

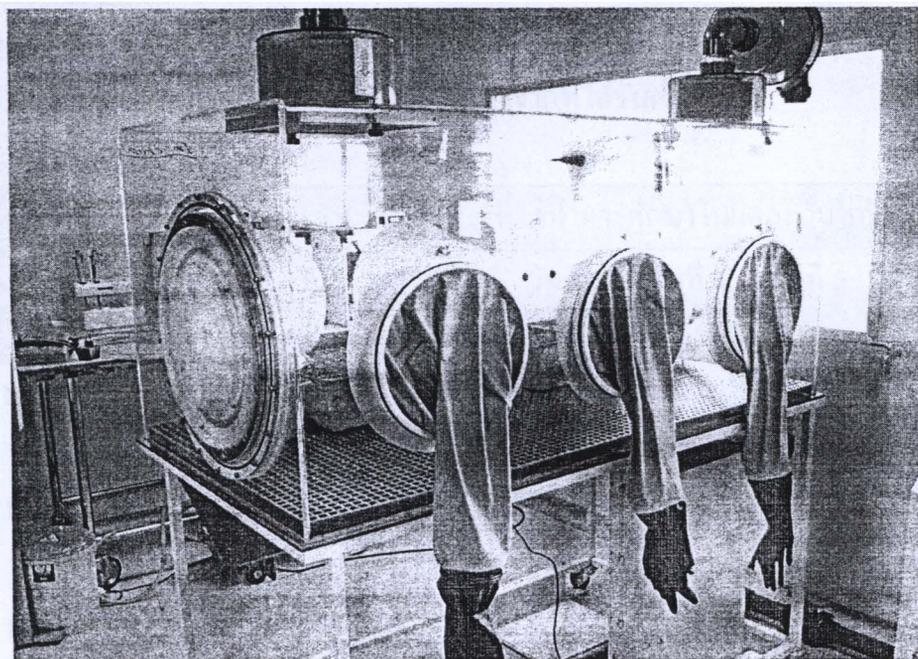
วิธีการวิจัย

1. การศึกษาไวรัสซึคนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไม่ซ์

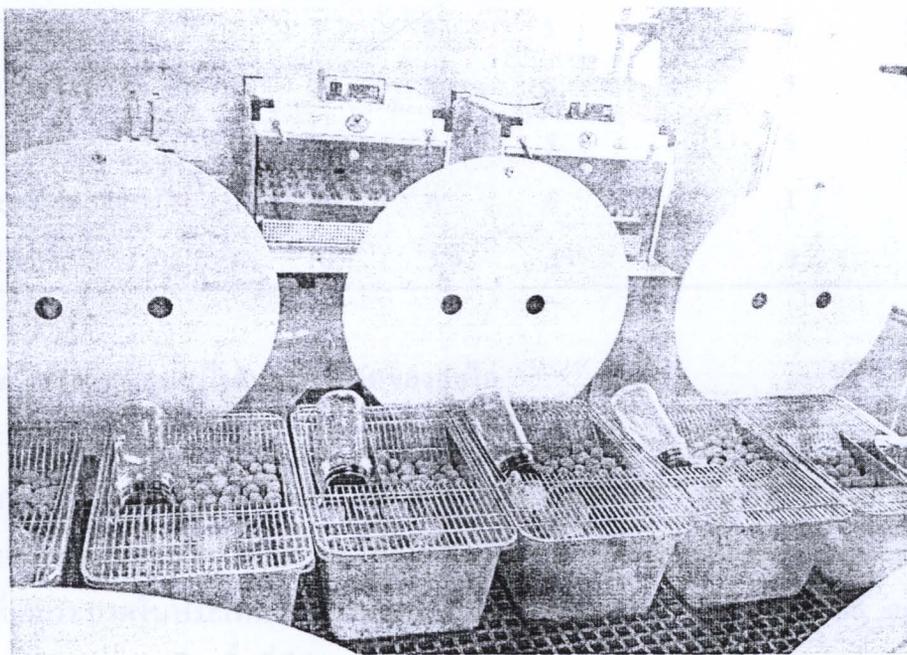
ศึกษาไวรัสซึคนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไม่ซ์ (ICR mice) อายุ 2 – 6 สัปดาห์ โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสซึคนกุนยาสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ให้กับหนู โดยการฉีดเชื้อที่มีจำนวน 10^4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

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

การเจาะเลือดจากหนูจะทำหลังจากที่ได้วางยาสลบหนูไปแล้ว โดยใช้ Teletamine hypochloride และ Zolazepam hypochloride (Zoletil[®], Virbac, France) โดยเจาะเลือดจากหัวใจ และทำการการุณฆาตหลังจากที่ได้เจาะเลือดเรียบร้อยแล้ว การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee, Animal Use Protocol No. 1031038) ตัวอย่างเลือดที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างซีรัมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของตู้ isolator ที่อยู่ภายในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ระดับ 3



รูปที่ 2 แสดงสัตว์ทดลองที่เลี้ยงอยู่ในตู้ isolator

ตารางที่ 1 อายุของหนูไมซ์ สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อให้กับหนู และจำนวนหนูไมซ์ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ

อายุของ หนูไมซ์	สายพันธุ์ ของเชื้อ	ปริมาณ ของเชื้อ (CID ₅₀)	จำนวนหนูไมซ์ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
6 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁴	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Thailand	10 ⁴	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁶	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Thailand	10 ⁶	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁸	5	5	5	5	5	5	5
6 สัปดาห์	Thailand	10 ⁸	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁴	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Thailand	10 ⁴	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁶	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Thailand	10 ⁶	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁸	5	5	5	5	5	5	5
4 สัปดาห์	Thailand	10 ⁸	5	5	5	5	5	5	5
2 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁸	5	6	6	6	1	-	-
2 สัปดาห์	Thailand	10 ⁸	10	3	6	6	4	-	-

2. การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสดเลือดของลูกไก่

ศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสดเลือดของลูกไก่อายุ 5 วัน โดยทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ให้กับลูกไก่อายุ 5 วัน โดยการฉีดเชื้อที่มีจำนวน $10^2 - 10^8$ CID₅₀ เข้ากล้ามเนื้อบริเวณอก ภายหลังการฉีดเชื้อแล้วได้ทำการเลี้ยงลูกไก่ทดลองไว้ในตู้ isolator ซึ่งอยู่ภายในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ระดับ 3 ของศูนย์วิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการเจาะเลือดจากลูกไก่ทุกวัน ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากที่ได้รับเชื้อ ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

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

ตารางที่ 2 อายุของลูกไก่ สายพันธุ์และปริมาณของเชื้อไวรัสที่ทำการฉีดเชื้อให้กับลูกไก่ และจำนวนลูกไก่ที่ได้ทำการศึกษาในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับเชื้อ

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

3. การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีทางอนุชีววิทยา

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

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

Primer ที่ใช้คือ DVRChk-R 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' และ DVRChk-F 5'ACCGGCGTCTACCCATTCATGT3' (CV et al. 2007) โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรมจำนวน (template RNA) 1.5 ไมโครลิตร 2X reaction mix (dNTP 0.4 mM, MgSO₄ 3.2 mM) (Invitrogen, USA) จำนวน 12.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นจำนวน 8 ไมโครลิตร SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, USA) จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward และ reverse primer อย่างละจำนวน 1 ไมโครลิตร (10 μM) อุณหภูมิของปฏิกิริยา RT-PCR ได้พัฒนาจากวิธีของ CV และ คณะ (2007) และ Theamboonlers คณะ (2009) การศึกษานี้ประกอบไปด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

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

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

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

ผลการวิจัย

1. การศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูไมซ์

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

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

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



ตารางที่ 4 การตรวจหาเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในกระแสเลือดของหนูโมซายูที่แตกต่างกัน
หลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง

อายุของ หนูโมซายู	สายพันธุ์ ของเชื้อ	ปริมาณ ของเชื้อ (CID ₅₀)	วันหลังจากที่ได้รับเชื้อ						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
6 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Thailand	10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁶	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Thailand	10 ⁶	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁸	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6 สัปดาห์	Thailand	10 ⁸	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Thailand	10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁶	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Thailand	10 ⁶	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁸	3/5	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4 สัปดาห์	Thailand	10 ⁸	4/5	4/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2 สัปดาห์	Ross/186	10 ⁸	5/5	6/6	3/6	5/6	1/1	-	-
2 สัปดาห์	Thailand	10 ⁸	9/10	3/3	4/6	0/6	0/4	-	-

* ตัวเลขในตาราง แสดงจำนวนหนูที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดต่อจำนวนหนูที่ทำการศึกษาในแต่ละวัน

2. การศึกษาไวรัสซิกุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่



การศึกษาไวรัสซิกุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่ อายุ 5 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain) และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่เคยระบาดในประเทศไทยในอดีตซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Ross/186 strain) ซึ่งมีปริมาณของไวรัสที่แตกต่างกันระหว่าง 10² - 10⁸ CID₅₀ และทำการตรวจหาเชื้อในซีรัมด้วยวิธี

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

ตารางที่ 5 การตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในกระแสเลือดของลูกไก่อายุ 5 วัน หลังจากที่ ได้รับเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

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

* ตัวเลขในตาราง แสดงจำนวนลูกไก่ที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดต่อจำนวนลูกไก่ที่ทำการศึกษาในแต่ละวัน