



การพัฒนาวัคซีนไข้วอดช้อยงลาย : ความก้าวหน้า ปัญหา และโอกาส
(Chikungunya vaccine development : progress, problem and opportunity)



รศ.ดร.สุธี ยกสำน
ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน,
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล,
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

Assoc. Prof. Sutee Yoksan
Center for Vaccine Development,
Institute of Molecular Biosciences,
Mahidol University, Salaya, Thailand

Abstract

Chikungunya vaccine development: progress, problem and opportunity

Chikungunya (CHIKV) is an arboviral disease transmitted by *Aedes* mosquitoes. The recent resurgence of CHIKV in Thailand is a matter of great public health concern. Despite the fact that CHIKV resurgence is associated with epidemic, no approved licensed vaccine is currently available. A formalin inactivated CHIKV vaccine revealed absence of untoward reactions or side effects and the acceptable immunogenic response in volunteers attested to the safety and immunogenicity of this vaccine. An attenuated CHIKV virus clone was developed for production of a live vaccine for human use. Vaccine (pilot lot production) elicited safety and immunogenicity of this vaccine in phase I and II studies in healthy adult volunteers. This live vaccine was safe, produced well tolerated side effects, and was highly immunogenic. Among the various vaccine approached, an attenuated live virus to be chosen should contain the gene for a broadly cross reacting protective antigen.

บทนำ

โรคไข้วอดช้อยงลาย เป็นโรคติดเชื้อเกิดจากไวรัส Chikungunya หรือ CHIKV ซึ่งเป็น arthropod-borne virus มีช้อยงลายชนิด *Aedes aegypti* เป็นพาหะนำโรค นักไวรัสวิทยาจัด CHIKV ไว้ใน genus Alphavirus⁽¹⁾ สำหรับไวรัสเด็งกีและไวรัส

ไซ้สมองอักเสบเจอี ซึ่งรู้จักกันแพร่หลายนั้น จัดไว้ใน genus Flavivirus จากการทำ seroepidemiology survey ของในเอเชีย พบว่าลิ่งเหล่านั้มี antibody ต่อ CHIKV อยู่ในกระแสเลือดบ่งบอกว่าเคยถูก infect ด้วย CHIKV จากข้อมูลนี้⁽²⁾ ทำให้มีการตั้งช้อยสงสัยงว่าลิ่งป่าน่าจะมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับระบบ

นิเวศวิทยาของ CHIKV อะไรคือปัจจัยที่กระตุ้น ทำให้มีการระบาดในคนเป็นระยะๆ เป็นเรื่องที่จะต้องศึกษากันต่อไป

โรคไข้วัดช้อยุงลาย เป็นโรคที่ระบาดแพร่หลายใน 2 ทวีป ได้แก่ ทวีปแอฟริกา และเอเชีย⁽³⁾ สำหรับประเทศไทยมีการระบาดของ CHIKV ตั้งแต่ พ.ศ. 2501 ต่อมามีการระบาดอีกหลายครั้ง⁽⁴⁾ เป็นที่น่าสังเกตว่าพื้นที่ระบาดของ CHIKV จะทับซ้อนอยู่กับพื้นที่ระบาดของไวรัสเด็งกีที่มีผู้ป่วยหนาแน่นแบบ hyper endemic เป็นที่น่าสังเกตว่า ขณะนี้นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพยายามพัฒนาวัคซีนใช้เด็งกีเพื่อใช้ในการลดอัตราป่วยของโรคไข้เด็งกี คำถามที่จะตามมาคือ หากสามารถควบคุมลดการแพร่กระจายในธรรมชาติของไวรัสเด็งกีแล้ว จะส่งผลกระทบต่อทำให้มีการแพร่ระบาดของ CHIKV เพิ่มขึ้นหรือไม่ เพราะไวรัสทั้ง 2 ชนิด ซึ่งใช้ยุงชนิดเดียวกันเป็นพาหะนำโรค เราจึงควรศึกษาหาข้อมูลของความสัมพันธ์ของไวรัสทั้ง 2 ไวรัสและเตรียมความพร้อมไว้แต่เนิ่นๆ

พยาธิกำเนิด และภูมิคุ้มกันป้องกันเชื้อไวรัส CHIKV

เมื่อยุงลายชนิด *Aedes* กัดและดูดเลือดของ host ส่วนของปากยุงจะเจาะทะลุชั้นผิวหนัง ทำให้เชื้อไวรัส CHIKV สามารถเข้าสู่ร่างกาย โดยใช้ผิวหนังเป็น portal of entry จากนั้นเชื้อไวรัสจะแบ่งตัวใน target cells ซึ่งอยู่ใต้ผิวหนังและแพร่เข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง และระบบไหลเวียนของเลือดและกระจายไปทั่วร่างกายของ host เซลล์เป้าหมายที่ไวรัสใช้แบ่งตัวประกอบด้วย Reticuloendothelial cells ต่อม้ำน้ำเหลือง ตับ ม้าม และอื่นๆ การกระจายของไวรัสตามอวัยวะต่างๆ ทำให้

เกิด “systemic phase of viremia” ซึ่งเกิดขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีไข้สูง หนาวสั่น และปวดเมื่อยตามร่างกาย ภูมิคุ้มกันชนิด Humoral Antibody จะถูกสร้างในเวลาต่อมาและมีบทบาทมากในการกำจัด (neutralize) เชื้อไวรัสทำให้การติดเชื้อนั้นสิ้นสุดลง ภูมิคุ้มกันชนิด neutralizing antibody จะคงอยู่นานตลอดไปเพราะเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันระบบย่อยทุกระบบอย่างกว้างขวาง เช่น การกระตุ้น memory T cell เป็นต้น การพัฒนาวัคซีนจึงควรใช้หลักการนี้เพื่อสร้างระบบ ภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์ให้ไปทำหน้าที่ขัดขวางการติดเชื้อ CHIKV

เป็นที่น่าสนใจว่าตลอดระยะเวลาของการแพร่ระบาดของโรคไข้วัดช้อยุงลายในประเทศไทย ในระยะ 30-40 ปีที่ผ่านมา มีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้น้อยมาก อย่างไรก็ตาม จากรายงานการพิสูจน์ตรวจศพเด็กอายุ 1 ขวบที่เสียชีวิตที่โรงพยาบาลศิริราช โดย ศ.ดร.ณัฐ ภูมิประวดี⁽⁵⁾ ถือเป็นรายงานการตรวจที่มีคุณค่ามาก ทำให้มีโอกาสเรียนรู้พยาธิกำเนิดของโรคที่เกิดขึ้นในคนซึ่งโอกาสเช่นนี้หาได้ยากยิ่ง สำหรับการระบาดครั้งล่าสุดในประเทศไทย เมื่อ พ.ศ. 2550-2551 แม้มีรายงานการติดเชื้อในสตรีตั้งครรภ์ ส่งผลให้มีการแท้งสืบเนื่องมาจากการติดเชื้อ CHIKV ในผู้ป่วยหลายราย แต่เป็นที่น่าสนใจที่เราไม่ได้ทำการศึกษาทางพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นเลย ทำให้พลาดโอกาสไปอย่างน่าเสียดายจากข้อมูลของการระบาดในอินเดียพบผู้เสียชีวิตจำนวนหนึ่งเช่นกัน รวมทั้งมีรายงานอาการผิดปกติทางสมอง โดยทั่วไป การระบาดของ CHIKV จะทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่มมีอาการปวดข้อเป็นอาการหลัก บางรายอาจมีอาการดังกล่าวนานหลายเดือน ช่วงเวลาดังกล่าวไม่สามารถทำการประกอบอาชีพตามปกติได้ ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนที่มีความปลอดภัย มีประสิทธิภาพสูงและ

ราคาถูก จึงเป็นโจทย์ที่ผู้รับผิดชอบควรพิจารณา ไตร่ตรองให้รอบคอบแล้วตัดสินใจทำการอย่างหนึ่งอย่างใดให้เป็นรูปธรรม

ความสำคัญของสายพันธุ์กรรมของไวรัส CHIKV ต่องานการออกแบบวัคซีน CHIKV ที่เหมาะสม

ไวรัส CHIKV ประกอบด้วย RNA สายเดี่ยว ชนิด positive sense มี genome ขนาด 12 kilobases เมื่อนำเชื้อไวรัสที่ผ่านการเรียงลำดับสายพันธุ์กรรมของ gene ส่วนที่เป็นเปลือก (envelop) ซึ่งเป็นส่วนของไวรัสที่กระตุ้นเกิดการสร้าง neutralizing antibody ผลของการวิเคราะห์พบว่าสามารถแยกกลุ่มของ CHIKV สายพันธุ์ต่างๆ ออกเป็น 3 clades ได้แก่ (1) Asian, (2) West African และ (3) East-Central South African (ECSA)

สำหรับ CHIKV สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย อินเดียและประเทศไทย ใน พ.ศ. 2549-2551 นั้น พบว่าเป็น ECSA clade^(6, 7) ไวรัสดังกล่าวมี point mutation เกิดขึ้นที่ E glycoprotein ตำแหน่งที่ 226 โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก Alanine ไปเป็น Valine เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นวิวัฒนาการของ CHIKV ส่งผลให้เป็นประโยชน์ต่อเชื้อไวรัสในการอยู่รอดและแพร่ได้ดียิ่งขึ้น ในธรรมชาติ สมมุติฐานนี้มีข้อมูลสนับสนุนทางระบาดวิทยา กล่าวคือ พบว่า CHIKV สายพันธุ์ใหม่สามารถเจริญเพิ่มปริมาณได้ดีในยุงลายชนิด *Aedes albopictus*⁽⁸⁾ พบว่าโรคไขข้ออักเสบแพร่ระบาดไปในหมู่คนทำสวนยางพาราควบคู่กับการขยายพื้นที่ทำสวนพืชเศรษฐกิจชนิดนี้ ขณะเดียวกันบริเวณสวนยางก็มี ยุงลายชนิด *Ae. albopictus* จำนวนมากไว้มองรับการแพร่พันธุ์ของไวรัส CHIKV สายพันธุ์ใหม่

ตลอดระยะเวลาประมาณ 50 ปี ที่นักวิทยาศาสตร์ Isolate virus ชนิดนี้ได้พบว่า gene ของไวรัส CHIKV มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ จนถึงปัจจุบันแยกออกเป็น 3 clades ในช่วง พ.ศ. 2504-2543 ประเทศไทยเคยพบเฉพาะการระบาดของ Asian clade เท่านั้นในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น ECSA clade เนื่องจากเหตุผลดังกล่าวผู้ที่ทำงานด้านการพัฒนาวัคซีนจึงต้องพิจารณาว่าควรเลือกใช้ CHIKV สายพันธุ์ไหนในการเริ่มต้นพัฒนางาน หากใช้ CHIKV สายพันธุ์ Asian clade เพื่อพัฒนาไปเป็นวัคซีน วัคซีนที่ได้จากการใช้ Asian clade จะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ CHIKV สายพันธุ์ ECSA ที่กำลังแพร่ระบาดในปัจจุบันได้หรือไม่ นอกจากปัญหาของเชื้อไวรัสแล้ว เรายังมีปัญหาของการเลือกใช้ technology ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาวัคซีน เช่น เราจะเลือกพัฒนา Viral Like Particle สำหรับ CHIKV Vaccine ดีหรือไม่ หรือจะเลือกใช้ subunit CHIKV vaccine ดีจึงจะทำให้มีโอกาสค้นพบวัคซีนเป้าหมายเร็วที่สุดและดีที่สุด ผู้วิจัยจำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสม หากเลือกออกแบบผิดจะเสียเวลา และโอกาสในการทำงานระยะยาวนานนับ 10 ปี

เมื่อทบทวนวรรณกรรมดูตัวอย่างวัคซีนที่ประสบความสำเร็จที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน พบว่า วัคซีนไขเหลือง (Yellow Fever 17D) เป็นตัวอย่างที่ดีมาก Gaucher⁽⁹⁾ ได้ทำการศึกษาว่า the whole vision ของวัคซีนชนิดนี้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ซับซ้อนของร่างกายของ host ได้อย่างไร ทีมงานวิจัยคณะนี้สรุปว่า วัคซีนไขเหลืองสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันย่อยๆ ที่ผสมผสานกัน (integrated immune responses) ซึ่งประกอบด้วย effector arms ทั้ง innate immunity และ adaptive ส่งผล

ให้มีการกระตุ้นทั้ง T และ B cells, complements, inflammosomes และ interferons ในกรณีนี้ Live attenuated Yellow Fever 17D vaccine ซึ่งได้ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ (attenuate) แล้ว ไม่ทำให้เกิดโรคในขณะเดียวกันสามารถกระตุ้นร่างกาย host อย่างเหมาะสมโดยระบบภูมิคุ้มกันย่อยๆ เหล่านี้รวมพลังเข้าด้วยกัน ส่งผลให้สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส wild type ในธรรมชาติเชื่อว่าการศึกษาของผู้วิจัยคณะดังกล่าวจะเป็นแนวทางที่ดีในการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคไข้วัดช้อยลงลายที่กำลังวิจัยค้นคว้า ในขณะนี้รวมทั้งคนอื่นๆ ที่ทำงานด้านวัคซีน

การศึกษาวิจัยในลิงทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส CHIKV เป็นขั้นตอนแรกก่อนจับงานพัฒนาวัคซีน

หน่วยงาน Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) ในสังกัดกองทัพบกสหรัฐ เริ่มสนใจงานพัฒนาวัคซีนไข้วัดช้อยลงลายมาเป็นเวลา 50 ปีแล้ว ในราว พ.ศ. 2504 เมื่อผู้วิจัย

ของกองทัพบกสหรัฐได้รับมอบเชื้อ CHIKV ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย จึงนำไปศึกษาเกี่ยวกับ infectivity และการพัฒนา antibody ในลิงที่ได้รับ Wild type CHIKV⁽¹⁰⁾ ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่จำเป็นสำหรับงานพัฒนาวัคซีน CHIKV ซึ่งเป็นขั้นตอนลำดับถัดไปคือ คณะผู้วิจัยชุดนี้สรุปว่า Rhesus monkey เป็น laboratory-animal model ที่เหมาะสมมาก สำหรับการศึกษารื่องของ CHIKV vaccine ส่งผลให้งานพัฒนาวัคซีนลดความยุ่งยากลงไปมาก

งานพัฒนาวัคซีนไข้วัดช้อยลงลายที่ได้พัฒนาไปจนถึงระดับการทดสอบในคน

ปัจจุบันมีวัคซีนไข้วัดช้อยลงลายเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ได้รับการพัฒนาจากวัคซีนต้นแบบผ่านขบวนการทดลองระดับ pre-clinic จนถึงระดับทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพในคน

วัคซีนชนิดที่ 1 วัคซีนไข้วัดช้อยลงลายชนิดเชื้อตาย (Inactivated Chikungunya vaccine)^(11, 12)

ตารางที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลของวัคซีนไข้วัดช้อยลงลายชนิดเชื้อตายของกองทัพบกสหรัฐ

ประเด็น	รายละเอียด
เจ้าของ	WRAIR, USA
เชื้อไวรัสที่ใช้	Asian clade Strain 15561 จากประเทศไทย
เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยง	Green monkey kidney cell culture
สารที่ใช้ในการทำเชื้อไวรัสตาย	Tween-80 หรือ Formaldehyde
การทดสอบในคนระยะ phase I	<ul style="list-style-type: none"> ใช้อาสาสมัคร 16 คน อายุ 21-25 ปี 2 doses ห่างกัน 28 วัน ปลอดภัยและมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นในระดับน่าพอใจ ระยะเวลาติดตามผล 42 วัน

วัคซีนชนิดที่ 2 วัคซีนไขปวดข้อยุงลายชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live attenuated Chikungunya vaccine) ^(14,15)

ตารางที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลของวัคซีนไขปวดข้อยุงลายชนิดเป็นอ่อนฤทธิ์ที่พัฒนาโดยกองทัพบกสหรัฐ

ประเด็น	รายละเอียด
เจ้าของ	WRRAIR, USA
เชื้อไวรัสที่ใช้	Asian clade Strain 15561 จากประเทศไทย
ขบวนการ attenuate เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง	<ul style="list-style-type: none"> • เบื้องต้น 10 passage แรกทำใน Primary green monkey kidney cells • ต่อไปจึง clone เชื้อไวรัสโดยวิธี terminal dilution แล้วเพาะเลี้ยงต่อใน certified MRC-5
clone ที่คัดเลือกเป็นวัคซีน	18/clone 25
ขบวนการในการคัดเลือกเชื้อใช้ criteria ดังนี้	<ol style="list-style-type: none"> 1. small plaque size : ได้ homogenous small plaque size 2. temperature sensitivity : Positive 3. suckling mouse virulence : decrease 4. monkey viraemia : reduced/no 5. genetic suability : stable 6. induction of neutralizing antibody : high 7. protection against challenge : protective
การทดสอบในคน	ระยะเวลาที่ 1/ระยะที่ 2 อาสาสมัครที่ได้รับวัคซีน 59 คน ผล : ทุกคนปลอดภัย มี 5 คน ที่มีอาการปวดข้อช่วงระยะเวลาสั้นๆ มีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น 98% ภายใน 28 วัน การติดตามผลที่ 1 ปี มีภูมิคุ้มกันเหลือ 85%

ประเทศไทยจะเลือกไปทางไหนดี

พ.ศ. 2549 มีการระบาดของโรคไขปวดข้อยุงลายในอินเดีย ตามมาด้วยการระบาดในมาเลเซีย 2 ปีต่อมาแพร่เข้าครอบคลุมทั่วภาคใต้ของประเทศไทย การระบาดของโรคครั้งนี้ไม่ได้เป็นครั้งแรก ในทางตรงกันข้ามมีการระบาดเกิดขึ้นแล้วหลายครั้ง การระบาดในครั้งนี้อาจไม่เหมือนกับครั้งก่อนๆ กล่าวคือไวรัส CHIKV มีวิวัฒนาการ มีการเปลี่ยนแปลงในสายพันธุกรรมทำให้มีประสิทธิภาพในการแพร่ในยุง

Aedes albopictus ได้ตีขึ้น⁽¹⁶⁾ ส่งผลให้มีการระบาดหนักในกลุ่มประชากรในเขตชนบท จากการสำรวจหาแหล่งกักเก็บโรคในประเทศพบว่า ลิงในทุกภาคของประเทศเป็นแหล่งกักเก็บโรคที่สำคัญ จากข้อมูลนี้เชื่อว่าไวรัสชิคุนกุนยาได้ฝังตัวในธรรมชาติในประเทศนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว รอเฉพาะจังหวะที่เหมาะสมที่จะระบาด

ในขณะที่ประเทศไทยกำลังเคลื่อนเข้าสู่ยุคพัฒนาวัคซีนไขปวดข้อออกได้ถึงทั้ง 4 ชนิดในภาคสนาม

ซึ่งใช้อาสาสมัครหลายพันคน ในสนามทดสอบวัคซีน อย่างน้อย 2 สนาม ได้แก่ ที่จังหวัดราชบุรี และจังหวัด กำแพงเพชร คาดว่าเมื่อมีการใช้วัคซีนใช้เลือดออก เด็งกีในโครงการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันแล้ว จะส่งผลให้อัตราป่วยรวมทั้งยุงที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ก็ควรจะ ลดน้อยลงอย่างมาก แนวโน้มนี้เป็นไปในทิศทาง เดียวกันกับ

ทุกโรคเมื่อใช้วัคซีนในประชากรจำนวนมาก คำถามที่ตามมาทันทีคือ เมื่อถึงเวลานั้นแล้วไวรัส CHIKV จะแพร่เข้าไปในประชากรต่างๆ แทนที่ไวรัส เด็งกีหรือไม่ หรือพูดอีกนัยหนึ่งว่า เมื่อโรคใช้เลือดออก เด็งกีลดน้อยลงแล้วกลับทำให้โรคใช้ปวดข้อยุงลาย จะเพิ่มมากขึ้นเข้ามาแทนที่หรือไม่

กองทัพบกสหรัฐมีวิสัยทัศน์ ทำให้มีการ ดำเนินงานพัฒนาวัคซีน CHIKV มานานแล้ว ขณะนี้ มีความร่วมมือประเทศสหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส ในการนำวัคซีน CHIKV ซึ่งเคยพัฒนาจนถึงระดับ ฉีดทดสอบความปลอดภัยและการสร้างภูมิคุ้มกัน ในคน จนทราบผลว่าน่าพอใจในระดับหนึ่ง เป็นเรื่อง ที่ดีที่ฝ่ายผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรมของ ประเทศไทยกำลังเตรียมการเพื่อนำวัคซีนที่กองทัพ บกสหรัฐพัฒนาไปสู่การผลิตวัคซีน CHIKV ในระดับ อุตสาหกรรม กิจกรรมดังกล่าวจะเป็นการเริ่มต้น เพื่อให้มีการพัฒนาวัคซีน CHIKV เป็นรูปธรรม จับต้องได้ ขณะเดียวกันนักวิชาการฝ่ายวิจัยและ พัฒนาวัคซีนของประเทศไทย ก็จะได้มีโอกาสร่วม ทำงานประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัย ของวัคซีนชนิดนี้พร้อมๆ กับการพัฒนาวัคซีน ชนิดอื่นเป็นทางเลือก ในกรณีที่วัคซีนที่พัฒนาโดย กองทัพบกสหรัฐมีข้อบกพร่อง ผลแห่งความร่วมมือ ร่วมแรงระหว่างภาครัฐและภาคเอกชนในการทำวิจัย

จะเป็นแรงขับเคลื่อนที่ทรงพลังจะเป็นหลักประกัน เป็นอย่างดีว่า ภายในเวลาที่ไม่ยาวนานนักประชาชน ระดับรากหญ้าที่หาเช้ากินค่ำจะมีวัคซีนที่ดีอีกชนิด- หนึ่งที่เข้าไปมีส่วนทำให้มีสุขภาพของเขาเหล่านั้น ดีขึ้นงานความร่วมมือนี้ยังเป็นตัวอย่างของความ ร่วมมือระหว่างภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมของ เอกชน ในการทำงานวิจัยประยุกต์ซึ่งหลายๆ ฝ่าย ต้องการให้เกิดขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Strauss JH., Strauss EG., The Alphaviruses: Gene expression replication and evolution. *Microbiol Rev* 1994; 58:491-562.
2. Harrison VR., et al. 1967 The presence of antibody to Chikungunya and other serologically related arboviruses in the sera of subhuman primate imports to the United States. *J. Immun.* 1998; 979-81.
3. Johnson RE., Peters CJ. Alphaviruses associated primarily with fever and polyarthritis. In: Fields BN., Knipe DM. Howley PM. editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Raver Publishers; 1996.
4. Nimmannitya S., et al. Dengue and chikungunya virus infection in nan in Thailand, 1962-1964. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am J Trop Med and Hyg.* 1969; 18(6): 954-70.
5. Bharmapapravati N., et al. Encephalitis and pneumonitis due to Chikungunya virus: Report of a Fatal Case 2549; 8:627-32.
6. Shuffenceker I., et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLOS Med.* 2006; 3: e 263.
7. Kumar CVM., Naresh et al. Molecular characterization of Chikungunya virus from Anothra Pradesh, India+phylogenetic relationship with Central African isolates. *Indian J Med Res.* 2007; 126: 534-40.

8. Tssetsarkin KA., et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLOS Pathogen* 2007; 3(12):1-12.
9. Gaucher D., et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med.* 2008; 205(B): 3119-131.
10. Binn, N., et al. Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with Chikungunya and other serologically related group A arboviruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1967; 16(6): 782-5.
11. While A., et al. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines propagated in monkey kidney monolayers and chick embryo suspension cultures. *Applied Microbiol.* 1972; 23(5):951-2.
12. Eckels KH., et al. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-Either extraction. *Appl Microbiol.* 1970; 19(2): 321-5.
13. Harrison VR. et al. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol.* 1971; 107: 643-7.
14. Levitt NH. et al. Development of attenuated strain of Chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine* 1986, 4:157-162.
15. Edelman R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live Chikungunya vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62(6): 681-5.
16. Thavara U., 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). *Southeast Asia. J Trop Med Public Health* 2009; 40(5): 951-62.

