.) ตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 2013-2016 (ภาคผนวก ข.) (<http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/disease.php?dcontent=old&ds=84.2016>)



รูปที่ 15: ตัวอย่างยูงลายที่เก็บได้จากธรรมชาติในแหล่งต่างๆ ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว หรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$



รูปที่ 16: การเก็บรักษาตัวอย่างยุงลายที่ได้ในอุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  หรือ เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว

### 3.6 การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา

#### 3.6.1 การสกัด RNA (ใช้ชุดสกัด viral RNA ของ Invisorb<sup>®</sup> Spin Virus RNA Mini Kit)

1. นำหลอดปริมาตร 1.5 ml ที่มีตัวอย่างยุงลาย ใส่ Lysis Buffer RV ปริมาตร 600  $\mu\text{l}$  พร้อมทั้ง Carrier RNA และ Proteinase K อย่างละ 20  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที
2. ใส่ Binding solution 400  $\mu\text{l}$  ใช้ปิเปตดูดสารขึ้นลงเบาๆ หรือใช้ เครื่อง Vortex เพื่อให้สารละลายเข้ากัน
3. เปลี่ยนถ่ายสารละลายที่ได้ปริมาตร 650  $\mu\text{l}$  ลงใน RTA Spin Filter บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 1 นาที
4. เทส่วนใสทิ้ง นำ RTA Spin Filter ที่ได้ ไปใส่ใน RTA Receiver Tube อันใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 1 นาที
5. เติม Wash Buffer R1 600  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำ RTA Spin Filter ที่ได้ ไปใส่ใน RTA Receiver Tube อันใหม่
6. เติม Wash Buffer R2 600  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำ RTA Spin Filter ที่ได้ ไปใส่ใน RTA Receiver Tube อันใหม่ (ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง)
7. ปั่นแห้งที่ความเร็ว 12,000 rpm 4 นาที เพื่อเป็นการกำจัด Ethanol ที่หลงเหลืออยู่ แล้วนำส่วน RTA Receiver Tube ทิ้ง
8. นำ RTA Spin Filter ไปใส่ใน RNase free 1.5 ml Elution Tube ที่เตรียมไว้ เติม Elution Buffer R (ที่เตรียมไว้ในอุณหภูมิ  $80^{\circ}\text{C}$ ) ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ให้ลงตรงบริเวณ membrane ของ RTA Spin Filter บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
9. เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm 1 นาที ทิ้ง RTA Spin Filter แล้วนำ RNA ที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น RNA ต้นแบบ ต่อไป

### 3.6.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงหาปริมาณและประเมินคุณภาพของ DNA โดยใช้เครื่องเครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารละลาย (Nanodrop)

นำสารละลาย DNA ที่ได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop2000 (Thermo Scientific, USA) โดยเครื่องจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 (ความยาวคลื่นมากที่สุดที่ DNA สามารถดูดกลืนแสงได้) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร อัตราส่วนของความยาวคลื่นทั้งสอง ( $A_{260}/A_{280}$  ratio) ต้องอยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 ถ้าวัดค่าดูดแสงแล้วค่าอัตราส่วนมีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่าตัวอย่างสารละลาย DNA ที่ได้มีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ แต่ถ้ามียค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนของ RNA ในสารละลาย

### 3.6.3 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี RT-PCR และ PCR

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA ของยีนที่เราสนใจให้มีจำนวนมากพอที่จะไปหาลำดับเบสได้ โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายนั้น ในสภาวะที่เหมาะสม เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเรียบร้อยแล้วนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel electrophoresis ต่อไป

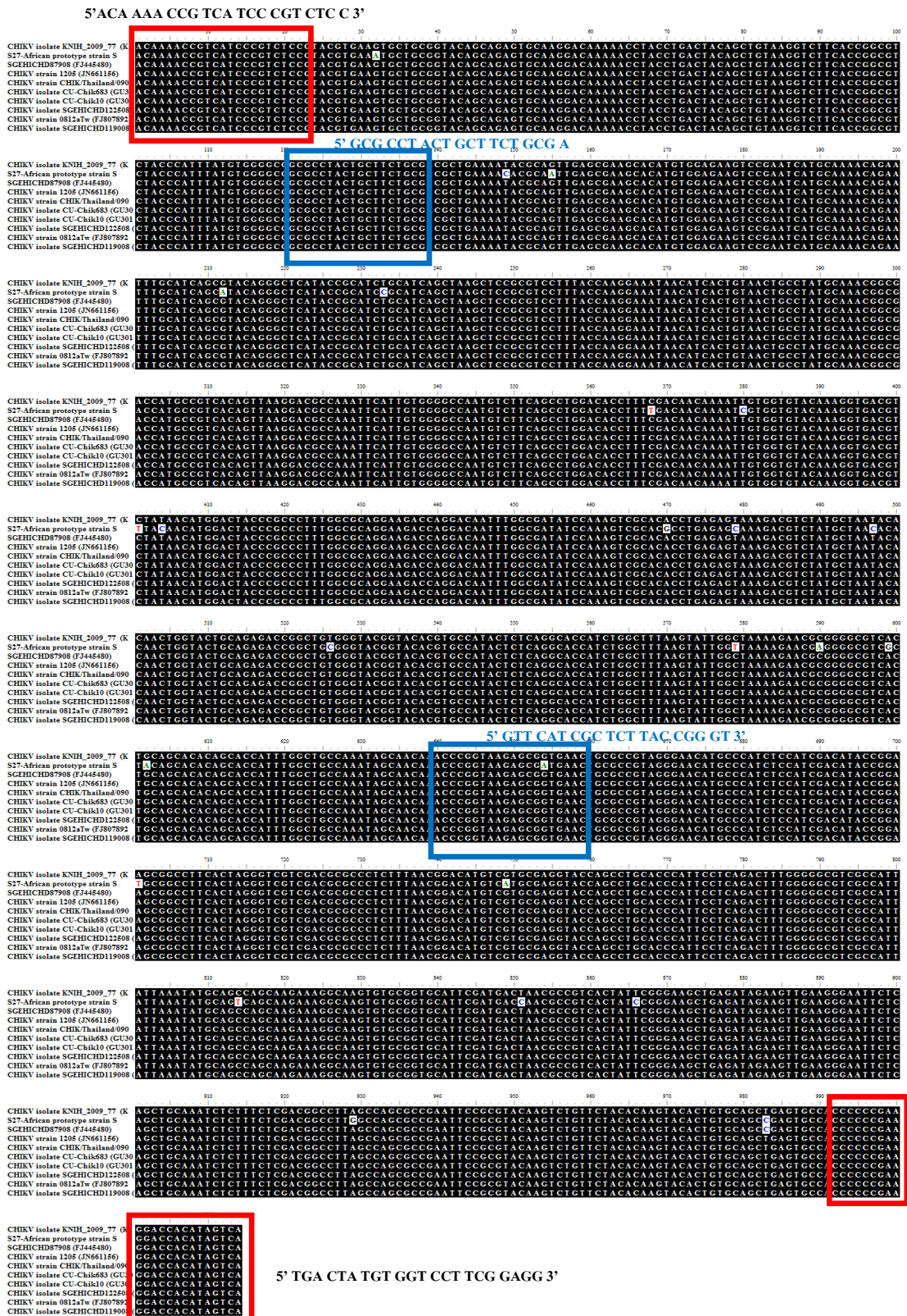
#### 3.6.3.1 การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

ตารางที่ 1: แสดง Primer ในส่วนของ ขั้นตอน RT-PCR ซึ่งมีขนาดของ cDNA product 1014 bp<sup>(35)</sup>

Primer	5' → 3'
CHIKV 10145 (Forward)	ACA AAA CCG TCA TCC CGT CTC C
CHIKV 11158 (Reverse)	TGA CTA TGT GGT CCT TCG GAG G

ขั้นตอนการออกแบบ Primer ในส่วนของขั้นตอน PCR มีดังนี้

1. ค้นหา sequence จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ไปที่ช่อง search เลือก nucleotide พิมพ์คำว่า Chikungunya E1 gene จากนั้นคลิกที่ FASTA เพื่อดูลำดับเบสของ Chikungunya เมื่อได้ลำดับเบสแล้วให้ทำการคัดลอกไฟล์ที่อยู่ในรูปแบบ FASTA ไปวางในโปรแกรม Notepad บันทึกไฟล์ให้อยู่ในรูปแบบของ .txt
2. เปิดโปรแกรม ClustalX2 คลิกที่ File เลือก Load Sequences
3. คลิกที่ Alignment เลือก Do Complete Alignment หลังจากนั้นทำการ save sequence โดยทำการเลือก format ให้อยู่ในรูปแบบของ GCG/MSF
4. นำไฟล์ที่บันทึกไว้มาเปิดโดยใช้โปรแกรม GENEDOC แล้วทำการ Copy Select Block to Bitmap เลือก Copy 256 Color DIB นำไปวางในโปรแกรม Microsoft word เพื่อเลือกตำแหน่งของ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่เราสนใจ (รูปที่ 17.)



รูปที่ 17: แสดงการคัดเลือกตำแหน่งของ primer ที่จำเพาะกับยีน E1 : A226V

ตารางที่ 2: แสดง Primer ในส่วนของขั้นตอน PCR ปกติเพื่อเพิ่มจำนวนของ DNA ที่ได้  
ขนาดของ DNA product 539 bp

Primer	5' → 3'
CHIKV F. (Forward)	GCG CCT ACT GCT TCT GCG A
CHIKV R. (Reverse)	GTT CAT CGC TCT TAC CGG GT

ตารางที่ 3: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR  
ชุดสารละลาย ของบริษัท Invitrogen; SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq

Reaction Component	Volume ( $\mu$ l)
2xBuffer	12.5
Primer F.	0.7
Primer R.	0.7
RT-Taq	1
ddH <sub>2</sub> O (RNA)	4.1
RNA template (80 ng/ $\mu$ l)	6
<b>Total</b>	<b>25</b>

ปฏิกิริยาที่ใช้ในขั้นตอน RT-PCR

50 °C	30 min (Reverse transcription phase)	
95 °C	15 min	
95 °C	1 min (Denaturation)	} 40 cycles
64 °C	1 min (Annealing)	
72 °C	1 min (Extension)	
72 °C	10 min (Final extension)	



ตารางที่ 4: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Reaction Component	Volume ( $\mu$ l)
10x PCR Buffer	2.5
25mM dNTPs	2.5
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
10 $\mu$ M Primer F.	0.4
10 $\mu$ M Primer R.	0.4
Taq.DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)	0.2
ddH <sub>2</sub> O	14.5
DNA template (100 ng/ $\mu$ l)	2
<b>Total</b>	<b>25</b>

#### ปฏิกิริยาที่ใช้ในขั้นตอน PCR

95 °C	3 min.		} 40 cycles
95 °C	30 sec.	(Denaturation)	
62 °C	30 sec.	(annealing phase)	
72 °C	1 min.	(Extension)	
72 °C	7 min.	(Final extension)	

#### 3.6.4 Agarose gel electrophoresis

เป็นการตรวจและวิเคราะห์ผลของ PCR product โดย Agarose gel electrophoresis เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้น สำหรับแยก DNA ขนาดต่างๆ ซึ่ง DNA นั้นมีประจุลบ จะเคลื่อนที่ไปสู่ด้านที่มีประจุบวก DNA ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า DNA ขนาดใหญ่ จากนั้นจะนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide โดย Ethidium bromide จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างสาย DNA เมื่อนำไปส่องด้วยแสง Ultraviolet จะทำให้สามารถมองเห็นแถบของ DNA ได้ ซึ่งเราจะทราบขนาดของ DNA โดยการเปรียบเทียบกับ DNA marker ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของ PCR product ได้

### 3.7 การโคลนนิ่งยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.7.1 DNA ligation

เป็นการนำ DNA ที่เราสนใจมาเชื่อมต่อกับ Plasmid vector (มีปลายสาย DNA เป็นเบส T: thymine ติดที่ปลาย 3' OH ของทั้งสองข้าง เรียกว่า T-overhang) โดยใช้โดยเอนไซม์ T<sub>4</sub> DNA ligase เกิดเป็น Recombinant DNA ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I ของบริษัท Promega: USA

ตารางที่ 5: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในขั้นตอน DNA ligation

Reaction Component	Volume (μl)
2X Rapid Ligation Buffer	5
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector (50 ng/μl)	1
PCR product (50 ng/μl)	2
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	1
Nuclease-free water	1
<b>Total</b>	<b>10</b>

#### 3.7.2 Transformation

เป็นขั้นตอนที่นำ Recombinant DNA ที่ได้เข้าสู่โฮสต์เซลล์โดยใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli DH5α* ซึ่งมีความพร้อมสำหรับการนำ Recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ (competent cell) เพื่อเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมาก โดยเริ่มจากเตรียมแบคทีเรีย competent cell มาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นดูด competent cell ปริมาตร 100 μl ใส่ลงในหลอดที่มี Recombinant DNA แช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 45 วินาที เพื่อให้ Recombinant DNA ถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell แล้วรีบนำใส่ในน้ำแข็งทันทีโดยทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดให้เติมอาหารเหลว SOC medium (SOB Medium+ MgSO<sub>4</sub>+ MgCl<sub>2</sub>+ Glucose) หลอดละ 200 μl นำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง ระหว่างนั้นนำ LB agar ที่มียา Ampicillin 100 μg/ml ใส่ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ปริมาตร 50 μl และ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ปริมาตร 60 μl ผสมให้เข้ากันดูดสารใส่ลงใน plate แล้ว spread ให้ทั่วทั้ง plate จนแห้งแล้วนำเข้าตู้บ่มที่ 37 °C เมื่อบ่มเชื้อเสร็จแล้วนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาดูดใส่ LB agar plate ที่เตรียมไว้ spread ให้ทั่วทั้ง plate นำไปบ่มที่ 37 °C ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูโคโลนีสีฟ้า-ขาว คัดเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

### 3.7.3 การคัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่มี Recombinant DNA (Blue/white Screen)

โคโลนีสีขาวนั้นจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียา Ampicillin เนื่องจากพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector มียีนที่ดื้อต่อยา Ampicillin และมียีน *lac Z* ที่ผลิตเอนไซม์ เอนไซม์  $\beta$  - galactosidase โดยเอนไซม์  $\beta$  - galactosidase จะทำการย่อยสาร X-Gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า เมื่อชิ้นส่วน DNA เข้าไปแทรกตรงบริเวณ clone insert ทำให้ส่วนของยีน *lac Z* ถูกแยกออกจากกัน ยีน *lac Z* จึงไม่สามารถทำงานได้ทำให้ไม่มีการผลิตเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ดังนั้นเมื่อไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อย X-Gal จึงทำให้เกิดเป็นโคโลนีสีขาว และด้วยเหตุนี้เองทำให้เราสามารถแยกโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับ plasmid ที่มียีนที่เราต้องการ ออกจากโคโลนีของแบคทีเรียที่มี plasmid แต่ไม่มียีนที่เราต้องการได้

### 3.7.4 การทำ Colony PCR

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมาย เพื่อการตรวจสอบโคโลนีที่เราเลือก ว่า มีชิ้นส่วน DNA ที่เราสนใจแทรกอยู่จริงหรือไม่ โดยใช้โคโลนีสีขาวที่ต้องการยืนยันเป็น DNA template ซึ่งในการทำโคโลนี PCR นี้ จะลดปริมาตรรวมทั้งหมดเหลือ 10  $\mu$ l โดยจะนำไปจุ่มฟันทัดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar สำหรับเป็น Master plate เพื่อนำไปเลี้ยงลง LB broth ที่มีส่วนผสมของ Ampicillin 100  $\mu$ g/ml และใช้ในการสกัดพลาสมิดต่อไป หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ DNA โดยการแยกขนาดของ DNA ใน Agarose gel electrophoresis แล้วนำเจลที่ได้ไปตรวจดูภายใต้แสง Ultraviolet ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ DNA หลังจากนั้นทำการเก็บรวบรวมข้อมูล เพื่อนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 6: ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการทำ Colony PCR

Reaction Component	Volume ( $\mu$ l)
10 X PCR Buffer	1
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1
25 mM dNTPs	1
(10 $\mu$ M) Primer COI-F	0.3
(10 $\mu$ M) Primer COI-R	0.3
Taq polymerase (5U/ $\mu$ l)	0.1
ddH <sub>2</sub> O	6.3
<b>Total</b>	<b>10</b>

### 3.8 การสกัด Plasmid

เป็นการสกัด DNA Plasmid จากตัวอย่างที่ได้ ให้มีความบริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนการสกัดตามบริษัท Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Stratec Molecular GmbH, Berlin)

#### ขั้นตอนการสกัด Plasmid

1. นำเชื้อแบคทีเรีย (*E. coli* strain DH5 $\alpha$ ) ที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ความเร็วรอบ 11,000 rpm เวลาประมาณ 3 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง (ปั่นตกตะกอนประมาณ 3 ครั้ง)
2. ใส่สาร Solution A ปริมาตร 250  $\mu$ l เขย่าโดยใช้ Vortex เพื่อทำการละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ใส่สาร Solution B ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมขึ้นลงเบาๆประมาณ 4-6 ครั้ง
4. ใส่สาร Solution C ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายส่วนใสใส่ลงในเซตตัวกรอง (Spin filter) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง
6. ทำการล้างตะกอนของ DNA Plasmid โดยใส่ Wash solution ปริมาตร 750  $\mu$ l จากนั้นปั่นล้างตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง
7. ปั่นแห้งด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเอา ethanol ออก
8. ย้ายตัวกรองใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่ elution solution ปริมาตร 50  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลา ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. เมื่อได้ DNA Plasmid แล้วนำไปวัดความเข้มข้นเครื่อง Nanodrop2000 (Thermo Scientific, USA) จากนั้นแบ่งสารละลายที่มี DNA Plasmid ปริมาตร 30  $\mu$ l เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

### 3.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing)

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้บริการตรวจวิเคราะห์จากบริษัท GENEWIZ, Inc (ประเทศสิงคโปร์) โดยมีบริษัท Prima Scientific CO.,LTD. เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ เป็นตัวกลางในการจัดส่ง ซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะส่งหาลำดับเบสตัวอย่างละ 2 ชุด โดยส่งปริมาณ 30  $\mu$ l ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ซึ่งจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (percentage identities) จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (intraspecific divergence) ในแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.0.5.3 โดยเลือก sequence identity matrix จะได้ค่า % identity แล้วนำค่า % identity มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความต่าง} = 100 - \text{เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์}$$

### 3.10 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

ใช้โปรแกรม MEGA version 6 สร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมจากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการทดสอบทางสถิติของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ด้วย bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ และใช้ O'nyong-nyong virus (AF192889) เป็น outgroup

### 3.11 การขอขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้โปรแกรม BankIt สำหรับส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อขอเลขทะเบียน (accession number) ลงในฐานข้อมูลสากล NCBI

### 3.12 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

3.12.1 การบันทึกข้อมูลของตัวอย่างยูงลายเพื่อใช้ในการสกัด RNA เขียนหมายเลขกำกับ พร้อมทั้งจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างมา

3.12.2 ในส่วนของตัวอย่าง RNA ต้องบันทึก หมายเลขและจังหวัด รวมถึงหมายเลขรอบของตัวอย่างที่ถูกส่งมาให้ถูกต้อง

3.12.3 รวบรวมผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ผล

### 3.13 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

3.13.1 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Bioedit

3.13.2 วิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสชิคุนกุนยาที่พบโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree) เทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลจากการเก็บประชากรตัวอย่าง

สุ่มเก็บยุงลายตามธรรมชาติจากหลายจังหวัดในแต่ละภาคของประเทศไทยทั้งหมด 1,285 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ภาคเหนือ 154 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 335 ตัวอย่าง ภาคกลาง 308 ตัวอย่าง ภาคตะวันตก 181 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก 165 ตัวอย่าง และภาคใต้ 142 ตัวอย่าง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7: แสดงจำนวนของตัวอย่างยุงลายที่เก็บจากธรรมชาติในแต่ละภาคของประเทศไทย

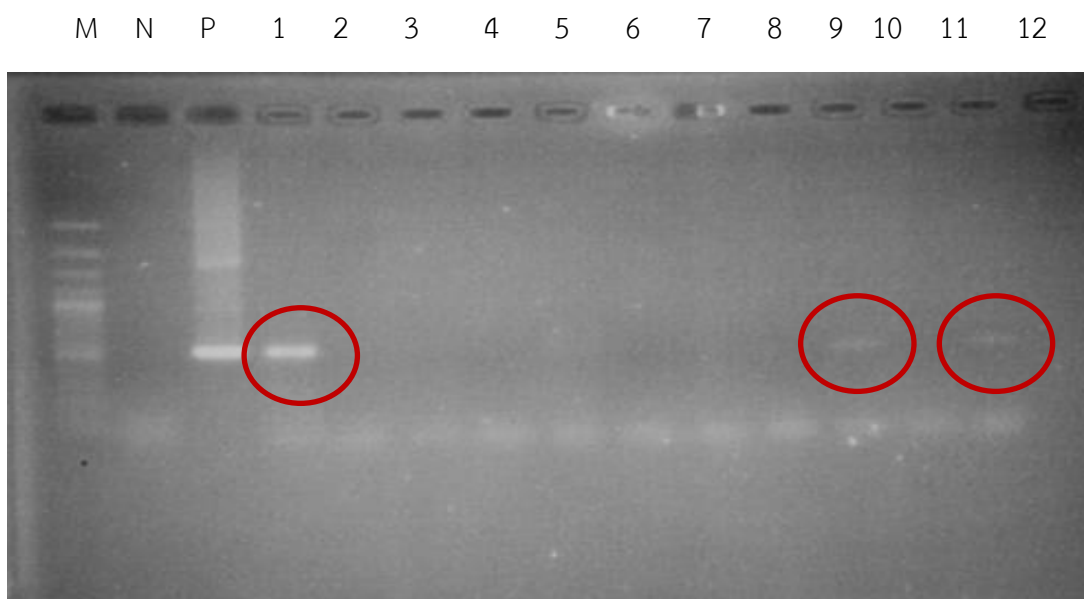
ภาค	ลำดับ	จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	จำนวน
เหนือ	1	เชียงราย	CR-MS	50
	2	เชียงใหม่	CM1-50 / NiH1-11 / KOZ83-86	64
	3	น่าน	NA	40
	รวม			<b>154</b>
ตะวันออกเฉียงเหนือ	1	กาฬสินธุ์	KOZ320-327	7
	2	ขอนแก่น	KOZ360-423	63
	3	นครราชสีมา	KOZ239-258	19
	4	ชัยภูมิ	KOZ21-61	40
	5	มุกดาหาร	KOZ351-359	8
	6	บึงกาฬ	KOZ72-82	10
	7	อุดรธานี	U1-37 / UT1-15 / UT1F-16F KOZ1-19 / KOZ137-175	125
	8	หนองคาย	KOZ176-189	13
	9	อุบลราชธานี	UB	50
รวม			<b>335</b>	
กลาง	1	ลพบุรี	KOZ259-319	60
	2	พิษณุโลก	PNL1-10 / No.1-25 / 1-16	51
	3	เพชรบูรณ์	KOZ67-71 / KOZ87-134	51
	4	นนทบุรี	KOZ329-350	21
	5	กรุงเทพมหานคร	BK20,21 / BKK1-9 / SKL1-22 / SKL1n-28n	61
	6	นครสวรรค์	NS	64
	รวม			<b>308</b>
ภาคตะวันตก	1	ราชบุรี	RB	85
	2	ตาก	TK	96
	รวม			<b>181</b>
ภาคตะวันออก	1	จันทบุรี	KOZ191-283	
	2	ระยอง	RY	45
	3	ตราด	TR	120

		รวม		165
ใต้	1	สงขลา	SK	80
	2	นครศรีธรรมราช	NK	62
		รวม		142
รวม	1,285 ตัวอย่าง			

โดยแบ่งเป็นยุงลายบ้าน 838 ตัวอย่าง และยุงลายสวน 447 ตัวอย่าง \*ตัวอย่างที่ได้เป็นตัวอย่างยุงลายเพศเมียทั้งหมด เนื่องจากใช้คนเป็นเหยื่อล่อ ( human-bait technique )

#### 4.2 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาด้วยวิธี Nested RT-PCR

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ pcr primer 2 คู่ คือ CHIKV 10145 F : ACA AAA CCG TCA TCC CGT CTC C, CHIKV 11158 R : TGA CTA TGT GGT CCT TCG GAG G ขนาด cDNA product 1014 bp<sup>(35)</sup> ในการทำ RT-PCR เพื่อเปลี่ยนจาก RNA ของไวรัสให้กลายเป็น cDNA (complementary strand DNA) หลังจากนั้นนำ pcr product ที่ได้มาทำ pcr อีกหนึ่งครั้งด้วย primer คู่ที่ 2 ที่ทำการออกแบบเอง CHIKV F : GCG CCT ACT GCT TCT GCG A, CHIKV R : GTT CAT CGC TCT TAC CGG GT ขนาด DNA product 539 bp ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน E1 ที่ตำแหน่ง A226V เพื่อให้สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในยุงลายได้ง่ายขึ้น จากตัวอย่างที่เก็บได้ 1,285 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่ขึ้น positive ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง (รูปที่ 18) จาก 6 จังหวัด คือ จังหวัด นครสวรรค์ (NS) จังหวัดเชียงราย (CR-MS) จังหวัดเชียงใหม่ (CM) จังหวัดอุบลราชธานี (UB) จังหวัดสงขลา (SK) และ จังหวัดน่าน (NA) อีกทั้งในจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ขึ้น positive มีเพียงตัวอย่างยุงลายจากจังหวัดสงขลา (SK) เท่านั้นที่สกัด RNA ได้จากยุงลายสวน ใช้ Actin gene เป็น internal control ของ RNA ที่สกัดได้จากยุงลาย



รูปที่ 18: Agarose gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการทำ Nested RT-PCR (M: marker, N: negative control, P: positive control, หมายเลข 1-12 คือ ตัวอย่างยุงลาย)

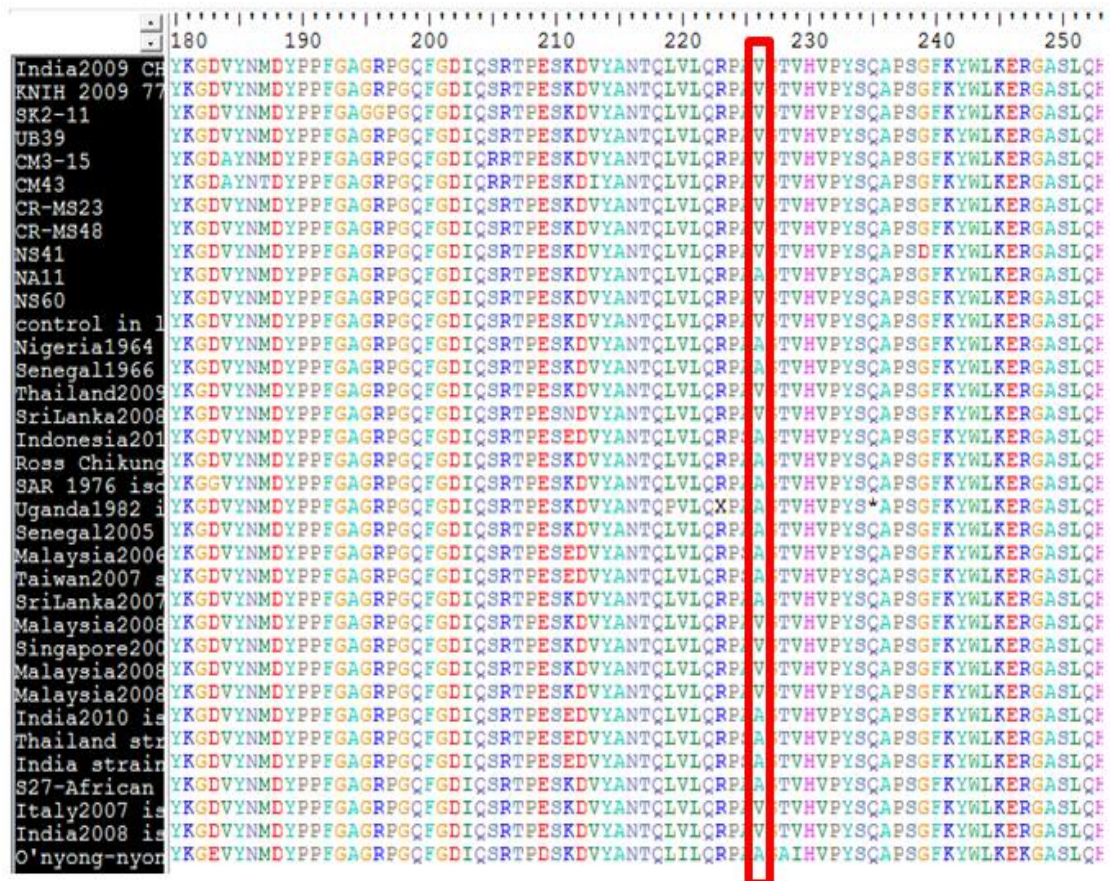
#### 4.3 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) และการทำแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis)

ตารางที่ 8: แสดงผลการเปรียบเทียบ percentage identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลการทดลอง กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลอ้างอิง (GenBank : NCBI)

รหัสตัวอย่าง	จังหวัด	% identity	ฐานข้อมูลอ้างอิง
SK2-11	สงขลา	99	EU272133
NS41	นครสวรรค์	99	FJ445502
NS60	นครสวรรค์	99	GQ168719
CM3-15	เชียงใหม่	98	GQ143747
CM 43	เชียงใหม่	99	FN295489
CR-MS23	เชียงราย	99	JN661152
CR-MS48	เชียงราย	99	HM067744
UB39	อุบลราชธานี	99	KC810970
NA11	น่าน	99	AF369024



เมื่อทำการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A226V พบว่า ตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่ง A226 คือ ตัวอย่างยุงที่เก็บได้จาก จังหวัดนครสวรรค์ (NS) จังหวัดเชียงราย (CR-MS) จังหวัดเชียงใหม่ (CM) จังหวัดอุบลราชธานี (UB) และ จังหวัดสงขลา (SK) ยกเว้นจังหวัดน่าน (NA) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (รูปที่ 19)



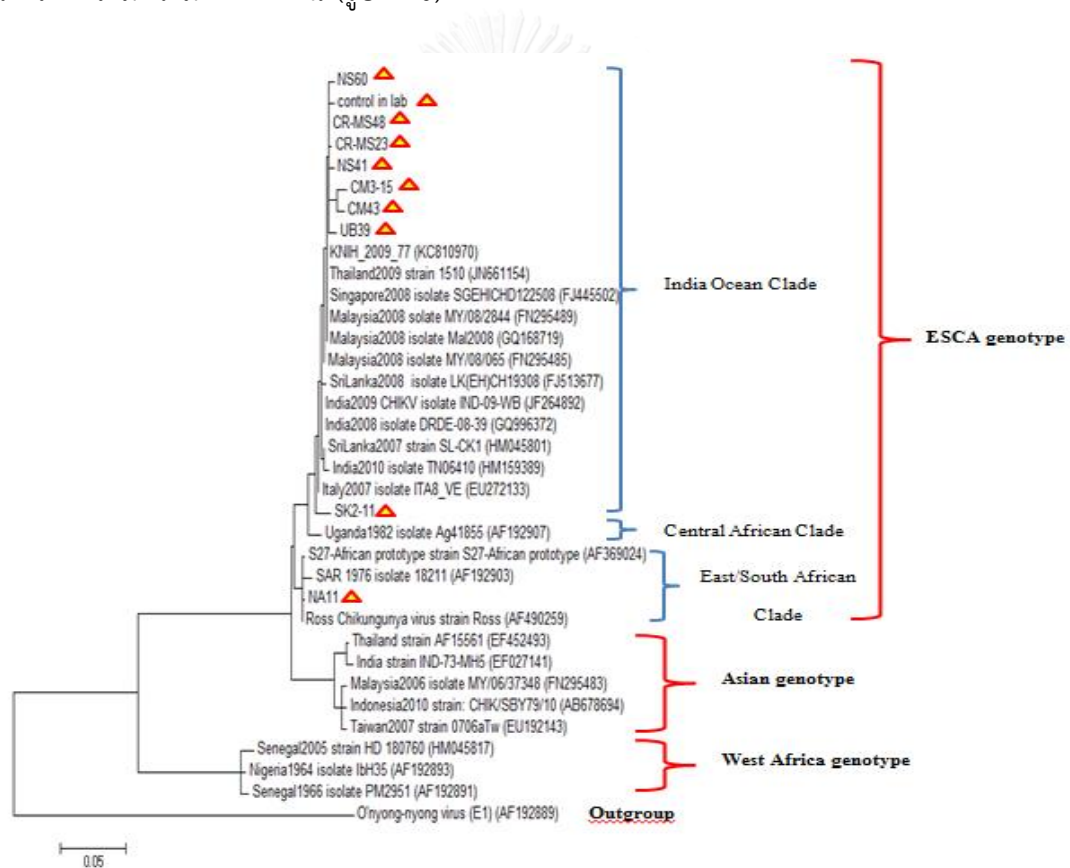
รูปที่ 19: Sequence alignment ของ amino acid ของยีน E1 ของเชื้อไวรัสซิกนกันยาที่ตรวจพบ ในตัวอย่างยุงลายทั้ง 9 ตัวอย่าง (ในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงให้เห็นถึงตำแหน่ง A226V)

#### 4.4 ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม MEGA version 6.0 โดยกำหนดและอ้างอิงข้อมูลมาจากการวิจัยต่างๆ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน E1 ของเชื้อไวรัสซิกนกันยาที่ทราบ clade และ genotype จากฐานข้อมูลใน NCBI มาประกอบรวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นผลการทดลองทั้ง 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Neighbor-Joining method ใช้แบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับ

นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) และใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติ<sup>(34)</sup>

การศึกษาวิวัฒนาการด้วยแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) สามารถแยกกลุ่มของไวรัสที่ แยกได้จากยุงลายที่เก็บได้ ออกจากเชื้อไวรัสชิคุนกัณยาที่มีรายงานในฐานข้อมูลสากลพบว่าตัวอย่างไวรัสที่ วิเคราะห์ได้ในแต่ละจังหวัดอยู่ใน India Ocean Clade วันก็แต่เชื้อไวรัสชิคุนกัณยาจากยุงที่เก็บได้ในจังหวัด น่านจะอยู่ใน East/South African Clade อย่างไรก็ตามผลการตรวจพบเชื้อไวรัสชิคุนกัณยาในยุงลายในประเทศไทยยังอยู่ใน strain ของ ESCA genotype อีกทั้งจากผลการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic tree ที่ได้ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อไวรัสชิคุนกัณยาที่เป็นตัวควบคุมผลบวกในห้องปฏิบัติการ (Control in Lab) เนื่องจากลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 20)



รูปที่ 20: Clade และ Genotype ต่างๆ ของเชื้อไวรัสชิคุนกัณยาที่มีในปัจจุบันเปรียบเทียบกับตัวอย่างงานวิจัยทั้ง 9 ตัวอย่าง (NS: จังหวัดนครสวรรค์, CR-MS: จังหวัดเชียงราย, CM : จังหวัดเชียงใหม่, UB: จังหวัดอุบลราชธานี, SK : จังหวัดสงขลา และ NA: จังหวัดน่าน)

## บทที่ 5

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานพบว่ายุงลายที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสซิกุนกันยาอื่นในฐานข้อมูลพบว่า primer ที่ออกแบบ (ขนาด DNA product 539 bp) สามารถใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสซิกุนกันยาด้วยวิธี Nested RT-PCR ที่ตำแหน่งยีน *E1* ได้ จากการทดลองพบว่า ในตัวอย่างยุงลายที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติทั้งหมด 1,285 ตัวอย่าง แบ่งเป็นยุงลายบ้าน 838 ตัวอย่าง ยุงลายสวน 447 ตัวอย่าง มี 9 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการตรวจหาเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในยุงลายที่จำเพาะกับยีน *E1* (SK2-11, NS41, NS60, CM3-15, CM 43, CR-MS23, CR-MS48, UB39 และ NA11) ซึ่งจากทั้ง 9 ตัวอย่างนี้พบว่า มีเพียงตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดสงขลาเท่านั้น (SK2-11) ที่ได้มาจากการสกัด RNAไวรัส จากยุงลายสวน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพื้นที่ ถิ่นที่อยู่อาศัยชุมชนในภาคใต้มีความเหมาะสมในการแพร่ขยายพันธุ์ของยุงลายสวน โดยส่วนมากในพื้นที่ที่ไปเก็บตัวอย่างยุงลายจากภาคใต้และภาคตะวันออกจะมีบริเวณเป็นที่อยู่อาศัยอยู่ติดกับสวนยางพารา หรือที่อยู่อาศัยบริเวณรอบๆเป็นสวนผลไม้ทำให้โอกาสพบเจอและเก็บตัวอย่างยุงลายสวนมากกว่ายุงลายบ้าน

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาที่ผ่านมาทำให้เราทราบว่า ยีน *E1* ซึ่งทำหน้าที่เปรียบเสมือน protein receptor ช่วยให้ไวรัสสามารถ endocytosis เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ ทำให้เชื้อไวรัสซิกุนกันยาสามารถเข้าไปในเซลล์ และเกิดการจำลองตัวเองใน host ได้<sup>(36)</sup> และมีผลช่วยให้เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายจากที่หนึ่งไปสู่อีกที่หนึ่งได้ง่ายอันเนื่องมาจากความสามารถในการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งยีน *E1*: A226V<sup>(37)</sup> มีรายงานว่าเชื้อไวรัสซิกุนกันยาทางภาคใต้ของประเทศไทยระบาดไม่ใช้สายพันธุ์เอเชียที่เคยมีการระบาดในอดีต แต่เป็นสายพันธุ์แอฟริกาที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งยีน *E1*: A226V ทำให้เชื้อไวรัสซิกุนกันยามีการปรับเปลี่ยนพัฒนาให้มีความเหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ในยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) มากกว่ายุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) ที่เคยรายงานมาก่อน จึงคาดว่าเกิดการระบาดของโรคซิกุนกันยานั้นประชากรส่วนใหญ่ไม่มีภูมิคุ้มกัน และทางภาคใต้มีส่วนยางจำนวนมากซึ่งพบยุงลายสวนเป็นส่วนใหญ่ และมีอัตราการแพร่ขยายพันธุ์ที่สูงอันเนื่องมาจากแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของยุงลายสวน จึงเป็นแหล่งแพร่กระจายของโรคได้เป็นอย่างดีจึงเกิดการระบาดขึ้นใหม่อีกครั้งได้<sup>(19)</sup>

ในรายงานการระบาดของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาของสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, MoPH, Thailand.[Online].Available:<http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/disease.php?dcontent=old&ds=84.2016>) ตั้งแต่ปีคริสตศักราช 2013-2016 พบว่า มีอัตราการระบาดของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับการระบาดในช่วงปีคริสตศักราช 2009<sup>(21)</sup> คิดเป็นร้อยละ 0.1 ของช่วงที่มีการระบาดหนักเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบ % ความต่างของการตรวจพบเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในช่วงที่มีการระบาดหนักมีอัตราการตรวจพบเชื้อไวรัสจากสิ่งส่งตรวจเช่น ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย หรือในตัวอย่างยุงลายในพื้นที่ระบาด คิดเป็นร้อยละ 10 ของ

ตัวอย่างทั้งหมด<sup>(20)</sup> ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าผลการตรวจพบเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในตัวอย่างยุงลายที่เก็บได้จากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยในช่วงที่ไม่มีการระบาดจากทั้งหมด 1,285 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสซิกุนกันยาคิดเป็นร้อยละ 0.7 ของตัวอย่างทั้งหมด (9 ตัวอย่าง) และเมื่อทำการตรวจสอบข้อมูลการระบาดของทั้ง 6 จังหวัดที่ตรวจพบเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในช่วงระยะเวลา 2-4 ปีที่ผ่านมาเทียบกับผลที่ได้จากงานวิจัยแล้วพบว่า ทั้ง 6 จังหวัด ( NS: จังหวัดนครสวรรค์, CR-MS: จังหวัดเชียงราย, CM : จังหวัดเชียงใหม่, UB: จังหวัดอุบลราชธานี, SK : จังหวัดสงขลา และ NA: จังหวัดน่าน) ที่ตรวจพบไวรัสซิกุนกันยาเป็นการตรวจพบเชื้อไวรัสจากยุงลายที่เก็บจากตัวอย่างธรรมชาติได้ในรอบ 4 ปี ซึ่งเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเชื้อไวรัสซิกุนกันยาเมื่อเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วยแล้วเป็นระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน ร่างกายของผู้ป่วยจะมีการเพิ่มขึ้นของ Type I interferons (IFNs), T-cell และ antibodies ต่างๆ ต่อเชื้อไวรัสซิกุนกันยา ทำให้ผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่ระบาดดังกล่าวมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง<sup>(38)</sup> หลังจากนั้นเมื่อมีกลุ่มคนที่ไม่ได้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเข้ามาในพื้นที่ก็จะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดอีกครั้งได้ หรืออาจเป็นเพราะวงจรการระบาดของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจากยุงสู่ยุง<sup>(20)</sup> หรือสัตว์ชนิดอื่น เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นั้นๆ<sup>(12, 39)</sup> และอาจรวมถึงกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น asymptomatic<sup>(40)</sup> ต่อโรค ทำให้ไม่มีการรายงานว่าพบผู้ป่วยเป็นโรคปวดข้อยุงลายในพื้นที่ โดยที่ไวรัสยังสามารถมีวงจรชีวิตอยู่ได้โดยไม่พบการตรวจสอบ และเนื่องจากสาเหตุข้างต้นสามารถเป็นข้อมูลสนับสนุนในกรณีของบางจังหวัดที่มีการเก็บตัวอย่างยุงลาย เช่น ในจังหวัดบึงกาฬ<sup>(11)</sup> ที่มีรายงานว่าเคยตรวจพบเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในผู้ป่วย แม้ในผลการทดลองจะไม่พบเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในตัวอย่างยุงลายจากจังหวัดดังกล่าวได้ก็ตาม

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit กับผลการทดลองที่ได้พบว่า ในตัวอย่าง SK2-11, NS41, NS60, CM3-15, CM 43, CR-MS23, CR-MS48 และ UB39 มีการกลายพันธุ์ของยีน *E1* ที่ตำแหน่ง 226 เกิดขึ้น โดยจะสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน adenine กลายเป็น valine ทั้งสิ้น 8 ตัวอย่าง ได้แก่ SK2-11, NS41, NS60, CM3-15, CM 43, CR-MS23, CR-MS48 และ UB39 ไม่พบว่าตัวอย่าง NA11 มีการกลายพันธุ์ของยีน *E1* ที่ตำแหน่งนี้ เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับอื่นจากฐานข้อมูล NCBI ซึ่งสาเหตุอาจเป็นเพราะความสัมพันธ์ของถิ่นอาศัยกับการแพร่ระบาด<sup>(37)</sup> ของแมลงพาหะในจังหวัดน่านเหมาะสมสำหรับยุงลายบ้านมากกว่ายุงลายสวนอีกทั้งในช่วงที่มีการระบาดหนักของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในประเทศไทยเมื่อปีคริสต์ศักราช 2009 จังหวัดน่านเป็นจังหวัดที่ได้รับผลกระทบจากการระบาดน้อย( จากข้อมูลอ้างอิงการระบาดของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ) ทำให้ยีนของไวรัสซิกุนกันยาในยุงลายบ้านในจังหวัดน่านมีวงจรการระบาด<sup>(41)</sup> ที่เป็นปกติ มีโอกาสน้อยที่จะมีการระบาดไปยังยุงลายสวนและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *E1* ของไวรัสซิกุนกันยา

สำหรับการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมเพื่อหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจากอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจากเมื่อปีคริสต์ศักราช (1998, 1995-1996) ซึ่งในช่วงเวลานั้นผลการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซิกุนกันยา คือ Asian genotype จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็น ESCA genotype ในปีคริสต์ศักราช 2009<sup>(19)</sup> ซึ่งสาเหตุสำคัญอาจมาจากความสามารถในการกลายพันธุ์ และการคมนาคม การค้า ที่มีความเจริญมากขึ้น ในส่วนของผลการทดลองในงานวิจัยชิ้นนี้ยังพบอีกว่าเชื้อไวรัสซิกุนกันยาที่ตรวจพบจากยุงลายที่เก็บได้ในประเทศไทยมี

ความใกล้เคียงกันของสายพันธุ์ย่อยถึง 2 สายพันธุ์ในกลุ่ม ESCA genotype คือ India Ocean Clade และ East/South African Clade) (รูปที่ 20) ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าประเทศไทยในปัจจุบัน อาจมีสายพันธุ์อื่นของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาที่ยังไม่มีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรัสอีกก็เป็นได้

ดังที่อภิปรายมาข้างต้นทำให้เห็นว่าการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาที่ตำแหน่งยีน E1 A226V สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสซิกุนกันยาจากยุงลายที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ และยังสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในยุงลายจากหลายจังหวัดในประเทศไทยได้ และยังเผยให้เห็นอีกว่าสามารถพบการระบาดของเชื้อไวรัสได้แม้จะไม่อยู่ในช่วงฤดูกาลระบาดของในจังหวัดที่ไม่พบผู้ป่วยมานานแล้วก็ตาม งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทั้งในด้านอนุชีววิทยา และระบาดวิทยา อีกทั้งในด้านการรักษาโรค ยังไม่มีวัคซีน หรือยารักษาที่ใช้รักษาโรคนี้โดยเฉพาะเจาะจง ซึ่งให้เห็นว่าโรคปวดข้อยุงลายและเชื้อไวรัสซิกุนกันยายังเป็นโรคที่มีความสำคัญในปัจจุบัน ควรที่จะต้องมีการศึกษา เฝ้าระวัง และหาทางป้องกันโรคต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

#### ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

1. จากผลการทดลองทำให้เราสามารถประเมินสาเหตุของการติดเชื้อไวรัสซิกุนกันยาของยุงว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในคนในประเทศไทยได้
2. จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาอาจทำให้เราเห็นลักษณะการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันของเชื้อในแต่ละจังหวัดของประเทศไทย ใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาค้นคว้าต่อไป
3. ข้อมูลที่ได้สามารถเพิ่มเป็นฐานข้อมูลของไวรัสซิกุนกันยาที่พบในประเทศไทยได้และเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

#### ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสซิกุนกันยาในยุงมีความแตกต่างกันในแต่ละจังหวัด ซึ่งอาจมีการเกิด mutation ขึ้นได้และอาจก่อให้เกิดการระบาดและอาการของโรคที่รุนแรงขึ้น ดังนั้นควรทำการศึกษาในพื้นที่เพิ่มขึ้นและสุ่มจำนวนตัวอย่างของยุงที่เพิ่มขึ้นด้วยและทำการ isolate เชื้อในยุงเพื่อทำการศึกษาต่อยอดในอนาคต



## ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุดสกัด viral RNA ของ Invisorb<sup>®</sup> Spin Virus RNA Mini Kit บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเยอรมนี

Lysis buffer RV  
Binding buffer  
Proteinase K  
Carrier RNA  
Wash buffer R1  
Wash buffer R2  
Elution buffer

2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ของ Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two ประเทศเยอรมนี

Solution A  
Solution B  
Solution C  
Wash solution  
Elution solution



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT-PCR ใช้ชุดสารละลาย ของบริษัท Invitrogen; SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq

R2x Buffer  
RT-Taq

4. สารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

10X NH<sub>4</sub> buffer  
50mM MgCl<sub>2</sub>  
10mM dNTPs  
Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)

### 5. ชุดโคลนสำหรับ PCR product (DNA ligation)

2X Rapid ligation buffer  
 pGEM<sup>®</sup> - T easy vector  
 T4 DNA ligase  
 Deionized water

### 6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB agar ปริมาตร 1 ลิตร

Bacto-tryptone 10.0 g  
 Yeast extracts 5.0 g  
 1M NaCl 10.0 g  
 Agar 10.0 g

#### วิธีเตรียม

ซึ่งสารทั้งหมดใส่ในขวดขนาด 1 L จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาณให้เป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุ่นพอที่จะสัมผัสได้ จากนั้นใส่ยา ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/μl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

\*\*\* ในกรณีการเตรียมอาหารเลี้ยงชนิดเหลว (LB broth) ให้ทำการเตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีข้างต้น แต่ไม่ต้องใส่ agar เมื่อจะใช้ให้เติมยา ampicillin ลงไปทีหลัง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เช่นเดียวกัน

### 7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SOB ปริมาตร 100 ml และ SOC solution

Bacto-tryptone 5.0 g  
 Yeast extracts 1.25 g  
 1M NaCl 0.125 g



### วิธีเตรียม SOB

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นจากนั้นใส่สารละลาย KCl ปริมาตร 625  $\mu\text{l}$  แล้วจึงปรับปริมาณให้ได้ 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### วิธีเตรียม SOC

เติมสารละลาย 2M glucose, 1M  $\text{MgCl}_2$ , 1M  $\text{MgSO}_4$  ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ในอัตราส่วน 970: 10: 10: 10 (ปริมาณรวม 1,000  $\mu\text{l}$ )

#### 7.1. การเตรียมสารละลาย 1M KCl ปริมาตร 10 ml

KCl (potassium chloride) 0.7455 g

### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 7.2. การเตรียมสารละลาย 2M $\text{MgCl}_2/\text{MgSO}_4$ ปริมาตร 10 ml

1M  $\text{MgCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$  2.033 g

1M  $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$  2.465 g

### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จากนั้นกรองด้วย micro filter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 7.3. การเตรียมสารละลาย 2M glucose ปริมาตร 10 ml

Glucose (D- glucose) 3.6 g

### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จากนั้นกรองด้วย micro filter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 8. การเตรียมยา ampicillin 100 mg/ $\mu\text{l}$ (stock solution)

### วิธีเตรียม

ชั่งยา ampicillin 1 กรัมใส่น้ำกลั่นปริมาตร 10 ml ละลายให้เข้ากันแล้วกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

### 9. การเตรียมสารละลาย 10X TAE buffer ปริมาตร 1 L

Tris base 48.44 g

Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 7.44 g

Sodium acetate trihydrate 27.22 g

Glacial acetic acid 17.0 ml

#### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมี Tris base, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O และ Sodium acetate trihydrate ให้เข้ากัน ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.8 ด้วย glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 L ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที

\*\*\* ก่อนใช้ให้นำ 10X TAE beffer มาเจือจางความเข้มข้น โดยนำ 10X TAE beffer ปริมาตร 100 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml ซึ่งจะได้สารละลาย 1X TAE buffer

### 10. การเตรียม 6X loading buffer

Bromphenol blue 0.025 g

Sucrose 4.0 g

#### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 11. การเตรียมสารละลาย 20 mg/ml X-gal

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside 0.2 g

#### วิธีเตรียม

เตรียม stock solution โดยละลาย X-gal ในสารละลาย dimethylformamide (DMF) ให้ได้ปริมาตร 10 ml จากนั้นแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยกระดาษฟลอยด์เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

### 12. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG

Isopropyl  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside 2.38 g

### วิธีเตรียม

เตรียม stock solution 1M IPTG โดยละลายสารเคมีด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาณเป็น 10 ml กรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ห่อด้วยฟลอยด์เก็บที่ อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

13. การเตรียมสารเคมี Medium A เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell

MgSO<sub>4</sub> 1.23 g

Glucose 1.00 g

### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมีทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml กรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

14. การเตรียมสารเคมี Medium B เพื่อใช้ในขั้นตอนเตรียม competent cell

MgSO<sub>4</sub> 0.295 g

Polyethylene glycol (PEG) 1.2 g

Glycerol 3.6 ml

### วิธีเตรียม

ละลายสารเคมี MgSO<sub>4</sub> และ PEG ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) ประมาณ 5 ml จากนั้นเติม glycerol ปริมาตร 3.6 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย LB broth จากนั้นกรองด้วย microfilter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

15. การเตรียม competent cell เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA cloning

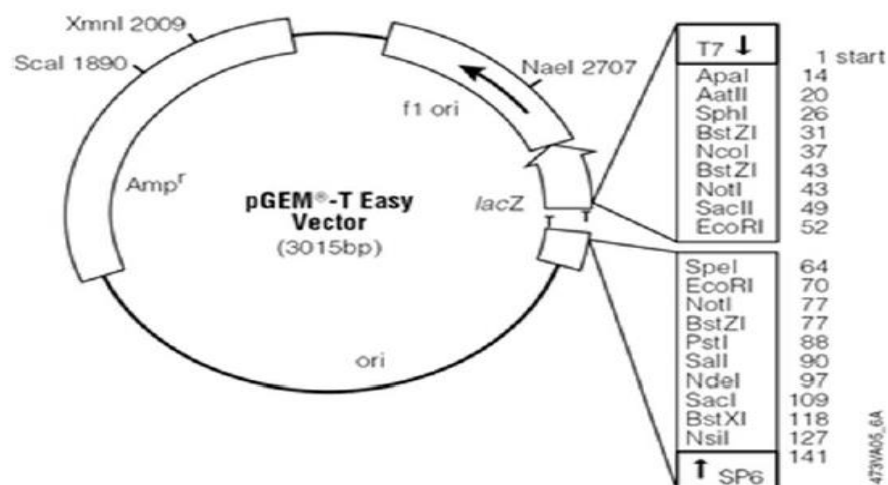
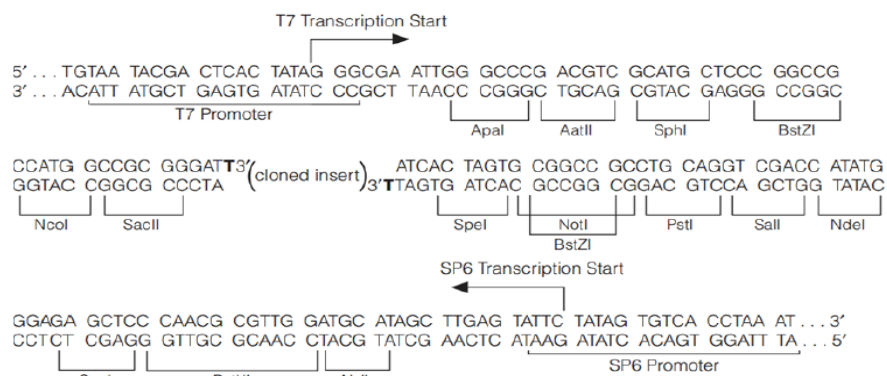
1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยการนำ stock เชื้อแบคทีเรียที่เก็บใน glycerol มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar) ที่ไม่ใส่ยา ampicillin เพื่อให้ได้ single colony บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

2. เลือก single colony มาเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว LB broth ที่ไม่ใส่ยา ampicillin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

3. นำ medium A แบ่งใส่หลอดปริมาตร 20 ml จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm (ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที) นำมาวัด OD ที่ A<sub>600</sub> ให้ได้ค่าประมาณ 0.4-0.6

4. เมื่อครบเวลาแล้วให้นำหลอดเชื้อมาแช่ในน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 g ด้วยอุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 10 นาที
  5. นำหลอดที่ปั่นตกตะกอนเชื้อแล้วไปแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นให้ทิ้งส่วนของ supernatant แล้วใส่ medium A ปริมาตร 200  $\mu$ l เพื่อทำการละลายตะกอนโดยใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ
  6. ดูด medium B ปริมาตร 1 ml ใส่ลงไป ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 100  $\mu$ l นำไป fix ด้วยไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว (ถ้าไม่มีให้แช่ไว้ในน้ำแข็ง เก็บรักษา competent cell ที่อุณหภูมิ -80 °C
- หมายเหตุ:** ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4 เป็นต้นไปให้ทำในอุณหภูมิที่เย็น น้ำยาที่ใช้ต้องแช่เย็น และทำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อน และทำให้ competent cell ตายได้

#### 16. pGEM<sup>®</sup>- T easy Vector System I, Promega<sup>®</sup>



## ภาคผนวก ข.

ข้อมูลการระบาดของสำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขปีคริสต์ศักราช 2009

ภาค/จังหวัด	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	รวม	อัตราป่วยต่อประชากรแสนคน
<b>ภาคกลาง</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>75</b>	<b>45</b>	<b>72</b>	<b>265</b>	<b>539</b>	<b>641</b>	<b>325</b>	<b>67</b>	<b>2040</b>	<b>9.57</b>
กรุงเทพมหานคร	0	0	2	1	40	0	6	5	5	6	0	0	65	1.14
นนทบุรี	1	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	5	0.48
ปทุมธานี	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0.43
สระบุรี	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.32
ชัยนาท	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	7	2.08
ฉะเชิงเทรา	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0.30
ปราจีนบุรี	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.22
สมุทรปราการ	0	1	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	5	0.44
นครปฐม	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0.24
ราชบุรี	0	0	0	2	2	0	9	75	112	5	3	0	208	24.88
สุพรรณบุรี	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.12
เพชรบุรี	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.22
ประจวบคีรีขันธ์	0	0	0	0	11	8	2	1	7	6	6	1	42	8.39
จันทบุรี	0	0	0	0	7	2	0	5	2	2	1	0	19	3.74
ชลบุรี	0	0	0	0	1	0	1	0	2	6	9	0	19	1.50
ระยอง	0	0	0	1	1	26	54	176	405	608	301	66	1638	273.61
ตราด	0	0	0	0	0	2	0	1	6	5	4	0	18	8.11
<b>ภาคใต้</b>	<b>5212</b>	<b>5554</b>	<b>2850</b>	<b>5217</b>	<b>8464</b>	<b>8088</b>	<b>3443</b>	<b>2761</b>	<b>2115</b>	<b>1925</b>	<b>858</b>	<b>202</b>	<b>46689</b>	<b>534.10</b>
ชุมพร	2	0	1	2	186	300	216	183	261	200	60	9	1420	292.95
นครศรีธรรมราช	0	7	4	8	592	1021	552	678	733	713	364	122	4794	316.82
พัทลุง	0	2	6	33	1150	1312	378	210	199	140	0	0	3430	679.03
สงขลา	0	0	3	6	193	988	613	820	447	608	280	23	3981	404.78
กระบี่	1	0	1	5	75	222	175	166	152	114	55	8	974	232.62
พังงา	0	0	0	6	121	164	356	137	90	26	17	0	917	366.90
ภูเก็ต	0	0	1	4	1175	1378	393	200	113	57	28	12	3361	1,027.81
ระนอง	0	0	0	0	50	160	81	79	14	2	2	0	388	12.34
ตรัง	3	0	3	160	770	532	232	88	35	9	3	2	1837	298.76
นราธิวาส	2493	2625	1049	234	816	535	170	119	48	26	18	7	8140	1,130.67
ปัตตานี	875	1232	545	549	785	387	104	26	7	6	0	2	4518	703.55
สตูล	0	0	0	47	126	96	19	7	2	4	11	2	314	108.87
ยะลา	1665	1336	861	3429	1651	649	102	26	12	17	20	15	9783	32.39
สงขลา	173	352	376	734	774	344	52	22	2	3	0	0	2832	595.55
<b>ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>54</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>86</b>	<b>0.40</b>
เลย	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	4	0.65
หนองบัวลำภู	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0.60
อุดรธานี	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.13
มุกดาหาร	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.30
สกลนคร	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	5	0.45
กาฬสินธุ์	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.20
มหาสารคาม	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.21
ร้อยเอ็ด	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.08
อำนาจเจริญ	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.54
ศรีสะเกษ	1	0	0	1	6	3	0	0	2	0	0	0	13	0.90
อุบลราชธานี	0	1	0	8	32	2	0	0	0	0	0	0	43	0.39
บุรีรัมย์	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	4	0.26
นครราชสีมา	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.04
สุรินทร์	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.07
ชัยภูมิ	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0.18
<b>ภาคเหนือ</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>41</b>	<b>46</b>	<b>4</b>	<b>29</b>	<b>58</b>	<b>53</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>254</b>	<b>2.14</b>
เชียงใหม่	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	6	0.36
ลำปาง	0	0	0	0	6	2	0	0	0	0	0	0	8	1.04
แม่ฮ่องสอน	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.79
เชียงราย	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	4	0.33
พะเยา	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	1	0	7	1.44
แพร่	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	6	1.29
เพชรบูรณ์	0	0	1	6	28	33	0	0	0	0	0	0	68	6.83
พิษณุโลก	0	0	0	0	0	3	1	0	0	6	0	0	10	1.18
ตาก	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	4	0.74
อุตรดิตถ์	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.22
อุทัยธานี	0	0	0	0	0	0	0	25	57	41	13	2	138	2.13
<b>ยอดรวมประเทศ</b>	<b>5214</b>	<b>5558</b>	<b>2853</b>	<b>5237</b>	<b>8634</b>	<b>8195</b>	<b>3521</b>	<b>3055</b>	<b>2715</b>	<b>2619</b>	<b>1197</b>	<b>271</b>	<b>49069</b>	<b>7.41</b>













## รายการอ้างอิง

1. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*. 2009 Oct 25;393(2):183-97. PubMed PMID: 19732931. Pubmed Central PMCID: 2915564.
2. Pulmanusahakul R, Roytrakul S, Auewarakul P, Smith DR. Chikungunya in Southeast Asia: understanding the emergence and finding solutions. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2011 Oct;15(10):e671-6. PubMed PMID: 21775183.
3. Wikan N, Khongwichit S, Phuklia W, Ubol S, Thonsakulprasert T, Thannagith M, et al. Comprehensive proteomic analysis of white blood cells from chikungunya fever patients of different severities. *J Transl Med*. 2014 Apr 11;12:96. PubMed PMID: 24721947. Pubmed Central PMCID: 4022080.
4. Widjaja S, Soekotjo W, Hartati S, Jennings GB, Corwin AL. Prevalence of hemagglutination-inhibition and neutralizing antibodies to arboviruses in horses of java. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1995 Mar;26(1):109-13. PubMed PMID: 8525395.
5. Wasonga C, Inoue S, Kimotho J, Morita K, Ongus J, Sang R, et al. Development and Evaluation of an in-House IgM-Capture ELISA for the Detection of Chikungunya and Its Application to a Dengue Outbreak Situation in Kenya in 2013. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(5):410-4. PubMed PMID: 25866119.
6. Singh RK, Tiwari S, Mishra VK, Tiwari R, Dhole TN. Molecular epidemiology of Chikungunya virus: mutation in E1 gene region. *Journal of virological methods*. 2012 Nov;185(2):213-20. PubMed PMID: 22782121.
7. Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *The Journal of hygiene*. 1956 Jun;54(2):177-91. PubMed PMID: 13346078. Pubmed Central PMCID: 2218030.

8. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960 Apr 15;131(3407):1102-3. PubMed PMID: 14399343.
9. Suangto P. Chikungunya fever; Annual epidemiological surveillance report 2009, Bureau of Epidemiology. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. 2014;<http://www.boe.moph.go.th/Annual/Annual%202552/Main.html>.
10. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS medicine*. 2006 Jul;3(7):e263. PubMed PMID: 16700631. Pubmed Central PMCID: 1463904.
11. Wanlapakorn N, Thongmee T, Linsuwanon P, Chattakul P, Vongpunsawad S, Payungporn S, et al. Chikungunya outbreak in Bueng Kan Province, Thailand, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014 Aug;20(8):1404-6. PubMed PMID: 25061989. Pubmed Central PMCID: 4111161.
12. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *The Journal of general virology*. 2007 Sep;88(Pt 9):2363-77. PubMed PMID: 17698645.
13. Metcalf TU, Griffin DE. Alphavirus-induced encephalomyelitis: antibody-secreting cells and viral clearance from the nervous system. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):11490-501. PubMed PMID: 21865385. Pubmed Central PMCID: 3194963.
14. (CDC). CfDCaP. Chikungunya fever diagnosed among international travelers United States, 2005-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly*. 2006.
15. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2008 May;14(5):852-4. PubMed PMID: 18439383. Pubmed Central PMCID: 2600251.
16. Santhosh SR, Dash PK, Parida MM, Khan M, Tiwari M, Lakshmana Rao PV. Comparative full genome analysis revealed E1: A226V shift in 2007 Indian Chikungunya virus isolates. *Virus research*. 2008 Jul;135(1):36-41. PubMed PMID: 18384900.

17. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007 Dec 01;370(9602):1840-6. PubMed PMID: 18061059.
18. Wu D, Zhang Y, Zhouhui Q, Kou J, Liang W, Zhang H, et al. Chikungunya virus with E1-A226V mutation causing two outbreaks in 2010, Guangdong, China. *Virology journal*. 2013 Jun 02;10:174. PubMed PMID: 23725047. Pubmed Central PMCID: 3691762.
19. Rianthavorn P, Prianantathavorn K, Wuttirattanakowit N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2010 Sep;14 Suppl 3:e161-5. PubMed PMID: 20417142.
20. Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, et al. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2009 Sep;40(5):951-62. PubMed PMID: 19842379.
21. Sasayama M, Benjathummarak S, Kawashita N, Rukmanee P, Sangmukdanun S, Masrinoul P, et al. Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. *Virus genes*. 2014 Dec;49(3):485-9. PubMed PMID: 25113745. Pubmed Central PMCID: 4232745.
22. Chompoosri J, Thavara U, Tawatsin A, Boonserm R, Phumee A, Sangkitporn S, et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasites & vectors*. 2016 Apr 23;9:227. PubMed PMID: 27108077. Pubmed Central PMCID: 4842298.
23. Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS pathogens*. 2008 Feb 08;4(2):e29. PubMed PMID: 18282093. Pubmed Central PMCID: 2242832.
24. Ozden S, Huerre M, Riviere JP, Coffey LL, Afonso PV, Mouly V, et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *Plos One*. 2007 Jun 13;2(6):e527. PubMed PMID: 17565380. Pubmed Central PMCID: 1885285.

25. Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *Journal of immunology*. 2010 May 15;184(10):5914-27. PubMed PMID: 20404278.
26. Her Z, Malleret B, Chan M, Ong EK, Wong SC, Kwek DJ, et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. *Journal of immunology*. 2010 May 15;184(10):5903-13. PubMed PMID: 20404274.
27. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Mar;120(3):894-906. PubMed PMID: 20179353. Pubmed Central PMCID: 2827953.
28. Wintachai P, Wikan N, Kuadkitkan A, Jaimipuk T, Ubol S, Pulmanusahakul R, et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *J Med Virol*. 2012 Nov;84(11):1757-70. PubMed PMID: 22997079.
29. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):729-40. PubMed PMID: 16497584.
30. Salonen A, Ahola T, Kaariainen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Current topics in microbiology and immunology*. 2005;285:139-73. PubMed PMID: 15609503.
31. Garmashova N, Atasheva S, Kang W, Weaver SC, Frolova E, Frolov I. Analysis of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13552-65. PubMed PMID: 17913819. Pubmed Central PMCID: 2168819.
32. Zilliox MJ, Moss WJ, Griffin DE. Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells during measles virus infection. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007 Jul;14(7):918-23. PubMed PMID: 17538120. Pubmed Central PMCID: 1951064.
33. (WHO) Who. Chikungunya. World health organization. 2015;<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en>.

34. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011 Oct;28(10):2731-9. PubMed PMID: 21546353. Pubmed Central PMCID: 3203626.
35. Santhosh SR, Dash PK, Parida M, Khan M, Rao PV. Appearance of E1: A226V mutant Chikungunya virus in Coastal Karnataka, India during 2008 outbreak. *Virology journal*. 2009 Oct 27;6:172. PubMed PMID: 19857273. Pubmed Central PMCID: 2774687.
36. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature reviews Microbiology*. 2010 Jul;8(7):491-500. PubMed PMID: 20551973.
37. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens*. 2007 Dec;3(12):e201. PubMed PMID: 18069894. Pubmed Central PMCID: 2134949.
38. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *The Journal of general virology*. 2000 Feb;81(Pt 2):471-9. PubMed PMID: 10644846.
39. Kading RC, Borland EM, Cranfield M, Powers AM. Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin. *Journal of wildlife diseases*. 2013 Jul;49(3):587-99. PubMed PMID: 23778608.
40. Appassakij H, Khuntikij P, Kemapunmanus M, Wutthananarungsan R, Silpapojakul K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion*. 2013 Oct;53(10 Pt 2):2567-74. PubMed PMID: 23176378.
41. Rosen L. Report's Principal Findings. *Science*. 1987 Apr 17;236(4799):258. PubMed PMID: 17755553.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายฤทธิชัย ธรรมโกศล เกิดวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ.2532 ที่อยู่ปัจจุบัน 104 หมู่ 2 ถนนสุขุมวิท ตำบลเขาสมิง อำเภอสุมิง จังหวัดตราด สำเร็จการศึกษาระดับชั้นปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นได้มีโอกาสเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2556

ผู้วิจัยได้มีโอกาสนำเสนองานวิจัยชิ้นนี้ และได้รับรางวัลงานวิจัยดีเด่นในส่วนของ การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ( Poster Presentation ) ในงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติครั้งที่ 4 ประจำปี พ.ศ.2560 “ขับเคลื่อนเศรษฐกิจด้วยวิจัยและนวัตกรรม : อนาคตและความท้าทายใหม่ของประเทศไทย 4.0” ณ วันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2560 โดย วิทยาลัยนครราชสีมาและสถาบันร่วมจัดการประชุมวิชาการ จังหวัดนครราชสีมา



