

การบรรยาย

การระบาดของไข้หวัดใหญ่ระดับโลกแรกในประเทศไทย เดือนพฤษภาคม-ตุลาคม 2552

(First Wave of the Influenza Pandemic in Thailand,
May-October 2009)

นพ.โสภณ เอี่ยมศิริถาวร

นพ.จักรรัฐ พิทยาวงศ์อานนท์

นพ.คำนวณ อึ้งชูศักดิ์

สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทนำ

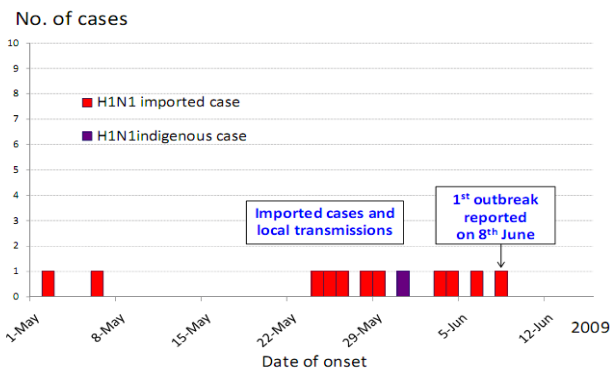
การระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ Influenza A (H1N1) 2009 พบในประเทศเม็กซิโกตั้งแต่เดือนมีนาคม 2552 นับเป็นจุดเริ่มต้นของการระบาดใหญ่ทั่วโลกของไข้หวัดใหญ่ในศตวรรษที่ 21 โดยองค์การอนามัยโลกได้ประกาศเตือนภัยเรื่องการแพร่ระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่เป็นภาวะฉุกเฉินทางด้านสาธารณสุขระหว่างประเทศ (Public Health Emergency of International Concern) เมื่อวันที่ 25 เมษายน 2552 และต่อมาวันที่ 11 มิถุนายน 2552 ได้ประกาศเป็นระดับ 6 การแพร่ระบาดใหญ่ทั่วโลก (pandemic phase 6) สำหรับประเทศไทยมีเฝ้าระวังการระบาดอย่างใกล้ชิดโดยศูนย์ปฏิบัติการตอบโต้ภาวะฉุกเฉินกรมควบคุมโรคได้เริ่มต้นการทำงานในวันที่ 25 เมษายน 2552 และดำเนินมาตรการต่างๆตามแผนยุทธศาสตร์ป้องกันแก้ไขและเตรียมพร้อมรับมือปัญหาโรคไข้หวัดนกและการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2551-2553

ระยะต้นของการระบาดในประเทศไทย

ผู้ป่วยที่มีผลตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยันการติดเชื้อ Influenza A (H1N1) 2009 รายแรกของประเทศไทยเริ่มต้นเดือนพฤษภาคม 2552 เป็นนักเรียนแลกเปลี่ยน 2 รายที่เดินทางกลับจากประเทศเม็กซิโก เริ่มป่วยวันที่ 2 และ 4 พฤษภาคม และต่อมาพบผู้ป่วยติดเชื้อกลับจากต่างประเทศหลายรายในช่วงปลายเดือนพฤษภาคม (รูปที่ 1) ตรงกับระยะเปิดภาคเรียนของสถาบันการศึกษาและ

โรงเรียนในประเทศไทย ทั้งนี้ ผู้ป่วยยืนยัน 12 รายแรกในประเทศไทยเป็นผู้ป่วยที่เดินทางกลับจากต่างประเทศจำนวน 11 ราย และ 1 รายติดเชื้อในครอบครัวของผู้ป่วยกลับจากต่างประเทศ แต่ผู้ป่วยชาวไทยเหล่านี้มีอาการไม่รุนแรง ส่วนใหญ่เป็นนักเรียนและนักธุรกิจไทยที่เดินทางมาจากทวีปอเมริกาเหนือจึงเชื่อได้ว่าในช่วงระยะปลายเดือนพฤษภาคมต่อกับต้นเดือนมิถุนายน มีผู้ป่วยและผู้ติดเชื้อจำนวนไม่น้อยที่เข้ามาในประเทศไทย และเริ่มมีการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในประเทศไทยอย่างเงียบ ๆ การสกัดกั้นการนำเอาไวรัสมาในประเทศไทยไม่ได้ผล สังเกตจากไม่พบชาวต่างชาติที่ตรวจพบติดเชื้อในระยะเวลาดังกล่าว แต่เชื่อว่าบางสวนคงหลุดรอดเข้ามาอย่างแนบเนียน

การระบาดในชุมชนที่แสดงให้เห็นการถ่ายทอดเชื้อในประเทศไทยที่ชัดเจนเริ่มวันที่ 8 มิถุนายน 2552 (รูปที่ 1) ภายหลังจากสำนักกระบาดวิทยาได้รับแจ้งจากนักศึกษาชาวไต้หวันเดินทางกลับจากประเทศไทยและป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ โดยมีประวัติไปเที่ยวที่สถานบันเทิงแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรีก่อนการป่วย และต่อมาผลการสอบสวนโรคยืนยันพบการระบาดในสถานบันเทิงแห่งนี้ วันถัดมา 9 มิถุนายน 2552 มีรายงานเด็กนักเรียนชายในโรงเรียนเอกชนแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร ซึ่งไม่ได้เดินทางไปต่างประเทศป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่และมีผลการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ พบไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ทั้งสองเหตุการณ์นี้นับเป็นจุดเริ่มต้นของการเฝ้าระวังการบรรเทาผลกระทบของการระบาดตามมาตรการสกัดกั้น เชื้อไวรัสจากต่างประเทศ



Source: Bureau of Epidemiology, MOPH, Thailand

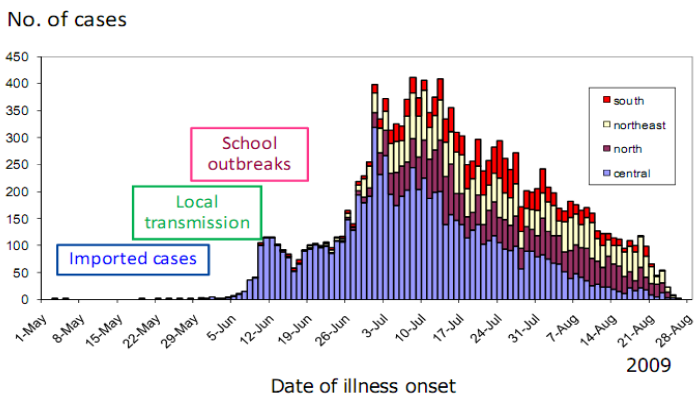
รูปที่ 1. จำนวนผู้ป่วยยืนยัน Influenza A (H1N1) 2009 ที่ได้รับรายงาน 12 รายแรก ในประเทศไทย เดือนพฤษภาคม-มิถุนายน 2552

การระบาดในเดือนมิถุนายน 2552 เกิดขึ้นในกรุงเทพมหานครและจังหวัดในเขตปริมณฑล โดยพบการระบาดในโรงเรียนประถมและมัธยมหลายแห่ง จำนวนผู้ป่วยในระยะเวลาดังกล่าวเป็นผู้ป่วยวัยนักเรียนมากถึงร้อยละ 60-70 และกลางเดือนมิถุนายนยังพบการระบาดในค่ายทหารแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ซึ่งทั้ง 3 เหตุการณ์ระบาดนี้ มีอัตราป่วยสูงถึงร้อยละ 30-50 ของประชากรในสถานที่ระบาดแห่งนั้น ในระยะปลายเดือนมิถุนายนเริ่มมีรายงานการเสียชีวิตจากไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่

จากการสอบสวนการระบาดของไข้หวัดใหญ่ในเหตุการณ์หนึ่งพบว่า อัตราการติดเชื้อไวรัสสูงถึงร้อยละ 68 โดยในบรรดาผู้ติดเชื้อมีเพียงร้อยละ 71 ที่แสดงอาการทางเดินหายใจ

ระยะการระบาดรุนแรงในเมืองใหญ่ของประเทศไทย

แม้ว่ากระทรวงสาธารณสุขและทุกหน่วยงานจะทุ่มเทดำเนินการควบคุมโรคอย่างเต็มที่ แต่ในระยะต้นเดือนกรกฎาคมปัญหาการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีเด็กนักเรียนที่ป่วยในโรงเรียนเป็นตัวกลางแพร่เชื้อระหว่างโรงเรียน ในระยะปลายเดือนมิถุนายนโรงเรียนนั้บร้อยละ 60-70 ที่มีการตรวจพบผู้ป่วยยืนยันการติดเชื้อ นอกจากนี้นักเรียนยังเป็นกลุ่มสำคัญที่ส่งผ่านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ไปยังสมาชิกในครัวเรือนและส่งต่อไปยังชุมชน การไปร่วมกิจกรรมที่รวมคนจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นการแสดงคอนเสิร์ต การแข่งกีฬา หรือการชกมวยที่มีนักเรียนจากหลายจังหวัดมารวมตัวกันมากๆ ในระยะต้นเดือนกรกฎาคมเป็นเชื้อไฟอย่างดีที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดไปยังจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 2) โดยมีักตรวจพบการระบาดในพื้นที่อำเภอเมือง หรือ อำเภอใหญ่ ๆ ในจังหวัดก อนพื้นที่ชนบทสอดคล้องกับ ข อมูลการเฝ้าระวังผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่สถานบริการด้วยอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ที่มีจำนวนผู้ป่วยสูงสุดในเดือนกรกฎาคม 2552 สอดคล้องกับข้อมูลจากการเฝ้าระวังระบบ Sentinel surveillance for H1N1 ในโรงพยาบาล 13 แห่งทั่วประเทศ ที่พบว่าสัดส่วนการตรวจพบ Influenza A (H1N1) 2009 ในผู้ป่วยที่มารับ การรักษาด้วยอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ลดลงอย่างชัดเจนจากร้อยละ 68.8 ในกลางเดือนกรกฎาคม เหลือเพียงร้อยละ 6.8 ในเดือนตุลาคม 2552



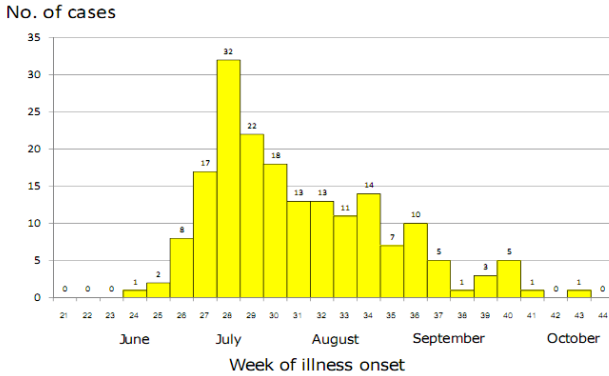
Source: Bureau of Epidemiology, MOPH, Thailand

รูปที่ 2. จำนวนผู้ป่วยอินฟลูเอนซ่า A (H1N1) 2009 แยกรายภาค ประเทศไทย เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2552

ระยะการระบาดในพื้นที่ต่างจังหวัดของประเทศไทย

ในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม การระบาดของไข้หวัดใหญ่แพร่กระจายไปเกือบทุกจังหวัดของประเทศไทย ลักษณะการระบาดในพื้นที่เริ่มต้นจากในโรงเรียนคอนเซนเดียวกับที่พบในกรุงเทพมหานคร กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับหน่วยงานต่างๆ ทั้งในสวนกลางและในสวนภูมิภาคระดมพลังในการควบคุมโรค นับว่าเดือนกรกฎาคมเป็นช่วงที่มีการระบาดรุนแรงให้เห็นในโรงเรียนและชุมชน และพบผู้ป่วยเสียชีวิตจากไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ต่อสัปดาห์สูงสุด (รูปที่ 3) เป้าหมายการดำเนินงานจึงเป็นการลดอัตราการป่วยตายที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่เกิดขึ้นต่อเนื่องอย่างรวดเร็วในพื้นที่ต่างจังหวัด ในขณะที่จำนวนผู้ป่วยในเมืองหลวงเริ่มลดลงในเดือนสิงหาคม

นอกจากนี้ เริ่มมีรายงานการระบาดเกิดขึ้นในเรือนจำบางแห่ง แสดงให้เห็นว่าการระบาดเริ่มเข้าสู่กลุ่มประชากรที่เข้าถึงยากในระยะเดือนสิงหาคม



Source: Bureau of Epidemiology, MOPH, Thailand

รูปที่ 3. จำนวนผู้ป่วยยืนยัน Influenza A (H1N1) 2009 ที่เสียชีวิตในประเทศไทย
เดือนมิถุนายน-ตุลาคม 2552

ระยะชลดตัวของการระบาดระลอกแรกในประเทศไทย

ในเดือนกันยายนถึงตุลาคม พบว่า การระบาดของไข้หวัดใหญ่เริ่มชลดตัวลงทั้งจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตรายใหม่ในแต่ละสัปดาห์ แม้ว่าในเดือนกันยายนยังคงพบการระบาดพื้นที่ต่างจังหวัดแต่ก็เป็นการระบาดในพื้นที่ห่างไกลออกไป สำหรับเดือนตุลาคมเป็นเดือนที่นักเรียนสวนใหญ่ปิดภาคเรียนทำให้การถ่ายทอดเชื้อในเด็กวัยเรียนลดน้อยลง ประกอบกับเด็กสวนใหญ่ผานเหตุการณ์ระบาดมาแล้วตั้งแต่นปีการศึกษา นับจากเริ่มต้นพบผู้ป่วยในเดือนพฤษภาคม ถึงวันที่ 31 ตุลาคม 2552 เป็นเวลา 6 เดือน สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยยืนยันไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่สะสมจำนวนทั้งหมด 28,391 ราย ในจำนวนนี้เสียชีวิต 184 ราย คิดเป็นอัตราป่วยตายร้อยละ 0.65 ผู้ป่วยที่เสียชีวิตสวนใหญ่มีโรคประจำตัวหรือภาวะเสี่ยง เช่น สูบบุหรี่ ร้อยละ 73.4 และโดยเฉลี่ยเริ่มได้รับยาต้านเชื้อไวรัส oseltavimир หลังจากเริ่มป่วยนาน 5 วัน

จากแบบจำลองคณิตศาสตร์พบว่า จำนวนผู้ติดเชื้อที่แท้จริงในประเทศไทยอาจสูงมากถึง 10 ล้านคน หรือร้อยละ 15 ของประชากร ในระยะ 6 เดือนที่ผ่านมา แต่อัตราการติดเชื้อแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่และกลุ่มประชากร ซึ่งผู้ติด

เชื้อสวณใหญ่เกินครึ่งเป้นเด็กอายุน้อยกว่า 15 ป และอยู่ในเมืองมากกว่าชนบท
อนาคตของการระบาดระลอกที่สองในประเทศไทย ตั้งแต่เดือน
พฤศจิกายน 2552 เป้นต้นไป เป้นระยะที่ประเทศไทยเริ่มเขาสู่อุตุนหาวและเป้น
ช่วงเปดภาคเรียนที่สอง จึงมีโอกาศสูงที่จะเห็นจำนวนผู้ป่วยไขหวัดใหญ่เพิ่มมาก
ขึ้นอีกครั้ง อยางไรก็ตามเนื่องจากระชากรสวณหนึ่งมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อใน
ระยะที่ผานมา ประกอบกับประชาชนมีความรู้ในการป้องกันไขหวัดใหญ่มากขึ้น
และหนวยงานต่างๆ มีประสบการณในการจัดการกับปัญหาการระบาดได้ดีขึ้น
ดังนั้นเชื่อว การระบาดในระลอกที่สองคงมีผู้ป่วยและเสียชีวิตไม่มากกว่าที่
ประสบในระลอกแรกที่ผานมา ถาหากวามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ
เชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่ไปจากเดิมอยางมากมาย อยางไรก็ตามไขหวัดใหญ่จะยังคง
เป้นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยอีกนาน และตองการความรวม
มือรวมใจของทุกภาคสวณในการแกไขปัญหาและบรรเทาผลกระทบตอสุขภาพของ
ประชาชนในระยะยาว

พยาธิกำเนิดของไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1

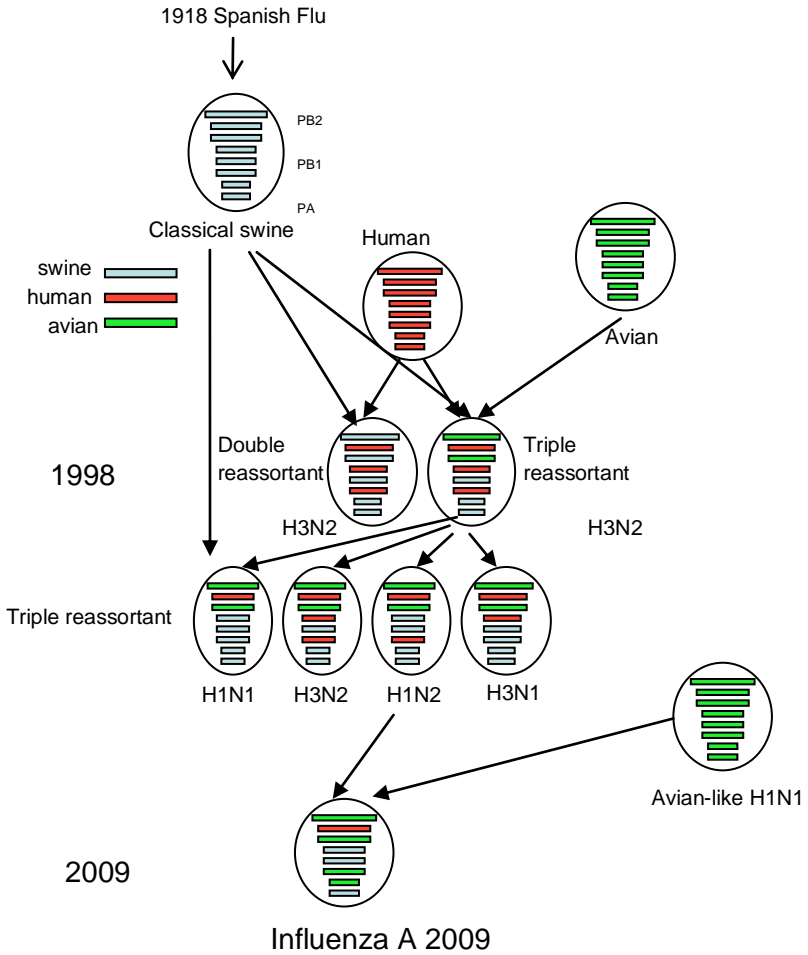
ศ. ดร. นพ. ประเสริฐ เอื้อวรากุล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

ไวรัส, ที่มา, ยีน และ virulence determinants

การศึกษาหารหัสพันธุกรรมและการวิเคราะห์แบบแผนวิวัฒนาการของไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 พบว่าไวรัสนี้เป็นลูกผสม (reassortant) ระหว่างไวรัสไข้หวัดหมู (swine influenza) ที่พบอยู่ในประชากรหมูในทวีปอเมริกาเหนือที่เรียกว่า triple reassortant และไวรัสไข้หวัดหมู H1N1 ที่พบอยู่ในประชากรหมูในยุโรปและเอเชีย (Eurasian lineage) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีบรรพบุรุษสายตรงมาจากนกอีกทีหนึ่ง โดยไวรัส 2009 ได้ยีน NA และ M มาจากไวรัสไข้หวัดหมูสายพันธุ์ Eurasian ส่วนยีนอื่นๆ ได้จากไวรัสชนิด triple reassortant (1) ซึ่งไวรัสชนิด triple reassortant นี้มีบรรพบุรุษมาจากไวรัสไข้หวัดหมู (classical swine influenza virus H1N1) ที่สืบเชื้อสายมาจากไวรัสที่คล้ายกับไข้หวัดใหญ่สเปน ในประมาณปี 1998 ไวรัส classical swine influenza ได้เกิดผสมกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลของคนชนิด H3N2 เกิดเป็นไวรัสลูกผสมเรียกว่า double reassortant และต่อมาได้ผสมกับไวรัสจากนกอีกทำให้มีแหล่งที่มาของยีนจากสามแหล่ง จึงเรียกว่า triple reassortant ซึ่งไวรัสชนิดนี้ได้มีการแพร่ระบาดในประชากรหมูทั่วไปในทวีปอเมริกาเหนือมาโดยตลอด และมีการผสมกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล H3N2 อีกจนทำให้มี ส่วนผสมของยีน HA และ NA ต่างๆ กัน ได้แก่ H1N1, H3N2, H1N2, และ H3N1 ไวรัส triple reassortant ที่ไปผสมกับไวรัส Eurasian จนทำให้เกิดไวรัส 2009 น่าจะเป็นไวรัส H1N2 รูปที่ 1 แสดงสายการวิวัฒนาการของไวรัสเหล่านี้



รูปที่ 1. แสดงที่มาของยีนต่างๆของไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009

ในยีนโนมของไวรัสไข้หวัดใหญ่มีหลายตำแหน่งที่เคยมีการศึกษาพบว่ามีส่วนต่อความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัส ลักษณะของยีนต่างๆที่พบว่าสัมพันธ์กับการก่อโรครุนแรงได้แก่

- Cleavage site ของ HA ที่มีลักษณะเป็น polybasic amino acid ซึ่งจะ ทำให้โปรตีน HA₀ ถูกตัดได้ด้วย furin ที่มีอยู่ทั่วไป ทำให้ไวรัสสามารถ แพร่กระจายไปทั่วร่างกาย (2)
- PDZ domain ที่ปลาย C terminus ของ NS1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ กับโปรตีนของเซลล์หลายชนิด (3)
- PB1F2 ซึ่งเป็นยีนขนาดเล็ก แทรกอยู่ใน frame ที่สองของ PB1 ซึ่งพบว่า สามารถทำให้เซลล์เกิด apoptosis (4)

พบว่าในยีนโนมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 ไม่มีลักษณะทั้งสามอย่างที่ กล่าวมานี้ จึงน่าจะทำให้ไวรัสมีความรุนแรงในการก่อโรคไม่สูงนัก

ความรุนแรงของโรคในคน

ถึงแม้ว่าอัตราการตายในรายงานจากการระบาดตั้งต้นในเม็กซิโกจะ ค่อนข้างสูงและทำให้เกิดความตื่นตระหนก แต่อัตราการตายที่สูงนั้นคาดว่าจะ เป็นผลมาจากการประมาณจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่ต่ำกว่าความเป็นจริง และการ ระบาดในระยะต่อมาในประเทศอื่นๆ พบว่ามีอัตราการตายต่ำใกล้เคียงกับไข้หวัด ใหญ่ตามฤดูกาล คือประมาณ 0.1% หรือต่ำกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าไข้หวัดใหญ่ 2009 มีรูปแบบของความรุนแรงต่างไปจากไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล กล่าวคือผู้ป่วย ที่มีอาการรุนแรงและเสี่ยงที่จะเสียชีวิตจากไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมักจะเป็น ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีโรคเรื้อรัง ในขณะที่ไข้หวัดใหญ่ 2009 มักจะพบในคนอายุน้อย และแม้จะมีกลุ่มเสี่ยงที่คล้ายกัน ได้แก่ผู้ที่มีโรคเรื้อรังต่างๆ และหญิงตั้งครรภ์ แต่ก็ มีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่อายุน้อยและไม่มีโรคเรื้อรังมาก่อน (5) แต่เกิดอาการรุนแรง และเสียชีวิตจากไข้หวัดใหญ่ 2009 ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้จะพบ pneumonia ที่สามารถ ลุกลามได้อย่างรวดเร็วจนเกิดภาวะ acute respiratory distress syndrome (ARDS) ซึ่งมีลักษณะการดำเนินโรคคล้ายกับไข้หวัดนก H5N1

ความรุนแรงของไวรัสในสัตว์ทดลอง

มีรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองในหนู, ferret และ ลิง macaque ซึ่ง รายงานผลตรงกันว่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงกว่า

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล โดยพบว่าสัตว์ทดลองมีน้ำหนักตัวลดลงมากกว่า มีการอักเสบในปอดมากกว่า และมีปริมาณไวรัสในปอดมากกว่า ทั้งนี้เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลติดเชื้อเฉพาะในทางเดินหายใจส่วนต้น แต่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 นั้นนอกจากจะติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนต้นได้ดีแล้ว ยังติดเชื้อในปอดได้ดีอีกด้วย ซึ่งตรงกับลักษณะทางคลินิกที่พบว่าสามารถทำให้เกิด pneumonia ได้บ่อยในคน (6-8)

ปัจจัยร่วม

ผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ 2009 ในประเทศไทยที่อาการรุนแรงและเสียชีวิตนั้น พบว่าส่วนใหญ่มีโรคเรื้อรังอยู่เดิม เป็นหญิงตั้งครรภ์ หรือ มีน้ำหนักตัวมากเกินไปภาวะเหล่านี้จะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอ และทำให้ติดเชื้อได้รุนแรงกว่าปกติ อย่างไรก็ตามรายละเอียดของสภาพภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือ ปฏิสัมพันธ์กับไวรัสที่เปลี่ยนแปลงไปในกลุ่มคนเหล่านี้ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

นอกจากนี้การติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำเติมก็น่าจะเป็นปัจจัยร่วมอย่างหนึ่งที่ทำให้โรครุนแรงขึ้น มีข้อมูลทั้งทางคลินิกและในสัตว์ทดลองอยู่เดิมสำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีมาก่อนหน้านี้ว่า การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และแบคทีเรียบางชนิดมีการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ในการที่จะก่อโรครุนแรง และทำให้เกิดอัตราการตายที่สูงขึ้น โดยเชื่อกันว่ากลไกที่ทำให้เกิด synergistic effect นี้เป็นเพราะการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกัน innate immunity ของร่างกายมีการตอบสนองไปในทิศทางที่ใช้สำหรับการต่อต้านไวรัสได้แก่การใช้ระบบ interferon ซึ่งไม่เหมาะสมกับการต่อต้านแบคทีเรีย ทำให้เมื่อติดเชื้อแบคทีเรียซ้ำเติม ร่างกายจึงไม่สามารถต่อต้านแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรง นอกจากนี้ยังมีข้อสมมุติฐานว่าเอนไซม์ neuraminidase ที่พบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดอาจมีส่วนช่วยทำให้ไวรัสไข้หวัดใหญ่แพร่เชื้อได้ดีขึ้น (9)

มีรายงานการตรวจชิ้นเนื้อปอดของผู้ที่เสียชีวิตจากไข้หวัดใหญ่ 2009 ในสหรัฐอเมริกา พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียสำคัญ ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, และ *Staphylococcus aureus* ใน 29% ของปอดที่นำมาศึกษา (10)

บทบาทของ receptor binding preference

การเลือกจับกับ receptor น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการติดเชื้อและความรุนแรงในการก่อโรคของไวรัสไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนก ในกรณีของไข้หวัดนก การเลือกชนิด receptor ของไวรัสมีบทบาทมาก เนื่องจาก receptor ชนิด $\alpha 2$, 3-linked sialic acid นั้นพบในเซลล์บุผนังหลอดลมปอด ทำให้ไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ติดเชื้อในปอดเป็นหลักและทำให้เกิด pneumonia ในขณะที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลเลือกใช้ receptor ชนิด $\alpha 2$, 6-linked sialic acid ซึ่งอยู่ในทางเดินหายใจส่วนต้น ทำให้การติดเชื้อไปลงไปในปอด ส วนไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 นั้น แม้จะพบว่าเลือกใช้ receptor ชนิด $\alpha 2$, 6-linked sialic acid เป็นหลัก แต่ก็พบว่าสามารถจับกับ $\alpha 2$, 3-linked sialic acid ได้บ้างด้วย affinity ที่ต่ำกว่า และยังมีรายงานอีกว่าเมื่อเอาไวรัสไปทดสอบการจับกับเนื้อเยื่อปอด ก็พบว่าไวรัสชนิดนี้ สามารถจับกับเซลล์บุผนังหลอดลมปอดได้บ้าง ซึ่งนี้อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ไวรัสชนิดนี้ติดเชื้อในปอดได้ดีกว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล และเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การก่อโรครุนแรงกว่าไข้หวัดใหญ่ปกติ (7)

บรรณานุกรม

1. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009 Jun 25;459(7250):1122-5.
2. Walker JA, Molloy SS, Thomas G, Sakaguchi T, Yoshida T, Chambers TM, Kawaoka Y. Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J Virol* 1994 Feb;68(2):1213-8.
3. Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Mar 18;105(11):4381-6.
4. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 2001 Dec;7(12):1306-12.

5. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, Ramirez-Venegas A, Rojas-Serrano J, Ormsby CE, Corrales A, Higuera A, Mondragon E, Cordova-Villalobos JA; INER Working Group on Influenza. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 2009 Aug 13;361(7):680-9.
6. Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, Herfst S, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, van de Vijver D, Boucher CA, Koopmans M, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD, Fouchier RA. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 2009 Jul 24;325 (5939):481-3.
7. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, Gustin KM, Pearce MB, Viswanathan K, Shriver ZH, Raman R, Cox NJ, Sasisekharan R, Katz JM, Tumpey TM. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 2009 Jul 24;325 (5939):484-7.
8. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009 Aug 20;460(7258):1021-5.
9. Hussell T, Cavanagh MM. The innate immune rheostat: influence on lung inflammatory disease and secondary bacterial pneumonia. *Biochem Soc Trans* 2009 Aug;37(Pt 4):811-3.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Oct 2;58(38):1071-4.

วัคซีน Pandemic

ศ. ดร. นพ. ประเสริฐ เอื้อวรากุล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

ชนิดของวัคซีนและการสร้างไวรัสสายพันธุ์วัคซีน

วัคซีนไขหวัดใหญ่ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน มีอยู่สองชนิดหลัก ได้แก่ วัคซีนเชื้อตายที่ส่วนไขมัน envelope ถูกกำจัดออกไปที่เรียกว่า split vaccine หรือมีกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมที่เรียกว่า subunit vaccine และชนิดที่สองคือ วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ซึ่งเป็นไวรัสชนิดที่เป็น cold-adapted และ temperature sensitive ซึ่งวัคซีนทั้งสองชนิดนี้ได้จากเพาะเลี้ยงไวรัสสายพันธุ์วัคซีนที่ได้จากการสร้างไวรัสลูกผสม (reassortant) ระหว่าง ไวรัสสายพันธุ์ต้นแบบวัคซีน (master donor) กับไวรัสสายพันธุ์ที่แพร่ระบาด โดยวิธีการสร้าง reassortant นี้ สามารถทำได้สองวิธีได้แก่ การเพาะเลี้ยงไวรัสสองชนิดร่วมกันและคัดเลือก reassortant ด้วยการใช้อัตราแอนติบอดีที่สามารถ neutralize ไวรัส master donor ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า classical reassortment method และวิธีที่สองโดยการใช้นิวคลีโอไทด์ของไวรัสใส่ลงในเซลล์ด้วยวิธีที่เรียกว่า reverse genetics method โดยใช้ยีนที่มาจากไวรัสทั้งสองชนิด โดยจะใช้ยีน HA และ NA มาจากไวรัสที่กำลังแพร่ระบาด และยีนที่เหลือมาจาก master donor ซึ่งวิธี reverse genetics นี้โดยทั่วไปสามารถทำได้รวดเร็ว เพราะไม่จำเป็นต้องคัดเลือกไวรัสอีก

เมื่อเกิดการระบาดของไขหวัดใหญ่ 2009 ก็ได้มีการพยายามสร้างไวรัสสายพันธุ์วัคซีนอย่างเร่งรีบ แต่พบว่าวิธี reverse genetics กลับไม่สามารถสร้างไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ดี และเมื่อได้ไวรัสจากวิธี classical reassortment เมื่อวิเคราะห์ดูพบว่าแทนที่จะมียีน 2 ยีน (HA และ NA) มาจากไวรัส 2009 และ 6 ยีนจาก master donor กลับพบว่ามียีน PB1 ของไวรัส 2009 มาด้วย ซึ่งน่าจะแสดงว่ามีความไม่เหมาะสมกันระหว่างยีนของ master donor และยีนของไวรัส 2009

การทดสอบทางคลินิก

แม้ว่าวัคซีนของไวรัส pandemic จะใช้เทคโนโลยีเช่นเดียวกับวัคซีนใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล แต่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอาจแตกต่างกันของวัคซีนใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล ทั้งนี้เนื่องจากไวรัส pandemic เป็นไวรัสใหม่ที่ระบบภูมิคุ้มกันของคนไม่เคยรู้จักมาก่อน และเช่นเดียวกับวัคซีนเชื้อตายทั่วไปซึ่งจำเป็นต้องใช้วัคซีนมากกว่า 1 เข็ม ซึ่งในกรณีของวัคซีนใช้หวัดนก H5N1 พบว่าจำเป็นต้องใช้ปริมาณไวรัสมากกว่าวัคซีนใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล และต้องใช้วัคซีนอย่างน้อย 2 เข็ม สำหรับกรณีของใช้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 นั้นแม้จะเป็นไวรัสใหม่ แต่ก็ยังเป็นไวรัส H1N1 เหมือนใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล จึงมีความหวังอยู่ว่าจะจะมีลักษณะเหมือนใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลคือ ใช้เพียงเข็มเดียว ซึ่งจะช่วยให้อัตราการฉีดวัคซีนที่มีปริมาณจำกัดสามารถให้ได้ครอบคลุมประชากรได้มากขึ้น และก็ได้มีรายงานการทดสอบทางคลินิกแล้วว่าวัคซีนใช้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 ชนิดเชื้อตายสามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้ดีโดยใช้วัคซีนเพียงเข็มเดียว โดยให้ปริมาณไวรัสเท่ากับที่ให้กับวัคซีนใช้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (1,2)

การใช้วัคซีน: วัตถุประสงค์ และการจัดลำดับความสำคัญ

ในสถานการณ์การระบาดที่อาจจะรุนแรงในฤดูระบาดหน้าที่กำลังจะมาถึง ความต้องการวัคซีนน่าจะมีความเกินกว่าจำนวนวัคซีนที่มี สำหรับประเทศไทยถ้าจะมีวัคซีนชนิดเชื้อมีชีวิตอ่อนฤทธิ์ประมาณ 2 ล้านเข็ม จึงจำเป็นที่จะต้องจัดลำดับความสำคัญว่าคนกลุ่มใดที่จะได้รับวัคซีนก่อน โดยการจัดลำดับความสำคัญนี้หลักการอยู่ที่วัตถุประสงค์ของการใช้วัคซีน ซึ่งอาจมองได้เป็นสองลักษณะคือ

1. เพื่อลดอัตราการป่วยรุนแรงที่ต้องอยู่โรงพยาบาลและอัตราการตาย ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง
2. เพื่อลดอัตราการแพร่ระบาดของเชื้อ ซึ่งควรจะต้องตั้งเป้าที่ กลุ่มที่เป็นตัวการหลักในการแพร่เชื้อ ซึ่งได้แก่ เด็กนักเรียน

นอกจากนี้วัคซีนยังถูกใช้ในการป้องกันกลุ่มอาชีพที่มีความสำคัญ และจำเป็นต้องทำหน้าที่ในขณะที่มีการแพร่ระบาดรุนแรง เช่น บุคลากรทางการแพทย์

ในเบื้องต้นคณะกรรมการทำงานของกระทรวงสาธารณสุขได้วางแผนการใช้วัคซีน โดยมีเป้าหมายหลักเพื่อลดอัตราการตาย และได้จัดลำดับความสำคัญให้กลุ่มที่ควรได้รับวัคซีนก่อนตามลำดับ ดังนี้

1. บุคลากรทางสาธารณสุขที่ต้องดูแลผู้ป่วยที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่
2. หญิงตั้งครรภ์ซึ่งมีอายุครรภ์มากกว่า 3 เดือน
3. คนที่มีน้ำหนักตัวมากกว่า 100 กิโลกรัม หรือ BMI (body mass index) ตั้งแต่ 35 ขึ้นไป
4. ผู้พิการทางสมองและปัญญา
5. บุคคลอายุ 6 เดือน – 64 ปี ที่มีโรคประจำตัว ได้แก่ โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง, หอบหืด, โรคหัวใจ, หลอดเลือดสมอง, ไตวาย, มะเร็งระหว่างการรักษาเคมีบำบัด, ภาวะอ้วนที่มีอาการรุนแรง, ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง, เบาหวานที่มีโรคแทรกซ้อน, เบาหวานที่ไม่มีโรคแทรกซ้อน

บรรณานุกรม

1. Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, Wichems CH, Gittleson C, Bennet J, Dawson G, Hu W, Leggio C, Washington D, Bassler RL. Response after One Dose of a Monovalent Influenza A (H1N1) 2009 Vaccine -- Preliminary Report. N Engl J Med 2009 Sep 10.
2. Clark TW, Pareek M, Hoschler K, Dillon H, Nicholson KG, Groth N, Stephenson I. Trial of Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent MF59-Adjuvanted Vaccine -- Preliminary Report. N Engl J Med 2009 Sep 10.

การศึกษาไวรัสไข้หวัดใหญ่ทางห้องปฏิบัติการ

ศาสตราจารย์ ดร. พิไลพันธ์ พุทธิวัฒนะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

การระบาดของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (pandemic H1N1 2009 หรือ swine origin influenza virus) เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกที่ประเทศเม็กซิโกในช่วงเวลาประมาณเดือนกุมภาพันธ์ แต่ได้รายงานผู้ป่วยเป็นครั้งแรกในเดือนมีนาคม จากนั้นโรคได้แพร่ไปสู่สหรัฐอเมริกา และลามไปยังหลายประเทศทั่วโลก ประเทศไทยตรวจพบผู้ป่วยสองรายแรกเมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2552 โดยติดเชื้อมาจากประเทศเม็กซิโก และเมื่อสถานการณ์การระบาดรุนแรงขึ้น องค์การอนามัยโลกจึงได้ประกาศสถานการณ์การระบาดทั่วโลก (pandemic phase 6) เมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2552

เมื่อยังมีจำนวนผู้ป่วยในแต่ละประเทศไม่มากนัก แต่ละประเทศได้วางแผนทางและมาตรการป้องกันการแพร่กระจายของโรค และส่วนหนึ่งของมาตรการนั้นคือการวินิจฉัยให้ได้ว่าผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่หรือไม่ ทั้งนี้เพื่อการแยกผู้ป่วยออกจากชุมชน ในช่วงเวลานั้นไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่จัดเป็นเชื้ออันตราย การเพาะเลี้ยงแยกเชื้อจะทำได้ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ 3 เท่านั้น จนกระทั่งมีผู้ติดเชื้อมากมายไม่สามารถกักกันโรคไว้ได้อีกต่อไป จึงลดระดับของห้องปฏิบัติการลงมาเป็นห้องชีววิทยาระดับ 2+ คือแม้จะเป็นห้องระดับ 2 แต่บุคลากรก็ยังคงควรที่จะแต่งกายและใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในห้องระดับ 3

ในส่วนของการวินิจฉัยผู้ป่วยนั้น แม้ในระยะแรกจะมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการในผู้ป่วยทุกราย แต่เมื่อจำนวนผู้ป่วยมากขึ้น การตรวจทางห้องปฏิบัติการในผู้ป่วยทุกรายเป็นไปไม่ได้ทั้งทางด้านค่าใช้จ่ายและแรงงาน จึงมีการวางนโยบายว่าไม่จำเป็นต้องตรวจทุกรายแต่จะตรวจในผู้ป่วยที่มีกลุ่มเสี่ยง เช่น เป็นหญิงตั้งครรภ์ หรือมี underlying diseases อื่นๆ และตรวจเมื่อเริ่มมีอาการระบาดเกิดขึ้นเป็นครั้งแรกในพื้นที่นั้น

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ใช้วิธีการและชนิดของตัวอย่างตรวจเช่นเดียวกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั่วไป เพียงแต่ต้องใช้วิธีทางโมเลกุลเข้ามาช่วยในการวินิจฉัย subtype เท่านั้น

สิ่งส่งตรวจ

ตัวอย่างตรวจสำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ เป็นชนิดเดียวกันกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ หรือไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจทั่วไป ได้แก่ nasopharyngeal aspirate (NPA) หรือ wash, nasopharyngeal swab, nasal swab (จากส่วนลึกของโพรงจมูก), throat swab, และ endotracheal หรือ bronchial aspirate แม้ว่าในขณะนี้จะยังไม่มีรายงานสรุปจากองค์การอนามัยโลกว่าตัวอย่างตรวจชนิดใดเหมาะสมที่สุด ห้องปฏิบัติ การศูนย์ความร่วมมือการวิจัยไข้หวัดใหญ่ของโรงพยาบาลศิริราช (Siriraj Influenza Cooperative Research Center; Siriraj ICRC) ได้พบว่า NPA เป็นตัวอย่างตรวจที่พบเชื้อได้มากที่สุด รองลงมาคือ nasopharyngeal swab และ throat swab ตามลำดับ แต่ยังไม่มีความชัดเจนสำหรับสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ควรเก็บตัวอย่างตรวจภายใน 5 วัน ภายหลังจากปรากฏอาการ มิฉะนั้นจะมีโอกาสพบเชื้อได้ยาก การทดสอบทางห้องปฏิบัติการนอกจากเพื่อการวินิจฉัยโรคแล้วยังใช้ประโยชน์เพื่อการค้นหาข้อมูลทางระบาดวิทยา และเพื่อการวางแผนงานในการใช้ยาต้านไวรัสด้วย

โรคไข้หวัดใหญ่ subtype และสายพันธุ์ต่างๆ สามารถให้การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการได้โดยใช้วิธีการเดียวกัน การวินิจฉัยขั้นแรกคือ เพื่อบอกว่าเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่ และเป็น type A หรือ type B ซึ่งไม่ว่าจะเป็น type หรือ subtype ใดก็จะให้การรักษเหมือนกัน ถ้าทำ subtyping ต่อไปว่าเป็น H และ N ชนิดใด ก็เพื่อประโยชน์หรือข้อมูลทางระบาดวิทยา การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการทำได้หลายวิธี และจะใช้หลายวิธีร่วมกัน ถ้าการทดสอบให้ผลบวกตรงกัน ผลนั้นก็จะมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

1. **การตรวจหาแอนติเจน** โดยหลักการแล้วการตรวจหาแอนติเจนจัดเป็น rapid diagnosis ให้ผลการทดสอบได้ในเวลา ตั้งแต่ 15 นาที จนถึง 2-3 ชั่วโมง

1.1 การตรวจหาแอนติเจนโดยใช้วิธี *immunoblot* หรือ *immunochromatography commercial kits* ส่วนใหญ่แล้วจะใช้หลักการนี้ มีผลิตภัณฑ์ของชุดน้ำยานับสิบชนิดจำหน่าย และใช้แพร่หลายในประเทศตะวันตก การทดสอบจะง่าย ใช้เวลา 10-15 นาที สามารถทำได้ในคลินิกเล็กๆ แต่ความไวไม่สูงนักประมาณ 40-60% แต่ความจำเพาะค่อนข้างดี บางบริษัทอาจสูงถึง 90%

1.2 การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี *immunofluorescence* จากตัวอย่างตรวจ เช่น สิ่งดูตจากนาโสฟาริงซ์ (nasopharyngeal aspirate), endotracheal aspirate และ bronchoalveolar lavage ซึ่งเก็บใน transport media ในตัวอย่างตรวจดังกล่าวจะมีเซลล์ติดเชื้อหลุดร่วงปนออกมา ถ้ามีมูกจะต้องปั่นล้างตัวอย่างตรวจหลายครั้งให้หมดมูกเสียก่อน นำตะกอนเซลล์ไปป้ายบนกระดาษสไลด์ แล้วนำไปย้อมด้วยวิธี *immunofluorescence* กับแอนติบอดีจำเพาะ เมื่อนาสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในเซลล์ที่ติดเชื้อ ใช้หลอดใหญ่จะเห็นแอนติเจนของไวรัสเรืองแสงอยู่ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม วิธีนี้จัดเป็นวิธีการวินิจฉัยโดยรวดเร็ว (rapid diagnosis) เช่นกัน แม้จะใช้เวลานานประมาณ 3 ชั่วโมง แต่ก็มีควมไวสูงกว่าวิธีแรก

2. การวินิจฉัยด้วยวิธีระดับโมเลกุล วิธีที่นิยมใช้กันคือ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และวิธี real time PCR ซึ่งสามารถให้การวินิจฉัยเชื้อไวรัสใช้หลอดใหญ่ได้ทั้งในระดับ type และ subtype

โดยทั่วไปแล้วการวินิจฉัยจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ซึ่งมักทำไปพร้อมๆ กัน ได้แก่ การใช้ universal primers ซึ่งจำเพาะที่จะบอกว่าเป็น influenza virus type A หรือ type B และใช้ subtype specific primers ซึ่งมีความจำเพาะที่จะระบุ subtype โดย universal primers จะถูกออกแบบจาก gene M หรือ NP ส่วน subtype specific primers จะถูกออกแบบจาก H และ N genes

เนื่องจากไวรัสใช้หลอดใหญ่สายพันธุ์ใหม่มี subtype เป็น H1N1 เช่นเดียวกับ seasonal virus แม้ H gene ของไวรัสใหม่จะได้มาจากไวรัสของสุกร แต่ก็มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ A/New Caledonia/20/1999(H1N1) ถึง 77% และ A/Brisbane/59/2007(H1N1) 76% ซึ่งไวรัสทั้งสองเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ใน

seasonal vaccine

ในปี พ.ศ. 2549-2550 US-CDC ได้พัฒนาวิธี real time RT-PCR สำหรับวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ H1, H3 ไข้หวัดนก H5 และ influenza B virus ขึ้น โดยใช้ *M* gene เพื่อระบุ type และ subtyping แต่ H โดยไม่มีการทำ N subtyping และ protocol นี้ได้จดทะเบียนเป็น FDA approved protocol ในเวลาต่อมา protocol นี้ไม่ได้เผยแพร่เป็นวงกว้าง สถาบันของห้องปฏิบัติการอาจเซ็น Material transfer agreement เพื่อขอใช้ แต่สำหรับ protocol สำหรับวินิจฉัยไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่นั้นเผยแพร่ให้ใช้ได้ทั่วไป โดยประกอบด้วย primers และ probe sets ที่จำเพาะกับ *M*, *NP* และ *H* genes ของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ แต่ก็ยังไม่มี N subtyping เช่นเคย นอกจากนี้ยังให้แนวทางการวินิจฉัยไว้ในระยะเริ่มการระบาดว่า ถ้าวินิจฉัยได้แต่เพียงเป็น influenza virus type A แต่ไม่สามารถระบุ subtype ได้ จึงทำการทดสอบหาต่อไปว่าเป็นไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่หรือไม่ เงื่อนไขนี้หมายถึง เมื่อใช้ FDA approved protocol เท่านั้น ไม่รวมถึง protocols อื่นๆ ซึ่งอาจมี primer และ probe set ที่ common จับได้ทั้ง seasonal influenza H1N1 และ pandemic H1N1 viruses

ผู้ป่วยที่มีอาการของไข้หวัดใหญ่นั้น ควรทำการทดสอบ respiratory viruses และแบคทีเรียที่อาจเป็นสาเหตุของโรคระบบทางเดินหายใจควบคู่ไปด้วย

3. การแยกเชื้อและการพิสูจน์เชื้อ การแยกเชื้อไวรัส นิยมใช้เซลล์ไตสุนัข MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) แม้เซลล์ติดเชื้อมักไม่แสดง cytopathic effect ที่ชัดเจน แต่จะสร้างสาร hemagglutinin แทรกอยู่ที่ผิวเซลล์เพื่อไวรัสจะ bud เอา envelope ตรงตำแหน่งที่มีสารนี้ และหลุดเป็นอิสระออกนอกเซลล์ ได้อาศัยคุณสมบัติของ hemagglutinin บนผิวเซลล์นี้เป็นตัวจับกับว่าเซลล์ มีการติดเชื้อไวรัส โดยภายหลังจากที่หยอดตัวอย่างตรวจลงเซลล์ได้ 5-7 วัน ให้เติมเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาหรือหนูบ้านลงในหลอดเซลล์ แล้ว incubate ไวที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เซลล์ติดเชื้อจะดูดซับ (absorb) เอาเม็ดเลือดแดงเกาะไว้บนผิวเซลล์ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า hemadsorption test ส่วนไวรัสที่ลอยอยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ในสภาพอิสระ จะทำให้เม็ดเลือดแดงเกิด hemagglutination เห็นเป็นกลุ่ม (clump) ของเม็ดเลือดแดงลอยอยู่ จะต้องนำเซลล์ หรือน้ำเลี้ยงเซลล์ไป

ทำการพิสูจน์เชื้อต่อไป ถ้าใช้วิธี immunofluorescence มักจะบอกได้เพียงว่าเป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ type ใดเท่านั้น และต้องใช้วิธีระดับโมเลกุล เพื่อทำ subtyping ของ H และ N ต่อไป

นอกจากนี้ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ยังเพาะเลี้ยงในไข่ฟักได้ แต่เมื่อมีการระบาดของโรคไข้หวัดนกจะหาไข่ฟักได้ยาก และการ decontamination หลังเสร็จการทดลองไม่ค่อยสะดวกนัก ไข่ฟักที่ฉีดตัวอย่างตรวจแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 33-35 องศาเซลเซียส นาน 3-4 วัน จากนั้นเก็บเอาน้ำในถุงห่อตัวอ่อน (amniotic fluid) หรือถุงห่อรก (allantoic fluid) ไปทดสอบด้วยปฏิกิริยา hemagglutination กับเม็ดเลือดแดงของห่านหรือคนหมู่มเลือดโอ ถ้าได้ผลบวก แสดงว่าในตัวอย่างตรวจมีเชื้อไวรัสซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hemagglutination virus จากนั้นจะต้องนำไปพิสูจน์เชื้อต่อไป

4. การตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะ นิยมตรวจหาแอนติบอดีโตเตอร์ในซีรัมคู่ ถ้า convalescent serum มีแอนติบอดีโตเตอร์สูงกว่าซีรัมแรกอย่างน้อยสี่เท่า แสดงว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ แต่ในทางปฏิบัติแล้วมักไม่รอการวินิจฉัยจากซีรัมคู่ เพราะช้าเกินไป มักวินิจฉัยโดยการตรวจหายีนใหม่เพราะได้ผลเร็ว ทันเวลาต่อการให้ยารักษา และการควบคุมป้องกันโรค

วิธีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ใช้หรือกล่าวถึงบ่อยได้แก่วิธี hemagglutination inhibition (HI) test, วิธี microneutralization test และ วิธี ELISA

วิธี ELISA โดยการตรวจหา ELISA IgM แม้จะมีน้ำยาจำหน่าย แต่ก็ยังมีใช้น้อย แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบ ELISA เป็น common antigen ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ influenza type A subtypes ต่างๆ ถ้าตรวจพบ ELISA IgM จะสามารถให้การวินิจฉัยได้ว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ แต่ไม่สามารถระบุ subtype ได้

วิธี HI assay วิธีนี้เป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ hemagglutinin (HA) antigen ของเชื้อไวรัส แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบอาจเป็นได้ทั้งในรูปเชื้อตาย หรือเป็นเชื้อมีชีวิตก็ได้ วิธี HI นอกจากใช้เพื่อตรวจหา

การเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีในซีรัมคู่เพื่อการวินิจฉัยโรคแล้ว ก็ยังสามารถใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนได้ด้วย ในการตอบสนองต่อการฉีดหรือพ่น seasonal influenza vaccine นั้น ประมาณร้อยละ 50 ของผู้ที่มีระดับ HI antibody ≥ 40 จะมีภูมิคุ้มกันโรคทั้งนี้วิธี HI test ไม่ใช่วิธีสำหรับตรวจหา protective antibody โดยตรง แต่เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถทำได้ไม่ยากนัก นอกจากนี้วิธี HI ยังสามารถบอก subtype ที่เป็นสาเหตุของโรคได้ด้วย

หลักของการทดสอบ HI test อาศัยความสามารถของ HA ของไวรัส ใช้หัวัดใหญ่ในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (hemagglutination) ดังนั้น ถ้านำซีรัมที่จะทำการทดสอบมาผสมกับ HA antigen ก่อน ถ้านำซีรัมมีแอนติบอดีต่อ HA antigen ก็จะไปจับกับแอนติเจนนั้นไว้ ในขั้นตอนต่อมาจึงเติมเม็ดเลือดแดงลงไป ในหลอดหรือหลุมทดลอง ถ้าแอนติบอดีจำเพาะจับกับแอนติเจนหมดไปแล้ว ก็จะไม่เหลือ HA antigen อิสระที่จะไปจับกับเม็ดเลือดแดงอีก ปฏิกริยา hemagglutination จึงไม่เกิดขึ้น เนื่องจากแอนติบอดีที่พบนี้ทำหน้าที่ในการยับยั้งปฏิกริยา hemagglutination จึงเรียกแอนติบอดีนี้ว่า hemagglutination inhibiting antibody

การเลือกชนิดของเม็ดเลือดแดงจากสัตว์ชนิดใด เพื่อใช้ในการทดสอบก็มีความสำคัญต่อความไวของวิธี HA หรือ HI assay เช่นกัน ในต่างประเทศจะใช้เม็ดเลือดแดงของไก่วงในการทดสอบหา HI antibody ในผู้ติดเชื้อใช้หัวัดใหญ่ รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์ใหม่ แต่เนื่องจากไก่วงหาได้ยากในประเทศไทย Siriraj ICRC ได้ทำการทดสอบปฏิกริยา hemagglutination ของเชื้อใช้หัวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่กับ เม็ดเลือดแดงของคน blood group O และสัตว์ 4 species คือ หนูตะเภา ห่าน ไก่ และม้า พบว่าไวรัสใช้หัวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ทำปฏิกริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภา และห่านได้ดีที่สุด และดีเท่ากัน และจับกับเม็ดเลือดแดงของคนได้ดีรองลงมา แต่ไม่สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไก่และม้าได้ สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี HI assay นั้น เม็ดเลือดแดงห่านและหนูตะเภาให้แอนติบอดีไตเตอร์ได้เท่ากันหรือห่างกันไม่เกิน 2 folded dilution อย่างไรก็ตาม pattern ของปฏิกริยา HA หรือ HI assay ที่ใช้เม็ดเลือดแดงห่านจะชัดเจนและอ่านง่ายกว่าเม็ดเลือดแดงหนูตะเภา อาจเป็นเพราะเม็ดเลือดแดงห่านมีนิวเคลียส ส่วน

เม็ดเลือดแดงหนูตะเภาไม่มีนิวเคลียส การตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงท่านจึงมี pattern ที่ชัดเจนกว่า

เนื่องจาก HI antibody titer 40 เป็นระดับที่ใช้ในการประเมินวัคซีนที่หวังผลภูมิคุ้มกัน 50% ศูนย์ควบคุมโรคสหรัฐฯ (Center for Disease Control, CDC) จึงได้ทำการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่าง HI antibody titer 40 กับระดับของ NT antibody ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่และได้พบว่า ในเด็กที่มี HI antibody titer 40 จะเท่ากับมีระดับ NT antibody titer 40 เช่นกัน แต่ในผู้ใหญ่ HI antibody titer 40 จะเท่ากับระดับ NT antibody titer 160 การศึกษาของ Siriraj ICRC ได้พบว่า ในผู้ใหญ่มากกว่าร้อยละ 90 ที่มี HI antibody titer 40 จะมี NT titer อยู่ในระดับ 160-320

Microneutralization (micro NT) assay วิธีนี้ใช้ในการตรวจหา neutralizing antibody ซึ่งหมายถึง เป็นแอนติบอดีชนิดที่สามารถกลบล้าง (neutralize) ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ของเชื้อไวรัสได้ ดังนั้น NT antibody จึงจัดเป็น protective antibody ห้องปฏิบัติการที่ต้องการทำการทดสอบ micro NT assay ต้องมีความสามารถในการเพาะเลี้ยงเซลล์ MDCK (Madin-Darby canine kidney) และในการทดสอบต้องใช้อุณหภูมิที่ยังมีชีวิตเป็น test antigen หลักการทดสอบคือ เมื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ก่อการติดเชื้อใน MDCK cell culture แล้วจะทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเรียกว่ามี cytopathic effect (CPE) และมีการสร้าง viral products เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ ในการทดสอบจะผสมไวรัสกับซีรัมก่อน แอนติบอดีจะจับกับเชื้อของไวรัส ถ้าซีรัมมีแอนติบอดีที่ทำลาย infectivity ของเชื้อไวรัสได้ เมื่อนำ virus-antibody complex หยดลงบน MDCK culture เซลล์ก็จะไม่ติดเชื้อและไม่มี viral proteins เกิดขึ้น

ในการตรวจหาแอนติบอดีเพื่อการวินิจฉัยโรค seasonal influenza โดยทั่วไป องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้วิธี HI assay แต่สำหรับไวรัสไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่แล้ว แนะนำให้ใช้วิธี micro NT assay ในกรณีทั่วไป NT antibody จะเกิดขึ้นช้ากว่า HI antibody ดังนั้น ระยะห่างระหว่าง acute และ convalescent blood จึงมีความสำคัญ การเพิ่มขึ้นของ HI antibody จะพบใน convalescent blood ที่เจาะห่างจาก acute blood ประมาณ 1 สัปดาห์ แต่ถ้า

เป็น NT antibody convalescent blood ควรเจาะภายหลังจากเริ่มอาการของโรค ประมาณ 3 สัปดาห์ และไม่ควรเกิน 6 สัปดาห์

5. การตรวจหา viral shedding

ไวรัสที่ถูกขับออกมาใน respiratory secretion ของผู้ป่วยใช้หวัดใหญ่จะเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อออกไปในชุมชน ดังนั้นการที่ทราบว่าเชื้อไวรัสจะถูกขับออกจากร่างกายของผู้ป่วยได้นานเพียงใด ไม่ว่าจะได้รับยา หรือไม่ได้รับยาต้านไวรัส และปริมาณเชื้อไวรัสที่ถูกขับออกมานั้นมีมากน้อยเพียงใด ข้อมูลเหล่านี้จะมีความสำคัญในแง่ของการประเมินประสิทธิภาพยาต้านไวรัส ขนาดยา ตลอดจนการวางแผนทางเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ

การตรวจหา viral shedding มีทั้งตรวจเชิงคุณภาพ คือตรวจว่าพบหรือไม่พบยีนโนมของไวรัส และตรวจเชิงปริมาณ คือ พบจำนวนมากเท่าใด ซึ่งจะมีหน่วยเป็น copy number โดย 1 copy คือ 1 ยีนโนมของไวรัส ซึ่งการตรวจเชิงปริมาณนี้ยังไม่มี commercial kit ออกจำหน่าย และยังไม่มีวิธีมาตรฐานเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิง

เนื่องจากการตรวจหายีนโนมนั้น ในความเป็นจริงแล้ว ไม่ได้ตรวจหาทั้งยีนโนม แต่หาเพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น มีรายงานการตรวจหาทั้ง M gene และ H gene แต่พิจารณาดูแล้ว การตรวจหา M gene น่าจะดีกว่า เพราะเป็นยีนที่ conserve มากกว่า 90% จากข้อมูลของ Siriraj ICRC พบว่าการใช้ CDC protocol จะมีความไวที่จะตรวจพบไวรัส seasonal H1N1, H3N2 และ ใช้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ อยู่ที่ 10-100 copies/reaction เท่ากันทั้ง 3 สายพันธุ์

ในการตรวจเชิงปริมาณจำเป็นต้องมีการสร้าง standard curve โดย plot จากค่า Ct และปริมาณไวรัสหรือยีนโนมของไวรัสที่รู้ค่าแล้ว ซึ่งจะได้ graph เส้นตรง เมื่อทดสอบกับตัวอย่างตรวจก็จะนำค่า Ct ของ test sample ไปเทียบกับ standard curve ก็จะได้ค่า copy number ของตัวอย่างตรวจนั้น ปัญหาคือ known copy numbers ของไวรัสหรือยีนโนมนั้นมีที่มาจากห้องหลากหลาย มีรายงานการใช้ไวรัสที่รู้ค่า TCID50 มาเจือจางเพื่อทำ standard curve บางรายงานใช้ recombinant plasmid ที่มี full gene insert บางรายงานเป็นเพียง

incomplete gene insert แต่ที่ดีที่สุดน่าจะเป็น *in vitro* RNA transcript ของ full gene ซึ่งจะมีสภาพใกล้เคียงกับ viral RNA genome มากที่สุด

6. การทดสอบเชื้อไวรัสคือยา

ยาต้านไวรัสใช้หวัดใหญ่ที่ได้รับการจดทะเบียนในปัจจุบันมีอยู่ 3 ชนิด คือ amantadine ซึ่งเป็น M2 ion channel blocker โดย target ของยาอยู่ที่ M2 ซึ่งเป็น transmembrane protein ของไวรัสใช้หวัดใหญ่ ยาอีกสองชนิดคือ oseltamivir (ชื่อทางการค้าคือ Tamiflu®) และ zanamivir (ชื่อทางการค้าคือ Relenza®) ยาทั้งสองชนิดเป็น neuraminidase inhibitor ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสที่ขั้นตอนของการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสรุ่นลูกออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อ amantadine และ oseltamivir ให้โดยการกิน ส่วน zanamivir ให้โดยวิธีพ่นคอ ขณะนี้มีการทำการทดลองที่จะให้ยาโดยวิธีอื่น เช่น การฉีดเข้าหลอดเลือด และมีการพัฒนายาใหม่หลายตัว แต่ก็ยังไม่มีการนำมาใช้ทั่วไป

Amantadine มีที่ใช้บ่อยลงเรื่อยๆ เชื้อใช้หวัดนก H5N1 clade 1 virus และเชื้อใช้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่คือยา amantadine เนื่องจากการกลายพันธุ์ S31N ใน M2 protein ส่วนเชื้อ H3N2 virus ก็คือยาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานการดื้อ amantadine โดย mutation ที่ตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ L26F, V27A, A30T(S), และ G34E จากการทำ phylogenetic analysis ชี้แนะว่า ไวรัสคือ amantadine น่าจะมีกำเนิดจากเอเชีย

Oseltamivir ได้รับการจดทะเบียนในปี พ.ศ. 2542 หลังจากการใช้ยาเพียง 3 ปี ก็เริ่มมีรายงานการดื้อยา ฎีปุ่่นรายงานเด็กติดเชื้อ H3N2 virus ดื้อ oseltamivir ถึง 18% จากการรักษาด้วยยา การอุบัติของเชื้อ seasonal H1N1 virus ที่ดื้อต่อ oseltamivir เกิดขึ้นในยุโรป ในปี 2550 และขณะนี้ลุกลามไปทั่วโลก ในแอฟริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา และเอเชีย เชื้อที่พบในดินแดนเหล่านี้คือยาเพราะการกลายพันธุ์ H274Y (histidine ที่ตำแหน่ง 274 ใน N gene เปลี่ยนเป็น tyrosine) การเรียกตำแหน่งที่ 274 เป็นการเรียกโดยใช้ N2 numbering system แต่ตาม N1 numbering system จะเรียกตำแหน่งนี้ว่า H275Y ในประเทศไทย เชื้อ seasonal H1N1 virus เกือบ 100% จะดื้อต่อ oseltamivir ในปัจจุบันยังไม่พบการระบาดของเชื้อ H3N2 virus ที่ดื้อ oseltamivir

สำหรับใช้หัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ยานี้รักษาได้ผลดี แม้จะมีรายงานการดื้อยาบ้าง ประปราย พบทั้งในต่างประเทศและประเทศไทย โดยเชื้อที่ดื้อยานี้พบในผู้ป่วย ทั้งที่ได้รับการรักษาด้วยยา และผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา oseltamivir

Zanamivir มีรายงานเชื้อใช้หัดใหญ่ดื้อยา zanamivir เนื่องจากการ กลายพันธุ์ แต่ยังไม่เป็นปัญหาในด้านการนำมาใช้รักษา

วิธีทดสอบเชื้อดื้อยา

การทดสอบเชื้อไวรัสดื้อยา แบ่งออกเป็น 2 หลักการ คือ

1. Genotypic based assay ได้แก่ การใช้วิธีการระดับโมเลกุลในการ ตรวจหาตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีผู้รายงานไว้แล้วว่าจะทำให้เกิดการดื้อยา วิธีการที่เป็นมาตรฐานและยังเป็นที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่เนื่องจากใช้เวลานาน จึงมีการพัฒนาวิธีตรวจโดยใช้ real time RT-PCR หรือใช้วิธี pyrosequencing เพื่อตรวจ mutation ที่สงสัยเพียง 1 ตำแหน่ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้จากวิธี pyrosequencing จะไม่ยาวเท่ากับวิธีมาตรฐาน แต่ข้อดีคือ นอกจากตรวจพบตำแหน่งกลายพันธุ์แล้ว ยังสามารถตรวจพบสัดส่วนของ quasi-species ของประชากรไวรัสได้ด้วย สำหรับข้อเสียของ genotypic based assay ก็คือ ถ้าไวรัสเกิดการดื้อยาเพราะเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใหม่ซึ่งไม่เคยมีผู้ใดรายงานไว้ ก็จะไม่ทราบว่ามีเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น

2. Phenotypic based assay เป็นการทดสอบเชื้อดื้อยาโดยดูจาก phenotype ของเชื้อ สามารถจะแบ่งออกตามหลักการต่อไปอีก

2.1 Infectivity reduction assay เป็นการทดสอบหาว่ายาลดการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือลดอัตราการป่วยตายในสัตว์ทดลอง ถ้าเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงอาจวัดได้โดยการทำ plaque assay นับจำนวน plaque ที่ลดลงเมื่อใช้ยาเทียบกับจำนวน plaque ใน culture ที่ไม่มีการ treat ยา วิธี plaque assay นี้เป็น conventional test ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่ก็ยังไม่มี standard protocol แต่ละรายงานใช้ไวรัสจำนวนแตกต่างกันมาก และเนื่องจาก plaque assay เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และใช้ปริมาณสารค่อนข้างมาก เพราะยาแต่ละ dilution จะต้องทดสอบสามซ้ำใน 6-well plate ดังนั้น Siriraj ICRC จึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบ

ขึ้นใหม่ โดยตรวจดูว่ายาลดการสร้าง viral protein ภายในเซลล์ลงหรือไม่ แล้วจึงตรวจวัด viral protein ที่มีอยู่ใน cell culture ด้วยวิธี ELISA ต่อไป โปรตีนที่ใช้เป็น marker คือ nucleoprotein วิธีนี้ให้ชื่อว่า ELISA based nucleoprotein reduction assay

ข้อดีของวิธี Infectivity reduction assay คือ ทดสอบกับยาได้ทุกชนิดไม่ว่ายานั้นจะออกฤทธิ์ กับ target ยีนใดและทดสอบกับไวรัสได้ทุกชนิดไม่ว่าจะมี mutation ที่ตำแหน่งใดก็ตาม

2.2 Chemical based assay ในกรณีของไวรัสไข้หวัดใหญ่ จะเป็นการทดสอบที่เรียกว่า neuraminidase inhibition assay ทดสอบได้กับยาที่มีฤทธิ์เป็น neuraminidase inhibitor เท่านั้น หลักการคือ เอนไซม์ neuraminidase ของไวรัสหรืออาจเรียกว่า sialidase มีความสามารถในการย่อย sialic acid substrate เช่น fetuin หรือ neuraminic acid ในการทดสอบ จะผสมยากับไวรัส ดังนั้นถ้ายาจับกับไวรัสได้ ยาจะยับยั้งการทำงานของไวรัส ทำให้ neuraminidase ย่อย substrate ไม่ได้ แต่ถ้าไวรัสมีการกลายพันธุ์ตรงตำแหน่งที่ทำให้ยาจับไวรัสไม่ได้ ยา ก็จะไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ neuraminidase ในการย่อย substrate

Substrate ของเอนไซม์ neuraminidase จะถูกติดฉลากไว้ด้วย reporter เช่น chemiluminescent หรือ fluorescein dye สารที่ใช้กันอยู่ในการเฝ้าระวังไวรัส ได้แก่ methyl lumberiferone ที่ tag อยู่กับ neuraminic acid (MUNANA) ตัวสาร MU เป็น fluorescein dye ถ้าไวรัสย่อย MUNANA ได้ MU จะถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระและเปล่งแสง ซึ่งสามารถวัดความเข้มได้ด้วย fluorescence spectrophotometer ยาที่เป็น neuraminidase inhibitor จะทำหน้าที่เป็น analogue ของ substrate ดังนั้น neuraminidase ของไวรัสจึงจับกับยานี้ เมื่อยา ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ปริมาณ MU ที่ถูกปล่อยออกมาจะลดลง ความเข้มของแสงก็จะลดลงด้วย ในการทดสอบ neuraminidase inhibition assay จะต้องทำการหา NA activity ของไวรัสแต่ละตัวก่อนเพื่อทำการปรับให้ไวรัสแต่ละตัวที่จะนำมาทดสอบมี working NA activity ใกล้เคียงกัน ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้เวลาทดสอบสั้นและทดสอบไวรัสได้ครั้งละหลายตัวอย่าง แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ต้อง

ใช้ไวรัสใน titer ที่สูง ประมาณ 30,000-35,000 relative fluorescent unit ในการทดสอบ

บรรณานุกรม

1. Abed Y, Goyette N, Boivin G. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:556-9.
2. Bai GR, Chittaganpitch M, Kanai Y, Li YG, Auwanit W, Ikuta K, et al. Amantadine- and oseltamivir-resistant variants of influenza A viruses in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.071
3. Boivin G, Coulombe Z, Wat C. Quantification of the influenza virus load by real-time polymerase chain reaction in nasopharyngeal swabs of patients treated with oseltamivir. *J Infect Dis* 2003;188:578-80.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Recommendations for Clinical Use of Influenza Diagnostic Tests During the 2009-10 Influenza Season [Online]. 2009 [cited 2009 Nov 9];[6 screens]. Available from: URL:http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/diagnostic_tests.htm
5. Chen H, Wang Y, Liu W, Zhang J, Dong B, Fan X, et al. Serologic survey of pandemic (H1N1) 2009 virus, Guangxi Province, China. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1849-50.
6. Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol* 2008;41:13-9.
7. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med* 2009. (10.1056/NEJMoa0906453)
8. Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol* 2009;83:10366-73.

9. Ilyushina NA, Govorkova EA, Webster RG. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology* 2005;10:102-6.
10. Jiang T, Kang X, Deng Y, Zhao H, Li X, Yu X, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for a novel influenza A (H1N1) virus. *J Virol Methods* 2009; doi:10.1016/j.jviromet.2009.09.021
11. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004;3:759-65.
12. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill [serial online]* 2008 Jan [cited 2009 Nov 09];13(5):[2 screens]. Available from: URL: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8026>
13. Lee N, Chan PK, Hui DS, Rainer TH, Wong E, Choi KW, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis* 2009;200:492-500.
14. Liang M, Lye DC, Chen MI, Chow A, Krishnan P, Seow E, et al. New influenza A (H1N1) 2009 in Singapore: the first ten adult imported cases. *Singapore Med J* 2009;50:581-3.
15. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009;18:931-39.
16. Ng EK, Cheng PK, Ng AY, Hoang TL, Lim WW. Influenza A H5N1 detection. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1303-5.
17. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3284-92.
18. Xing Z, Cardona CJ. Preexisting immunity to pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1847-9.

Re-emergence of Chikungunya Fever in Thailand with African Strain Virus, 2008-2009

Rome Buathong¹, Tharawit Ouppapong¹, Ladda Likityingwara¹,
Sopon Iamsirithaworn¹, Surapee Anantapreecha², Richard G. Jarman³,
Ananda Nisaluk³, Jason Richardson³, Pasakorn Akarasewi¹

¹ *Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand*

² *Arbovirus Section, National Institute of Health(NIH), Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand*

³ *United States Army Medical Component-Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (USAMC-AFRIMS), Bangkok, Thailand*

Chikungunya virus was first reported in Thailand at Bangkok Children Hospital in 1958. Between 1958 and 1996, sporadic cases and few outbreaks have been investigated and only the Asian strain of Chikungunya was detected from 1962 to 1996 by the United States Army Medical Component-Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (USAMC-AFRIMS), Bangkok. In October 2008, the suspected cases of Chikungunya fever in a village was notified by Narathiwat Provincial Health Offices and finally confirmed Chikungunya fever by RT-PCR and seroconversion of Hemagglutination Inhibition Test (HI) at both National Institute of Health, Ministry of Health (NIH/MOPH) and AFRIMS Bangkok. In southern Thailand, the outbreaks spread rapidly from province to province by human movement and abundant *Ae. albopictus* mosquitoes. The National Surveillance has included Chikungunya fever as a latest notifiable disease in its passive surveillance system since November 2008. A total of 44,040 suspected Chikungunya fever cases were reported between October 2008 and October 2009 (2,494 and 41,546 cases in 2008 and 2009, respectively). No death was reported. The majority of cases were from the four southernmost Thai-Malaysian border provinces (99.7% and 60.0% in 2008 and 2009, respectively). In

2009, the disease spread to all upper southern provinces where 38.3% of total cases were reported while only 1.0% was notified from western, north-eastern and eastern provinces. The male to female ratio was 1:1.5. Overall, most cases were in adult age (83.0%) with a median of 34 years (range: 3 months - 96 years). But the median age in 2009 was significantly lower than 2008 (33 and 38 yr, respectively; $p < 0.001$). The proportion of child (age < 15 years) and student cases increased from 12.1% and 10.9% in 2008 to 17.3% and 18.4% in 2009 ($p < 0.001$). Working in agricultural industry especially rubber tree plantation appeared to be a risk factor for infections in 2008 (40.0% of cases) but this trend declined in 2009 (46.1% vs 39.6%; $p < 0.001$). Out-patient cases accounted for 90.6% of all cases. Common manifestation included fever (94.4%), joint pain (83.3%) and rash (66.7%). Totally, 1,218 suspected cases were reported by NIH. Of those 440 cases were laboratory confirmed (36%) by either RT-PCR or seroconversion by HI. The yields of RT-PCR and HI were 49.7% (388/781) and 35.3% (89/252), respectively. A suspected Chikungunya fever case returned to be dengue infection for 3.9% and 1.4% was co-infected with dengue virus. A single IgM of Chikungunya should not be interpreted as acute Chikungunya infection because of its long lasting IgM antibody up to 6 months. Rapid test for Chikungunya fever is not a preferred diagnostic test due to its low sensitivity and specificity. We found that two events of Rubella were mimic Chikungunya fever when rapid test and single IgM testing were used. The possible cross-reaction of Chikungunya virus and Rubella virus (the same family of *Togaviridae*) needs further study. Molecular sequencing of Chikungunya virus isolates was performed by USAMC-AFRIMS and revealed historic Asian strain replacement with East/Central African Strain in the recent outbreaks. This outbreak strain is mutated at peptide position at 226 from Alanine to Valine (226V). The finding was similar to isolated strains in Singapore and Malaysia, the countries currently experience outbreaks. The 226V strain was figured out that the replication time: from feeding to sylvatic in *Aedes* mosquito: was short as two and maximum at sixth day. But the comparison between Asian, 226A East/Central African strains is necessary to evaluate

replication time. Furthermore, the question is needed to answer “is there only single strain (226V) of East/Central East African Virus in current epidemics in Thailand?”. For entomological finding, at the beginning of outbreaks in deep southern province we found that both *Aedes* species (*Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*) were main vectors but when it was spreading to western province, the vector is predominantly *Ae. aegypti*. The possibility of transovarian transmission for Chikungunya virus in *Aedes* mosquitoes is questionable. Other species of *Aedes* and other genus of mosquitoes should be studied if they are potential vectors. For prevention and control measure, we should aim to prevent mosquito bite in daily life activities by any method. One of the promising measures is applying mosquito repellent to the first case of household and maintaining for 7 days periods in addition to spraying adult mosquitoes and source reduction of larva. In Wangchan District, Rayong Province, we found that the first case in household who always used repellent during illness prevented secondary case in household members significantly. For any new outbreak area, early detection with aggressive control and prevention actions are required to contain the epidemic. In conclusion, the re-emerging Chikungunya fever in Thailand has been confirmed after the 13-year absence. Chikungunya fever has a potential to continue its spreading throughout the country. Clinical, serological, and molecular surveillance and monitoring of Thailand’s Chikungunya fever outbreak should be maintained.

การนำเสนอผลงาน

Electron micrographs of H5N1 virus and its replication in MDCK cells

Rojanasang P, Thakergpol K, Choosrichom N, Wiriyarat W, Chaichoune K,
Thonarknguen R, Pooruk P, Webster R, Puthavathana P,
and Louisirotchanakul S.

BACKGROUND: Since 2003, re-emergence of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus has swept across continents and causes poultry die-off including severe pneumonia in humans. Morphology of this influenza virus subtype has never been characterized. In this study, we demonstrated electron micrographs of HPAI H5N1 particles together with low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses. In addition, localization of H5N1 viruses in MDCK infected cells was shown under a transmission electron microscope (TEM).

MATERIALS AND METHODS: The viruses employed in this study included 9 HPAI H5N1 (4 from humans and 5 from avian); 4 LPAI virus subtypes H1N1, H3N2, H5N3 and H7N1; and 2 human isolates of H1N1 and H3N2 subtypes. Human viruses were isolated and propagated in cell culture, whereas avian viruses were isolated and propagated in embryonated eggs. These viruses, except one LPAI virus with uncertain passage history, were sub-cultivation for less than 10 passages. The virus particles were visualized by negative staining with 2% phosphotungstic acid. Meanwhile, thin sections of MDCK cells infected with A/Thailand/1 (KAN-1)/04 (H5N1) were positively double stained with uranyl acetate and lead citrate. The grids were examined under a transmission electron microscope (JEOL 1230, Japan).

RESULTS: Influenza virus particles were pleomorphic. Three forms of morphology of different sizes were demonstrated: spherical (diameter 80-120 nm), rod (length 121-300 nm) and filamentous (length >300 nm). Regarding virus replication in MDCK cells, we demonstrated ultrastructure

of virus inclusions in the cell cytoplasm, including virus particles at entry and the budding out particles at exit.

CONCLUSIONS: Electron micrographs of influenza virus particles demonstrated that spherical form was the predominate population among all virus subtypes studied, regardless of host of origin, virus virulence or passage history. Positive staining of uninfected MDCK cells as observed at low magnification showed surface pilli which might be miss interpreted as the filamentous form of virus particles. Nevertheless, this appearance could be identified by higher resolution and magnification of the modern electron microscope. Herein, we showed lines of spherical particles budding from the cell surface. Our finding was not different from what had been previously reported with human viruses.

Movement of Asian openbill storks (*Anastomus oscitans*) and its correlation with spread of the H5N1 avian influenza in Thailand

Suwanpakdee S, Yongyuttawichai P, Jangjaras J, Wiratsudakul A, Changbanjong T, Farmer A, chewajom K, Jakapirom C, Sedwisai P, Chamsai T, Toawan N, Chatsiriwech J, Suksai P, Chaiyasilp N, Prayoonwong N, Paungpin W, Phonarknguen R, Phrompiram P, Sariya L, Eiamampai K, Wiriyarat W, Chaichoune K, Ratanakorn P, Puthavathana P.

BACKGROUND: It had been reported 40 years ago that Asian openbill storks migrated from Bangladesh to Thailand for breeding. During the first outbreak of HPAI H5N1 virus in Thailand in 2004, storks were suspected to bring in the virus along with their migration from Bangladesh to Thailand. However, there was no report of H5N1 outbreak in Bangladesh at that time. Storks feed on apple snails living in freshwater marshes, rice paddy fields and ditches. They share the same habitats as free ranging ducks. This study aimed to determine migratory route of storks and its role in the spread of AI during their movement in Thailand.

METHODS: Four birds from 2 colonies of approximately 10,000 storks in Nakhon Pathom and Bueng Boraphet, Nakhon Sawan provinces, were tracked since April 2007 with satellite transmitters (Microwave) and monitored by Argos satellite with positioning by Google Earth Programme version 4.3. Surveillance for H5N1 spread by storks was conducted by searching for AI outbreak in domestic poultry and other wild birds living along their flyways in Thailand.

RESULTS: For longer than 2 years of monitoring, all 4 storks have never migrated out of Thailand. Birds in Nakhon Pathom moved out from one area to the other areas, probably related to crop rotation and snail population, but birds in Nakhon Sawan did not move far. During breeding season, birds came back to their old nested areas or nearby to form nests. The areas of home range of their habitats vary from 45.0 to 2476.8 km² per

month (95% utility distribution) as calculated by Fixed Kernel Home Range programme. No AI outbreak was found in animals living along the flyway. Viral isolation assay in 500 storks yielded negative result. H5N1 antibody at titers ≥ 80 was detected in 0.67% (4/397) of storks by microneutralization assay.

CONCLUSION: Asian openbill storks now become resident birds of Thailand. Their flyways did not correlate with H5N1 outbreaks in both domestic poultry and wild birds; and AI infection rate in storks was low. Our study suggested that storks do not play important role on AI spread in Thailand.

Satellite telemetry reveals migratory routes of brown-headed gulls (*Larus brunnicephalus*) captured in Thailand

Wiratsudakul A, Wiriyarat W, Chaichoune K, Suwanpakdee S, Eiamampai K, Farmer A, Changbanjong T, Cheewajorn K, Yongyuthawichai P, Jangjaras J, Sedwisai P, Chamsai T, Taowan N, Sariya L, Puthavathana P, Ratanakorn P.

BACKGROUND: A flock of brown headed-gulls (*Larus brunnicephalus*) is seen along the muddy beach at Bang Pu, Samut Prakarn every year during November to March. However, its long distant migratory route has never been reported. Our group could isolate HPAI H5N1 virus from 4 (2.6 %) of 153 birds of this flock in 2005 and 2008. Thus, this flock might play a role in the spread of HPAI virus along its fly ways. The present study conducted satellite telemetry technique to demonstrate the migratory routes of this bird species, including an attempt to isolate H5N1 virus and detect specific antibody by ELISA and microneutralization (microNT) assay.

METHODS: Gulls negative for influenza A antigen were tagged with solar powered satellite transmitters (Microwave); and their movements were monitored by Argos satellite tracking system. Most locations, used for analysis and mapping with Google Earth Programme version 4.3, had a precision of <1000 m. Tracheal and cloacal swabs as well as serum samples from birds were collected at convenience, while the flock stayed in Thailand.

RESULTS: We started tracking the first gull in March 2008 and the second group of 7 gulls between February and March 2009. Collective data from the two experiments confirmed that gulls migrated out of Thailand in April. Five of them flew to Xinjiang, Qinhai and Tibet, places of their long stay. The first gull moved from Tibet to West Bengal, India in October before coming back to Thailand. Nevertheless, this bird stayed in

Thailand only shortly; then, it flew to Siem Reap, Cambodia in late October and inhabited there until the signals lost in December 2008. Birds could fly at a maximum distance of 330.07 km/day in average. MicroNT assay was performed in 85 birds, and the results were all negative; meanwhile 3.5 % of samples were positive by ELISA for pan-influenza A antibody.

CONCLUSIONS: Brown-headed gulls had migrated across several countries. However, it needs to be further explored that gulls can be infected asymptotically and the infected gulls can migrate that far. Then, role of this species in the spread of H5N1 virus can be concluded.

Seroprevalence to HPAI H5N1 virus in healthy backyard chickens living in repeated outbreak areas of Thailand

Poungpin W., Ponlatep K, Phrompiram P, Suwanpaksee S, Changbanjong T, Jakapirom C, Sedwisai P, Chamsai T, Toawan N, Chatsiriwech J, Suksai P, Chaichoune K, Wiriyarat W, Thititanyanon A, Ungchusak K, Auewarakul P, Ratanakorn P, Puthavathana P.

BACKGROUND: Thailand has been affected by several waves of H5N1 HPAI outbreaks since 2004. AI control with biosecurity is strictly implemented in industrial poultry farms. However, this type of control is costly and difficult to implement in villages where flocks of backyard poultry are raised for family consumption. Even though, there has been no human case since August 2006, AI is occasionally reported in free ranging birds in remote areas. Thai native chickens and free ranging ducks are relatively resistant to HPAI H5N1 virus. Some may be infected without developing clinical signs and death. Viruses shed from these infected poultry may contaminate the environment and become sources of viral spread in nature. Therefore, this study conducted serosurveillance to determine H5N1 virus infection rate in backyard, Thai native chickens resided in AI repeated outbreak areas.

MATERIALS AND METHODS: This study was approved by the Ethical Committee for Animal Health and Welfare, Faculty of Veterinary Science and the Animal Assurance PHS from Office of Laboratory Animal Welfare, USA (OLAW No. A5731-01). The study was carried out during January 2007 to August 2009 in 6 provinces: Nakhonsawan, Lopburi, Sukhothai, Phitsanulok, Kamphaeng Phet and Uthradit. Blood samples were collected from backyard chickens with consent from the owners. ELISA based microneutralization assay in MDCK cell monolayer were conducted in biosafety level-3 containment facilities. The reciprocal antibody titer of 40 was the cut-off level for positive result.

RESULTS: Among 707 healthy backyard chickens, 12 (1.7%) had H5N1 neutralizing antibody. By location, 6 chickens were in Phitsanulok, 5 in Sukhothai and one in Uthairat provinces.

CONCLUSION: The study demonstrated that backyard chickens resided in repeated outbreak areas, could survive H5N1 infection. Asymptomatically infected chickens may play role as silent spreaders and maintain the virus in nature. Outbreak may occur when the virus is spread to population of susceptible animals. Our finding lead to the suggestion that HPAI H5N1 virus might has become an endogenous pathogen of Thailand.

Seroprevalence of HPAI H5N1 virus in domestic dogs and cats living in repeated outbreak areas in Thailand

Wiriyarat W, Pongpin W, Ponlatep K, Phrompiram P, Chaichoune K, Phonarknguen R, Toawan N, Suwanpaksee S, Yongyuttawichai P, Wiratsudakul A, Thititanyanon A, Ungchusak K, Auewarakul P, Ratanakorn P, Puthavathana P.

BACKGROUND: Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus had been documented for its infectivity in several kinds of mammals including tigers and domestic dogs and cats which are the most popular pets of humans. HPAI has been well controlled; and no human cases occurred in human since August 2006. However, small outbreaks occasionally occur in backyard poultry, together with the infection in wild birds and mammal species. Thus, there is a possibility that dogs and cats, especially those living in H5N1 repeated outbreak areas or suspected outbreak areas where abnormal death of poultry were found, have high risk of exposure to H5N1 virus from eating the infected animal carcasses or closed contact with the infected animals. To demonstrate this, we performed serological surveillance in dogs and cats living in 5 provinces where H5N1 HPAI outbreaks or suspected outbreaks were found, by using microneutralization (microNT) assay.

MATERIALS AND METHODS: This study was carried out during January 2007 to August 2009 in dogs and cats living in 5 provinces where H5N1 HPAI outbreaks or suspected outbreaks repeatedly occurred, i.e., Sukhothai, Phichit, Phitsanulok, Uttaradit and Kamphaeng Phet. The study protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Health and Welfare, Faculty of Veterinary Science and Animal Assurance PHS from Office of Laboratory Animal Welfare, USA (OLAW No. A5731-01). Blood sample collection was employed under consent from the animal owners. ELISA based microNT assay in MDCK monolayer was performed

in biosafety level-3 containment facilities. The reciprocal antibody titer 40 was established as the cut-off level for positive result.

RESULTS: Totally, serum samples from 157 dogs and 42 cats were tested. H5N1 NT antibody was detected in 25 (15.9%) dogs and 2 (4.7%) cats. Highest prevalence was found in animals from Phitsanulok province, and followed in order by Phichit and Sukhothai provinces.

CONCLUSION: We demonstrated that dogs and cats living in the H5N1 outbreak areas could be infected asymptotically or developed only mild symptom. However, time at infection is not known. Dogs and cats can serve as a potential source of HPAI spread in addition to avian species.

Tolerability of pigeons (*Columba livia*) to H5N1 highly pathogenic avian influenza A virus (HPAIV) infection

Chaichoune K, Wiriyarat W, Phonarknguen R, Sariya L, Prayoonwong N, Chaisilp N, Taowan N, Chatsiriwech J, Paungpin W, Prompiram P, Puthavathana P, Auewarakul P, Ratanakom P.

BACKGROUND: Pigeons (*Columba livia*) are present almost everywhere in Thailand. Pigeons commonly share their habitats with other birds, especially, backyard chickens and free ranging ducks. During outbreaks of H5N1 HPAIV, pigeons are at risk to get infection from those animals or vice versa. Information on susceptibility of pigeons to H5N1 virus, and their role in the spread of HPAIV are limited. Herein, we reported natural history of H5N1 infection in pigeons in captivity.

METHODS: A/Chicken/Thailand/vsmu-3/2004 (H5N1) was tested in pigeons which had no H5N1 antibody as screened by hemagglutination inhibition (HI) assay. Stock virus was serially 10 fold diluted, and the virus at concentrations of 10 to 10⁶ TCID₅₀ was inoculated intranasally into each group of 4 birds. The inoculated birds were daily recorded for clinical signs. Cloacal and tracheal swab samples were daily collected until the experiment was terminated at 35 days post-infection (d.p.i.). These clinical specimens were investigated for presence of HPAIV by viral isolation and real-time RT-PCR. Additionally, serum samples were tested for anti-H5N1 antibody by HI assay. All experiments involving infectious viruses were performed in BSL3 facilities. This study was approved by the Animal EC of Faculty of Veterinary Science.

RESULTS: Pigeons inoculated with HPAIV at doses of 10 to 10⁴ TCID₅₀ could survive without any clinical signs throughout the experiment. At inoculum dose of 10⁵ TCID₅₀, 2 of 4 inoculated birds showed clinical signs after 17 d.p.i., but all four were alive through the end of the experiment. At inoculum dose of 10⁶ TCID₅₀, all birds died. Even though

some inoculated birds did not showed clinical signs, viruses could be detected in clinical samples collected from those birds inoculated at minimal dose of 10^2 TCID₅₀. Seroconversion was found in groups of birds inoculated with inoculum doses of 10^2 to 10^6 TCID₅₀. All survived birds shed virus at minimal titers.

CONCLUSIONS: Pigeons were susceptible to H5N1 infection. However, they could tolerate the infection as shown by ID₅₀ of 10^2 TCID₅₀ and LD₅₀ of 10^6 TCID₅₀. Therefore, pigeons may be potent H5N1 virus spreaders in nature.

Human influenza virus-specific T cells mediate cross reactive immune response to nucleoprotein (NP) derived from avian influenza H5N1 virus

Noisumdaeng P, Duangchinda T, Mongkolsapaya J, Assanasen S, Louisirirochanakul S, Auewarakul P, Pooruk P, Lerdsamran H, Puthavathana P.

BACKGROUND: Protection against influenza virus by specific antibody is relatively strain specific; meanwhile broader immunity may be conferred by cell mediated immune response. The development of universal broad-spectrum influenza vaccine to confront not only seasonal influenza viruses but also avian H5N1 influenza virus is important. In this context, induction of cross-reactive CD4⁺ T cells and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) that recognize internal conserved epitopes of influenza virus are of interest. This prompted us to identify a set of T cell conserved epitopes that would contribute to broad immune response across influenza virus subtypes. This study measured cross cell-mediated immunity to H5N1 virus in healthy persons using overlapping peptides derived from nucleoprotein (NP) as the test antigen.

METHODS: A total of 30 participants including 18 healthy individuals, 5 vaccinees who received trivalent influenza vaccine within 2 years (2006-2008) and 7 influenza infected subjects were recruited. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from whole blood of all subjects and kept frozen until used. Memory T cells that cross-reacted to 20 mers-H5N1 NP overlapping peptides were measured by the *ex vivo* IFN- γ enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay. A total of 49 peptides were tested. ELISpot positive cases were subjected to flow cytometry for determination of peptide specific T cells as well as immunophenotyping by using intracellular cytokine staining (ICS) techniques. Microneutralization (microNT) assay to A/Thailand/1(KAN-1)/2004 was

performed to determine status of previous H5N1 virus infection.

RESULTS: All 30 subjects had no antibody to H5N1 virus as tested by microNT assay. However, only 13 (43%) subjects exhibited cross-reactive specific T cell responses by ELISpot. These subjects recognized only 4 immunodominant peptides. The average magnitudes of *ex vivo* ELISpot IFN- γ were 63 SFU/10⁶ PBMCs, and the frequency of responsiveness was 1 to 2 peptides/subject. CD4⁺ T cells were mainly responsible for peptide recognition.

CONCLUSIONS: NP was a conserved protein among influenza A subtypes. Some individuals who had never been infected with H5N1 virus could exhibit cross reactivity to H5N1 NP immunodominant. The identified NP epitopes from this study may be useful in the vaccine design and understanding of natural T cell immunity.

Hemagglutination-inhibition and microneutralization assays for antibodies to pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus

Pooruk P., Lerdsamran H, Nateerom K, Bunrueng R, Komolsiri P, Pittayawonganon C, Pongkankham W, Iamsiritaworn S, Chokephaibulkit K, Chotpitayasunondh T, Sangsajja C, Chuchottaworn C, Puthavathana P.

INTRODUCTION: Hemagglutinin-inhibition (HI) assay has been established for decades for human influenza diagnosis and vaccine evaluation. Additionally, on the basis of antigenic drift, HI employing a panel of reference antisera is used for vaccine strain selection by the World Health Organization annually. In contrary, microneutralization (microNT) assay is recommended for detection of antibody to H5N1 and pandemic influenza (H1N1) 2009 viruses. The present study applied those two assays for the detection of specific antibody in patients with pandemic influenza (H1N1) 2009. Sensitivity of each assay in the disease diagnosis will be determined.

MATERIAL AND METHOD: A total of 37 patients (9 pediatric and 28 adult cases) who were diagnosed pandemic influenza (H1N1) 2009 by RT-PCR, were enrolled in this study. Paired blood samples from these patients were assayed for specific antibody by goose erythrocyte HI and microNT tests using A/Thailand 104/09 (H1N1) as the test antigen.

RESULTS: Based on microNT assay, 5 (55.6%) of 9 pediatric cases and 3 (10.7%) of 28 adult cases had a four fold rise in antibody titer. Regarding HI assay, 3 (33.3%) pediatric cases and 5 (17.9%) adult cases, had a four fold rise in antibody titer. This result was explained by presence of high antibody level in acute blood samples.

CONCLUSION: A four folded rise in antibody titer was more common in pediatric than in adult cases infected with pandemic H1N1 influenza. We proposed that previous seasonal H1N1 infection in adult patients might boost an anamnestic response, and then, results in a rapid rise in

antibody level in acute blood sample such that a marked increase in antibody titer in convalescent blood samples cannot be shown. We also demonstrated that serodiagnosis is not much useful in the diagnosis of pandemic H1N1 influenza. Nevertheless, it could be useful in epidemiological study such as in the detection of protective immunity in general people.

Surveillance for sensitivity of influenza A and B viruses to neuraminidase inhibitors

Lerdsamran H, Pooruk P, Korkusol A, Noisumdaeng P, Komolsiri P, Sangsiriwut K, Nateerom K, Chuchottaworn C, Sangsajja C, Chotpitayasunondh T, Chokephaibulkit K, Puthavathana P.

BACKGROUND: Oseltamivir and zanamivir are neuraminidase (NA) inhibitors against both influenza A and B viruses. Monitoring for neuraminidase inhibitor (NI) resistant viruses can be accomplished by phenotypic and genotypic based assays. Our study employed neuraminidase inhibition (NAI) assay together with nucleotide sequence analysis for amino acid substitution in *NA* gene to determine sensitivity of influenza A and B viruses to oseltamivir and zanamivir.

METHODS: A total of 34 influenza viruses: human A/H1N1, pandemic A/H1N1, A/H3N2 and B isolates from severe pneumonia patients hospitalized from 2007 to 2009, were assayed against oseltamivir carboxylate and zanamivir by MUNANA-based NAI assay. In addition, *NA* gene derived from the virus isolates were sequenced and examined for amino acid substitution positions indication drug resistant. A/Mississippi/3/01(H1N1) (wildtype-274H) and A/Fukui/20/04(H3N2) (wildtype-119E) were used as the reference drug sensitive; meanwhile, A/Mississippi/3/01(H1N1) (mutant-274Y) and A/Fukui/45/04(H3N2) (mutant-119V) were used as the resistant strains.

RESULT: Both seasonal and pandemic influenza A/H1N1 together with A/H3N2 isolates were zanamivir sensitive with IC_{50} values at range between 0.25 to 3.89 nM. However, using oseltamivir as the test drug, it was shown that all 4 pandemic A/H1N1 and 15 A/H3N2 isolates were oseltamivir sensitive; whereas, 4 (66.7%) of 6 seasonal A/H1N1 viruses were oseltamivir resistant. The sensitive strains had IC_{50} values at range of 0.29-2.2 nM, while they were 73-875 nM for the resistant strains.

Interestingly, all influenza B isolates showed a decrease in sensitivity to both oseltamivir and zanamivir, as demonstrated by IC_{50} values at range of 11-46 nM for oseltamivir and 5-23 nM for zanamivir. Sequencing data showed no mutation marker in all drug sensitive viruses; however, seasonal H1N1 viruses which were oseltamivir resistant carried the molecular marker H274Y in *NA* gene sequence.

CONCLUSION: Oseltamivir resistant seasonal H1N1 virus is a growing problem worldwide. Nevertheless, influenza B viruses should be closely monitored for emerging of NI resistance as it has been shown to require higher dose for the disease treatment.

Viral load of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in various types of respiratory samples

Ngaosuwankul P, Komolsiri P, Noisumdaeng P, Chokephaibulkit K,
Chotpitayasonondh T, Sangsajja C, Chuchottaworn C, Puthavathana P.

Background: Nasopharyngeal aspirate (NPA), nasal swab (NS), and throat swab (TS) are common specimens used for respiratory virus diagnosis by RT-PCR, antigen detection and viral isolation. However, there is no documented data regarding a type of specimen that yields the best result of viral detection. In this study, real time RT-PCR specific for *M* gene of influenza A virus, was used to determine viral load present in NS, NPA and TS samples collected from the same patient. Copy numbers of *M* gene present in each type of specimen were compared. The results, then, can guide clinicians in making choice of clinical samples for the H1N1 2009 diagnosis.

MATERIALS AND METHODS: A total of 12 patients: 2 adults and 10 pediatric cases, with severe pneumonia caused by pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus were enrolled in the study. From each patient, NS, NPA and TS specimens were collected in each 2 ml of viral transport media (VTM). Viral load in each kind of clinical sample were determined based on copy number of *M* genomic segments. Briefly, known concentrations of *in vitro* *M* RNA transcripts derived from pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus were amplified in parallel with the test sample by real time RT-PCR using CDC protocol version 2009. Standard curve of *M* copy numbers was constructed from the C(t) values of known concentrations of RNA transcripts; and then, copy number of *M* segments in the test sample was obtained by extrapolation of its C(t) value against this standard curve.

RESULTS: Of 12 subjects, *M* RNA segments were detected in 12 NPA, 12 NS and 9 TS samples. NPA specimens were found to contain the highest amount of viral load, and followed in order by NS and TS samples. Mean

copy numbers of viral load in NPA specimens was 1.54×10^8 (range 6.54×10^5 - 8.10×10^8) copies/ml of VTM; and it was 6.53×10^7 (range 5.62×10^2 - 4.93×10^8) copies/ml for NS and 1.05×10^6 (range 0- 7.38×10^6) copies/ml for TS.

CONCLUSION: Based on *M* gene copy numbers, we conclude that NPA is the best specimen for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus, and followed in order by NS and TS.

บทคัดย่อพร้อมผลงานฉบับเต็ม ของ Poster Presentation

Expression and purification of recombinant HPV-16 L1 and E6 proteins

Kamonwan Phlaingam¹, Parvapan Bhattarakosol²

¹*Inter-Disciplinary of Medical Microbiology, Graduate School,* ²*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract

HPV-16 is the most prevalent HPV type found in cervical cancer patients. At present, diagnosis of HPV-16 infection requires molecular diagnostic technique. Several attempts in developing a new diagnostic method have been made. To accomplish this objective, the preparation of HPV-16 antigens is needed. Glutathione-S – transferase (GST) fusion recombinant E6 and L1 proteins of HPV-16 were prepared from transformed *Escherichia coli* BL-21(DE3) with induction by isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Optimization of the expression conditions such as concentration of bacteria, concentration of IPTG, temperature and duration of expression were done. Moreover, the purification method using different type of reagents was also performed. Purified recombinant E6 and L1 can be used in developing HPV-16 diagnostic methods.

Keywords: Human papillomavirus, HPV type 16, recombinant protein, E6, L1

Introduction

Human papillomavirus (HPV) is a member of the family Papillomaviridae, a naked double-stranded DNA virus, 52-55 nm in diameter, covering with capsid proteins L1 and L2 (1-3). HPV is a major causative agent of cervical cancer among women worldwide especially in developing countries including Thailand (4). It was found in more than 90 % of cervical cancer patients especially high-risk strains, HPV 16 and 18, covered almost 70% of the cervical cancer patients. HPV E6 oncoprotein plays crucial roles in tumor development and is over-expressed in cervical cancer tissue. Therefore, E6 antigen could be a target molecule for early diagnosis of cervical cancer. HPV L1 is usually associated with active viral replication (4-6). In this study, HPV-16 recombinant proteins E6 and L1 were produced from transformed bacteria containing expression vector and purified by affinity column chromatography.

Materials and methods

Plasmids and bacterial transformation

Plasmid pGEX-4T-2-L1 containing HPV16 L1 fused with GST and pGEX-3X-MT-E6 containing HPV16 E6 fused with GST (7) are kindly provided by Prof. Peter C Angeletti, Nebraska Centre for Virology, School of Biological Sciences, University of Nebraska Lincoln, USA. All plasmids were transformed into the competent *Escherichia coli* BL-21(DE3). The clones containing recombinant plasmid were selected by using the specific antibiotics as recommended. The presence of HPV16 E6 or L1 gene was in the transformed bacteria confirmed by PCR using primers specific to HPV16 E6 and HPV16 L1 (8).

Induction of expression

The expression condition was optimized by varying concentration of IPTG (0.25 ,1 mM), temperature (25 °C, 37 °C) and duration of IPTG induction time (4, 6, 8 hr). *Escherichia coli* BL-21(DE3) clones containing pGEX-4T-2-L1 and *Escherichia coli* BL-21(DE3) clones containing pGEX-

3X-MT-E6 were grown in 20 ml LB broth plus 100 µg/ml ampicillin at 37 °C overnight. The bacterial culture was inoculated into 2 liters of LB broth and continuously grown at 25 °C or 37 °C until the O.D value between 0.6 - 0.8 at absorbance wavelength of 600 nm was obtained. These proteins expression were induced by incubating the bacteria in the presence of either 0.25 or 1 mM of IPTG for 4, 6 or 8 hr. Bacteria were then harvested by centrifugation, washed with PBS and kept frozen at -80°C.

Protein extraction

The bacteria were thawed, resuspended in PBS containing 2 mM DTT, 1% Triton X-100, lysozyme, complete proteases inhibitor cocktail (Roche Co.) and lysed by sonicator (High intensity ultrasonic processor VC505, SONICS) at amplitude of 35% with pulse on for 30-second and pulse off for 50-second for a total of 6 cycles. Lysates were collected by centrifugation at 17,000 rpm, 4 °C for 30 min. The supernatant and cell lysate pellet were separately collected and kept at -20°C until further analysis by SDS-PAGE.

Protein purification

After SDS-PAGE analysis, the L1 protein was found to be in inclusion bodies associated with the bacterial pellet while E6 protein was soluble in supernatant part. The L1 pellet was washed with buffer (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 1mMEDTA) and solubilized in urea solution (8M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 0.1 M DTT, 10 mM Tris pH8) at room temperature for 2 hr. Debris was removed by centrifugation at 20,000 rpm, for 30 min at the 20 °C and supernatant containing L1 proteins was collected. Supernatant containing E6 was further purified by GST fusion protein affinity column purification kit (GE healthcare Co.). Total protein concentrations of L1 and E6 were measured by Quant-iT protein assay kit (Qubit fluorometer; Invitrogen Co.). Purity of fusion proteins L1 and E6 were analysed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot using

mouse anti-HPV-16 L1 and E6 monoclonal antibody (Santa cruz), respectively.

Results

Expression of recombinant proteins

To optimize the expression conditions, concentration of IPTG, temperature and duration of induction were determined as shown in figure 1. The results indicated that optimum expression condition of recombinant L1 protein induced by 1 mM IPTG was at 37 °C for 4 hr, while recombinant E6 protein was optimally induced with 0.25 mM IPTG at room temperature (25⁰C) for 6 hr. These conditions were used through out this study for protein expression and SDS-PAGE analysis.

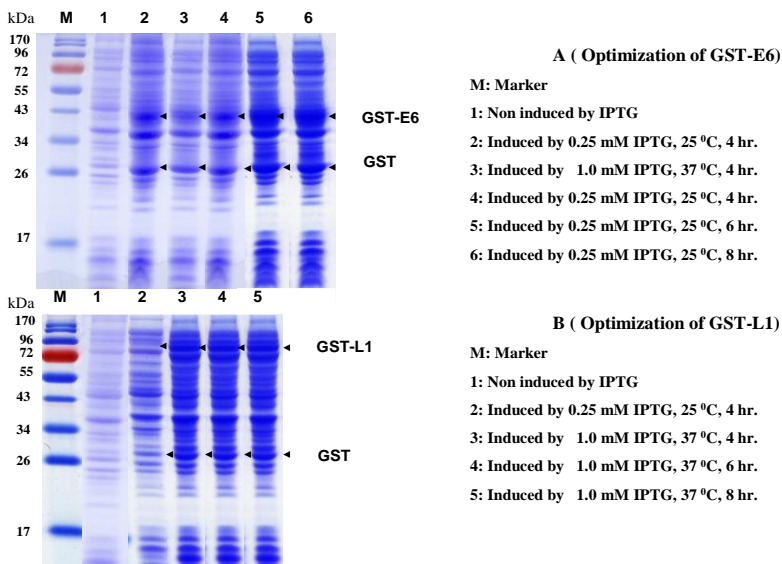


Figure1. SDS-PAGE analysis with coomassie blue staining of the GST-HPV16E6 fusion proteins (A) and GST-HPV16L1 fusion proteins (B) in *E.coli BL-21(DE3)* with various conditions of induction by IPTG: concentration of IPTG , temperature and duration of IPTG induction.

Purification of recombinant protein

After the HPV16 L1 and E6 proteins were expressed under optimum conditions, the GST-HPV16 L1 was found in inclusion bodies associated to the pellet of bacterial cell lysate, while the GST-HPV16E6 was found soluble in cell lysate supernatant. Then the L1 protein in cell pellet was solubilized in 8M urea solution. This 8M urea-soluble protein containing GST-HPV16L1 was analysed by SDS-PAGE showing the fusion protein band at about 80 kDa (figure 2). The GST-HPV16E6 soluble protein was directly purified by GST affinity chromatography. The eluted protein from the column was further analysed by SDS-PAGE and Western blot as illustrated in figure3A and 3B, respectively. The E6 fusion protein band was about 43 kDa and the GST band was about 26 kDa. Under these condition of expression and purification, approximately 0.8 mg of GST-HPV16L1 and 2 mg of GST-HPV16 E6 proteins were earned from 2 liters of bacteria culture.

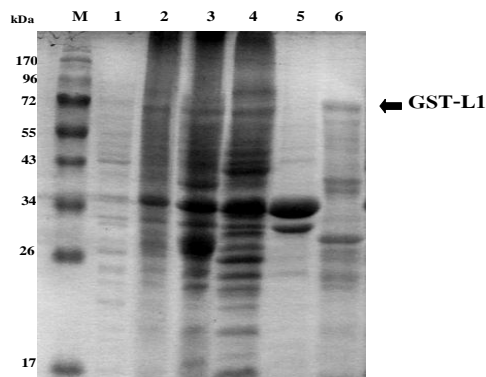


Figure2. SDS-PAGE analysis of expression and purification of GST-HPV16L1. Lane M, protein marker, lane 1 and 2, whole cell lysate from *E.coli BL-21(DE3)* containing pGEX-4T-2-L1 non-induce and induced by IPTG, respectively. Lane 3 inclusion bodies from *E.coli BL-21(DE3)*, lane 4 soluble fraction from *E.coli BL-21(DE3)*, lane 5 flow-through washed *E.coli BL-21(DE3)*, lane 6 purified GST-HPV16L1 in urea solution.

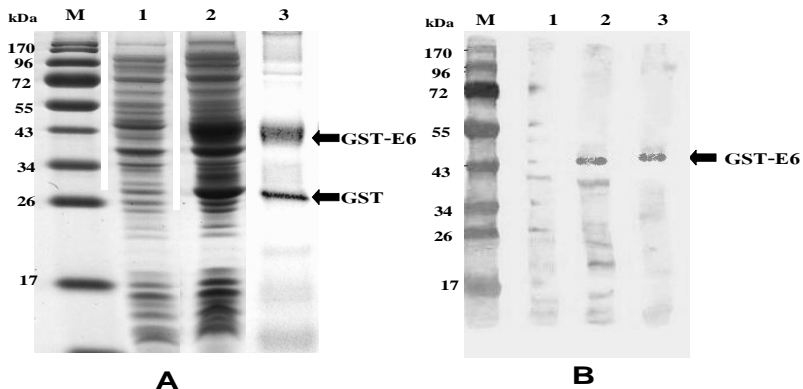


Figure 3. SDS-PAGE and Western blot analysis of expression and purification of GST-HPV16E6. A: SDS-PAGE stained with coomassie blue and B: Western blotting, the purified GST-E6 was detected with the mouse anti-E6 monoclonal antibody, lane 1 whole cell lysate from *E. coli* BL-21(DE3) non-induced by IPTG, lane 2 whole cell lysate from *E. coli* BL-21(DE3) containing pGEX-3X-MT-E6 induced by IPTG, and lane 3 purified of GST-HPV16E6.

Discussion

In this study, two recombinant fusion proteins, GST-HPV16L1 and GST-HPV16E6, were successfully prepared from *E. coli*. Several groups have previously reported methods for preparation of these 2 proteins from different systems, mammalian cells, yeast, baculovirus, transgenic plants, bacteria (9-12). The bacterial strain *E. coli* BL-21 used in this study is the only strain able to express fusion protein. Compared to other systems, the bacterial system has the advantage of the ease of expression and purification and provides large amount of protein, which can be used as antigen for antibody detection and vaccine production. In addition, the glutathione-S-transferase (GST) gene fusion system provides an integrated system for the expression, purification and detection of glutathione-S-transferase fusion proteins using *E. coli*. Slightly modification

of purification procedure was performed such as temperature condition, for which most studies used 37⁰C instead of 25⁰C for GST-HPV16E6. The localizations of GST-HPV16L1 proteins in inclusion bodies and of GST-HPV-16 E6 in soluble fraction were in accordance with previous reports (9-11). Although 8 M urea was used as solubilizer in extraction of GST-HPV16L1 proteins, the yield of purified protein was very low. The expressed GST-HPV16E6 proteins was easily purified by GST affinity chromatography and obtained in large amount. These 2 fusion proteins will be further used as antigens for developing some diagnostic test for example HPV-16 antibody detection.

Acknowledgements

This work was supported by The Government endowment fund of Chulalongkorn University.

References

1. Gnanamony M, Peedicayil A, Abraham P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. *Indian J Med Microbiol.* 2007 Jan;25(1):10-7.
2. Kisseljev FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry (Mosc)* 2000 Jan;65(1):68-77.
3. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2-5.
4. Thomas DB, Ray RM, Koetsawang A, Kiviat N, Kuypers J, Qin Q, et al. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Am J Epidemiol* 2001 Apr 15;153(8):723-31.
5. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.

6. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004 Jan;50(1-2):9-19.
7. Vaeteewoottacharn K, Chamutpong S, Ponglikitmongkol M, Angeletti PC. Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology* 2005;2:50.
8. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1996 Sep;34(9):2095-100.
9. Sehr P, Muller M, Hopfl R, Widschwendter A, Pawlita M. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J Virol Methods* 2002 Oct;106(1):61-70.
10. Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 2001 Mar 16;307(1):173-82.
11. Kimbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993 Dec;67(12):6929-36.
12. Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Muller M. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 2003 Sep;77(17):9211-20.

Comparison of multiplex and monoplex nested polymerase chain reaction methods for detection of human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus

Busaba Srimee¹, Leera Kittigul¹, Ornpreeya Suptawiwat², Apinya Narmsai², Suda Louisirotchanakul²

¹*Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand,* ²*Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand*

Abstract

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis C virus (HCV), and hepatitis B virus (HBV) share the same route of transmission. Co-infections with HCV or HBV are common in HIV-infected persons. In this study, a multiplex nucleic acid amplification testing (NAT) based on nested polymerase chain reaction (PCR) as well as monoplex nested PCR were developed to detect HIV-1, HCV, and HBV. The primer pairs were designed from conserved regions of HIV-1 at gag region, HCV at 5'UTR of internal ribosome entry site, and HBV at surface region. These primers yielded PCR products of different sizes: 114 bp for HIV-1, 226 bp for HCV, and 324 bp for HBV. The limit of detection (LOD) of the multiplex PCR was evaluated by testing serial dilutions of RNA/DNA standards. The multiplex PCR could detect HIV-1, HCV and HBV at 1×10^4 , 3.2×10^5 and 2×10^3 copies/ml, respectively. The sensitivities of multiplex PCR were 2-fold and 8-fold lower than that of monoplex PCR for HIV-1 and HCV, respectively. Meanwhile, similar sensitivity was found by both assays for HBV detection. The multiplex PCR can be used to detect HIV-1, HCV, and HBV, particularly in individual infected with multiple agents in order to prevent the transfusion-transmitted viral infections.

Introduction

Globally, it was reported that 40 million persons were infected with HIV-1, 4-5 million were chronically infected with HCV and 2-4 million were chronically infected with HBV [1]. Because of high prevalence of HCV/HIV-1 or HBV/HIV-1 co-infections and the difference in management of the patients, all HIV-1-infected persons should be tested for HCV and HBV [2, 3]. Although sensitive serological tests have been developed successfully, a residual risk of viral infection persists, since the HIV-1, HCV and HBV infections may be transmitted either during window period, when viremia precedes seroconversion, or in the presence of immunovariant virus infection, where the serological tests may be ineffective [2]. Nucleic acid testing by highly sensitive amplification methods is a promising approach to shorten the preseroconversion window and reduce virus transmission [4]. As studied by Schreiber et al. [5], PCR testing for HIV-1, HCV, and HBV of blood donors would reduce this window period by 11, 59, and 25 days, respectively. Thus, the development of molecular assays for blood-borne viral infections has made it possible to detect acute infections at an earlier stage than would be possible with conventional techniques and to measure the concentration of virus present in blood during the acute or even chronic phases of infection [6]. A multiplex assays for simultaneous detection of the three viruses is the most cost-effective way to screen blood donor. However, most multiplex assays suffer from reduced sensitivity up to 10-fold [7]. Here, we describe a multiplex assay with comparable or only slightly reduced sensitivity as compared to monoplex PCR.

Materials and Methods

In order to develop nucleic acid amplification testing, sensitivities of multiplex and monoplex PCRs were compared based on copy numbers

of RNA and DNA standards as targets of amplification. The details of all primers are shown in Table 1. Laboratory experiments were done at Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

Table 1 The primers used and PCR products of HIV-1, HCV and HBV.

Assay	Virus	Primer	Primer sequence (5'→3')*	Region	Product size, bp	Reference			
Monoplex PCR	HIV-1	HIV-1_cl_F	CAG CAT TRT CAG ARG GAG CYA	<i>Gag</i>	550	This study			
		HIV-1_cl_R	GGY CCY CCY ACT CCC TGR CAT	<i>gag</i>					
	HCV	HCV3	CCA CCA TAG ATC ACT CCC CTG T	5'UTR	287	[8]			
		HCV4	CAC TCG CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT						
	HBV	HBV_cl_F	CCT GCT GGT GGC TCC AGT TCA	preS2-P gene	1,102	This study			
		HBV_cl_R	CCG RGC AAC GGG GTA AAG GTK C						
Monoplex and multiplex nested PCRs	HIV-1	Outer primer	SK380 SK390	GAG AAC CAA GGG GTG ACA TAG CAG G	<i>Gag</i> gene	214	[9]		
		Inner primer	SK38 SK39	TAG AAC CGG TCT ACA TAG TCT CTA AAG GG					
		HCV	Outer primer	HCV3 HCV4	CCA CCA TAG ATC ACT CCC CTG T CAC TCG CAA GCA CCC TAT CAG	5'UTR	287	[8]	
			Inner primer	HCV1 HCV2	GCA GT GYC TAG CCA TGG CGT TAG TAY GAG ACC CTA TCA GGC AGT ACC ACA AG				
			HBV	Outer primer	HBPr134 HBPr135	TGC TGC TAT GCC TCA TCT TC CAR AGA CAA AAG AAA ATT GG	S gene	409	[11]
				Inner primer	HBPr75 HBsAg_R	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CC GAT GTT GTA CAG ACT TGC C			

* R = G or A, Y = T or C, K = G or T

1. Construction of HIV-1 and HCV RNA standards: Viral RNAs were extracted from anti-HIV- and anti-HCV-positive plasma by using a QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Subsequently, the target RNA was amplified with HIV-1_cl_F/HIV-1_cl_R primers at *gag* region of HIV-1 or HCV3/HCV4 at 5' UTR region of HCV using reverse transcription (RT)-PCR method. The amplicon products were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI). The DNA plasmids were purified on columns with a QIAprep[®] Spin Miniperp Kit (QIAGEN, Valencia, CA) and linearized using *SalI* (Biolab, Ipswich, MA). The resulting DNA templates were transcribed into RNA with T7 RNA polymerase by using the Riboprobe[®] *in vitro* Transcription Systems (Promega, Madison, WI). After that, concentrations of specific RNA transcripts were determined by spectrophotometer and calculated the number of RNA molecule based on Avogadro's number as reported by Hoffmann et al. [12]. Subsequently, serial dilutions of RNA standards were reverse transcribed to cDNA by using SuperScript[™] III Reverse Transcriptase and random hexamers primer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, cDNA was amplified by multiplex nested PCR and its sensitivity was compared with monoplex nested PCR.

2. Construction of DNA standard: HBV DNA was extracted from HBsAg-positive plasma by a QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Then, the target DNA was amplified with HBV_cl_F/HBV_cl_R primers at preS2-*P* region. The amplicon product was cloned as described above. The plasmid DNA was purified and the concentration of DNA was determined as described above. Then, serial dilutions of DNA standard were amplified by multiplex nested PCR and its sensitivity was compared with monoplex nested PCR.

3. Monoplex nested PCR and multiplex nested PCR: cDNA or DNA standard of each virus was amplified with specific primers, as shown in Table 1. For monoplex first-round PCR, The template (5 μ l) was mixed with a reaction mixture containing 2.5 μ l of 10X PCR Buffer, 1.5 μ l of 25 mM MgCl₂, 2 μ l of 10 mM dNTPs mixture, 1 μ l of each primer pairs, and 0.125 μ l of TaKaRa *r Taq* (5 units/ μ l) (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan). DNase/RNase-free water was added to make up a total volume of 25 μ l.

The first-round PCR was performed at 95°C for 2 min followed by 35 cycles of 94°C for 45 sec; 55°C for 45 sec; 72°C for 2 min; and a final extension at 72°C for 10 min. For multiplex nested PCR (second-round PCR), the first-round PCR amplification product (1 µl) was added to a reaction mixture (24 µl) as described for the first-round PCR. The second-round PCR was performed using the same conditions as the first-round PCR except change in the annealing temperature from 55°C to 60°C, and a change in primer extension time at 72°C from 2 min to 1 min. For multiplex nested PCR, the process was the same as multiplex nested PCR except all specific primers for HIV-1, HCV, and HBV were mixed together in one tube.

Results

In both multiplex and multiplex assays, the amplified products were 214, 287, and 409 bp in the first-round PCR for HIV-1, HCV, and HBV, respectively, as shown in Figure 1A. The second-round PCR products of HIV-1, HCV, and HBV were 114, 226, and 324 bp, respectively (Figure 1B). By serial dilutions of standard RNA/DNA templates, the limit of detection (LOD) of multiplex nested PCR for HIV-1 and HCV were at 1×10^4 and 3.2×10^5 copies/ml compared with multiplex nested PCR at 5×10^3 and 4×10^4 copies/ml, respectively (Figure 2). However, the same LOD was found at 2×10^3 copies/ml for HBV tested by both assays.

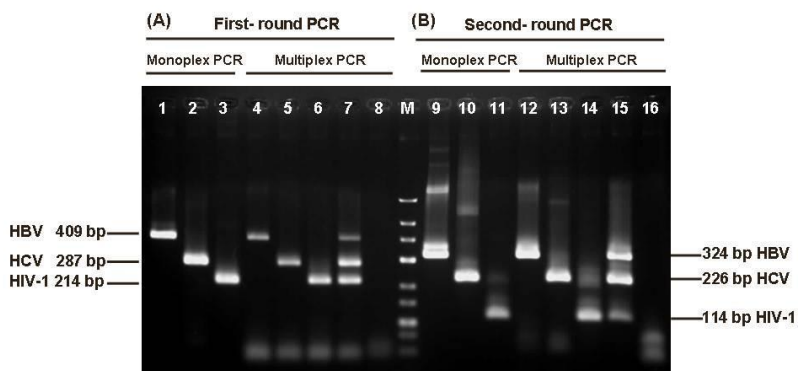


Figure 1 The appearance of amplicons from monoplex PCR and multiplex PCR for HBV, HCV, and HIV-1 detection; first-round PCR products shown in Figure 1A and second-round PCR products shown in Figure 1B. Lane M: DNA marker; lanes 1, 4, 9, and 12: HBV; lanes 2, 5, 10, and 13: HCV; lanes 3, 6, 11, and 14: HIV-1; lanes 7 and 15: pools of HBV, HCV, and HIV-1; lanes 8 and 16: negative controls of multiplex PCR.

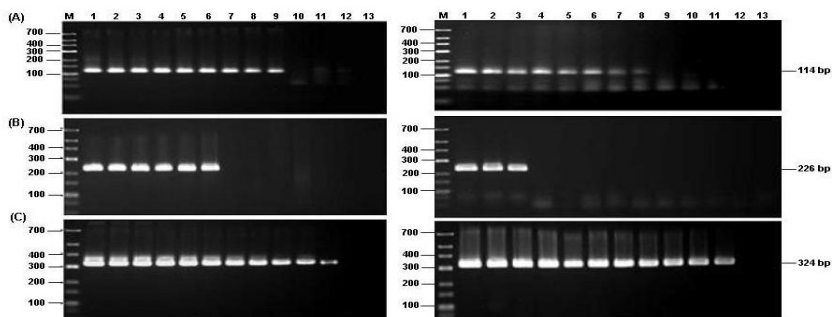


Figure 2 Sensitivity of HIV-1 (A), HCV (B), and HBV (C) detection by monoplex nested PCR (left) and multiplex nested PCR (right) using serially diluted standard templates. Lane M: DNA marker; lanes 1-11 (A) and lanes 1-11 (B): 1.28×10^6 , 6.4×10^5 , 3.2×10^5 , 1.6×10^5 , 8×10^4 , 4×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 2.5×10^3 , and 1.25×10^3 copies/ml; lanes 1-11 (C): 3.2×10^7 , 6.4×10^6 , 1.28×10^6 , 2.56×10^5 , 1.28×10^5 , 6.4×10^4 , 3.2×10^4 , 1.6×10^4 , 8×10^3 , 4×10^3 , and 2×10^3 copies/ml; lanes 12 and 13: negative controls for the first- and second-round PCRs, respectively.

Discussion

This pilot study found that the multiplex nested PCR for detection of HIV-1 RNA was 2-fold less sensitive than the monoplex nested PCR. The sensitivity of the multiplex nested PCR for HCV RNA was 8-fold reduced as compared with the monoplex nested PCR. However, the sensitivity of multiplex and monoplex nested PCRs were comparable for HBV DNA testing. These results indicate that the sensitivity of multiplex PCR decreased in comparison with that of monoplex PCR for HIV-1 and HCV but not for HBV. The multiplex PCR gave lower sensitivity than the monoplex PCR due to the competition of primer pairs during PCR process which may affect the amplification efficiency of each target [13]. This finding is similar to the previous study of multiplex PCR for detection of enterovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, and influenza A virus [7]. Although the multiplex PCR developed in this study has lower sensitivity than monoplex PCR, the advantages of multiplex PCR are the simultaneous detection of HIV-1, HCV, and HBV, the cost effectiveness, and the shorter time required. This technique can be used to detect these three transfusion-transmitted viruses for diagnosis of co-infections and might be appropriate for developing countries. The determination of the performance of the method is being under studied with plasma samples for clinical evaluation.

Acknowledgements

Special thanks are greatly expressed to Prof. Pilaipan Puthavathana and Miss Achareeya Korkusol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for their suggestion on technical problems. This work was partially supported by the Thesis Grant from Faculty of Graduate Studies, Mahidol University and funded by Siriraj Research Development Fund from Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

References

1. Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol* 2006; 44: S6-9.
2. Sulkowski MS. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol* 2008; 48: 353-67.
3. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-71.
4. Roth WK, Weber M, Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* 1999; 353: 359-63.
5. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-90.
6. Kao JH, Heptonstall J, Chen DS. Molecular methods of measurement of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection: implications for occupational health practice. *Occup Environ Med* 1999; 56: 730-4.
7. Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol* 2005; 150: 1175-85.
8. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239: 295-7.
9. Fox SA, Lareu RR, Swanson NR. Rapid genotyping of hepatitis C virus isolates by dideoxy fingerprinting. *J Virol Methods* 1995; 53: 1-9.
10. Gibellini D, Gardini F, Vitone F, Schiavone P, Furlini G, Re MC. Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. *Mol Cell Probes* 2006; 20: 223-9.
11. Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 702-7.
12. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirmmeier H, Depner K. Validation of a real-time RT PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 2005; 130: 36-44.
13. Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3724-30.

Neuraminidase Inhibitor Resistant Seasonal Influenza H1N1 Viruses in Thailand During 2006 to 2009

Worawat Dangsagu¹, Pattaraporn Cheuypratoom², Warangkana Aonsung³, Sontana Siritantikorn¹, Pilaipan Puthavathana¹,

¹*Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand,* ²*Regional Medical Sciences Center Udonthani, and*

³*Regional Medical Sciences Center Nakornsawan, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand*

Abstract

Surveillance for oseltamivir or zanamivir resistant seasonal influenza H1N1 viruses was carried out in 28 virus isolates and 41 respiratory samples collected from 3 provinces of Thailand during 2006 to 2009. Neuraminidase (NA) inhibition assay using MUNANA substrate was used to determine 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the virus isolates; and direct nucleotide sequencing of PCR products derived from amplification of *N* genomic segments present in clinical samples was performed. The nucleotide sequences were analyzed for amino acid mutation position indicating of drug resistance. Our study showed that all 22 influenza isolates investigated in 2006 and 2007 were drug susceptible with mean IC₅₀ of 0.93 and 1.40 nM, respectively for oseltamivir. The isolates in 2008 and 2009 were oseltamivir resistant with mean IC₅₀ of 437.12 and 709.05 nM, respectively. The resistant mutation H274Y in *N* gene (N2 numbering) was found in all 6 clinical samples collected in 2008, but none of the 35 samples collected between 2006 and 2007. Fortunately, all of the 28 isolates tested were zanamivir sensitive, i.e., mean IC₅₀ of 0.42 to 4.89 nM; and no mutational change indicating zanamivir resistance was observed in all clinical samples tested.

Introduction

Two neuraminidase inhibitors (NAI), oseltamivir and zanamivir, have been used for treatment and prophylaxis of influenza A and B viruses. The principal target for these drugs is the viral surface glycoprotein, neuraminidase, which facilitates the release of viral progenies. Thus, the virus spread is blocked (1). Oseltamivir resistant influenza viruses had never been detected until 2002, when 0.35% of the isolates were found resistant (2). Up to 18% of drug resistant H3N2 viruses could be found in immunocompetent individuals treated with oseltamivir according to R292K, E119V or N294S mutations (N2 numbering) (3). At present, almost 100% of seasonal influenza H1N1 viruses are resistant to oseltamivir owing to mutational change from histidine to tyrosine at amino acid position 274 (H274Y in N2 numbering) in NA molecule (4). Nevertheless, the H274Y mutant viruses are still sensitive to zanamivir (4). The H274Y mutation was seen in N1 in both cell culture passaged viruses and clinical specimens from immunocompetent or immunocompromised patients treated with oseltamivir (5). The National Institute of Health, Thailand reported the occurrence of 17 oseltamivir resistant seasonal H1N1 isolates as assayed by fluorometric based NA inhibition assays in 2008, together with the report of H274Y mutation in all 18 clinical samples tested in 2009 (6). Our study conducted a surveillance of oseltamivir and zanamivir resistant seasonal H1N1 viruses prevalent in Bangkok and rural area of Thailand between 2006 and 2009 by using the fluorometric based NA inhibition assay as well as nucleotide sequencing for mutational change in *N* gene. Our study provided additional data from different geographical sites for both drugs as well as the earlier time period of investigation.

Materials and Methods

Specimen collection

Only the respiratory samples positive for seasonal H1N1 virus were included in this study. These samples were obtained from the Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, and the Regional Medical Sciences Centers: Udonthani and Nakornsawan during the period between 2006 and 2009. The specimens were kept frozen at -80 C until transported to Siriraj Influenza Collaborating Research Center for virus isolation and nucleotide sequencing.

Viral isolation

Influenza viruses were isolated in MDCK (Madin Darby Canine Kidney) cell monolayer maintained in EMEM (Earle's Minimal Essential Medium) medium plus 2µg/ml trypsin TPCK (Sigma-Aldrich, MO) without serum supplement. Two hundred microliter of the processed specimens were inoculated into a tube of MDCK cell monolayer in duplicate. The inoculated tubes were daily observed for cytopathic effect (CPE), and the virus isolates were recognized by hemagglutination (HA) assay.

Hemagglutination (HA) assay

A reaction well contains 50 µl of virus suspension and 50 µl of 0.75% guinea pig RBC in a U-shaped microtiter plate. PBS pH 7.2 was used as buffer solution. The reaction plate was incubated at 4 C for one hour before reading the result. Hemagglutination titer is defined as the highest virus dilution that completely agglutinates the RBC (7).

Neuraminidase inhibition test

A fluorescence-based NA inhibition assay was used to determine the sensitivity of influenza viruses to the NA inhibitor compounds. The test protocol followed what had been described by Lanckerby A (8). The assay principle is based on measurement of the fluorescent product, 4-methylumbelliferone, released as the result of viral NA cleavage of 2'-2' -

(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate (MUNANA) substrate. Initially, NA activity assay was carried out to determine the working dilution of each virus isolate for further use in NA inhibition assay. The test virus was two- fold diluted with the assay buffer containing 32.5 mM of 2-(*N*-morpholino) ethenesulfonic acid (MES; sigma) and 4 mM of CaCl₂, pH 6.5 ; and 20 μ l of each virus dilution were mixed with 30 μ l of MUNANA substrate (100 μ M), and then, incubated at 37 C for 60 min. MUNANA substrate was cleaved by viral NA into free 4-methylumbelliferone (MU) and NANA. Then, the reaction was terminated by adding of 150 μ l of stop solution (25% ethanol, 0.1 M glycine, pH 10.7). The reaction plate was read under fluorescence spectrophotometer, in which free MU was excited by UV light at wave length of 355 nm and the fluorescence emission was measured at a wave length of 460 nm.

In order to determine IC₅₀ values which could be comparable, dose of the test viruses should be standardized. Standard dose of virus was established in relation to fluorescence intensity of MU. The MU solution was serially two fold diluted, starting from the concentration of 4 to 10⁻⁶ mM, and then, relative fluorescence intensity was measured by fluorescence spectrophotometer. The RFU (relative fluorescence unit) values obtained were plotted against MU concentrations to generate a standard curve (Fig. 1). It was shown that linearity of the standard curve was observed at RFU values between 20,000 to 40,000. Therefore, the amount of viruses that yielded RFU value between 20,000 and 40,000 was selected as the standard dose. In general, all tested viruses in our study were assayed at the RFU value about 30,000 (Fig. 2).

In NA inhibition assay, virus at standard dose was mixed with oseltamivir or zanamivir which had been serially four-fold diluted starting from the concentration of 20,000 to 0.076 nM (final concentration 4,000 to 0.015 nM), and incubated at 37 C for 30 min. The reaction well was added with MUNANA, incubated at 37 C for 60 min; and then, the reaction was terminated. IC₅₀ was determined by extrapolation of 50% of relative

fluorescence intensity value of the test virus in presence of drug against the plotting curve of virus control. (Fig. 3)

Direct NA nucleotide sequencing

Total RNA was extracted from clinical specimens or infected culture by QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden). An extraction reaction consists of 560 μ l of AVL buffer containing RNA carrier and 140 μ l of clinical specimen or infected cell culture. The extraction protocol is according to that described for QIAamp Mini column. RNA sample was stored at -70 C until tested. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using random hexamer primers and the SuperScript III reverse transcriptase (GIBCO, Biological Research Laboratory, and N.Y.). Viral cDNA was amplified by *N* gene specific primer pair which gave rise to PCR product at size of 735 bps spanning nucleotide positions 254 to 989. Therefore, mutation positions H274Y and N294S (N2 numbering) indicating drug resistance can be determined (Table 1). PCR products were further purified by QIAquick Gel Extraction Kit before sending for nucleotide sequencing. Nucleotide sequences were edited by Bioedit program (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Results

There were 22 virus isolates tested by NA inhibition assay during 2006 to 2007, and all of them were sensitive to both oseltamivir and zanamivir. In contrast, all 6 virus isolates during 2008 to 2009 were resistant to oseltamivir; meanwhile, they were still susceptible to zanamivir (Table 2). Similar result was demonstrated by direct *N* gene sequencing such that all 35 clinical samples collected in 2006 and 2007 showed no H274Y and N294S mutational changes, while the H274Y mutation was observed in all of 6 clinical samples investigated in 2008. We have no sequencing data for the clinical samples collected in 2009 (Table 3).

With limitation of number of virus isolates tested, there were 5 cases that NA inhibition assay was performed in virus isolates; and

nucleotide sequencing was performed in respiratory samples. The results from the two tests were agreeable in such a way that the two tests reported three oseltamivir sensitive and two resistant influenza strains. In parallel, the two tests reported that all 5 virus isolates were zanamivir sensitive, and mutation indicating zanamivir resistance was not found.

Table 1. Mutation positions indicating NA inhibitor resistance (9, 10)

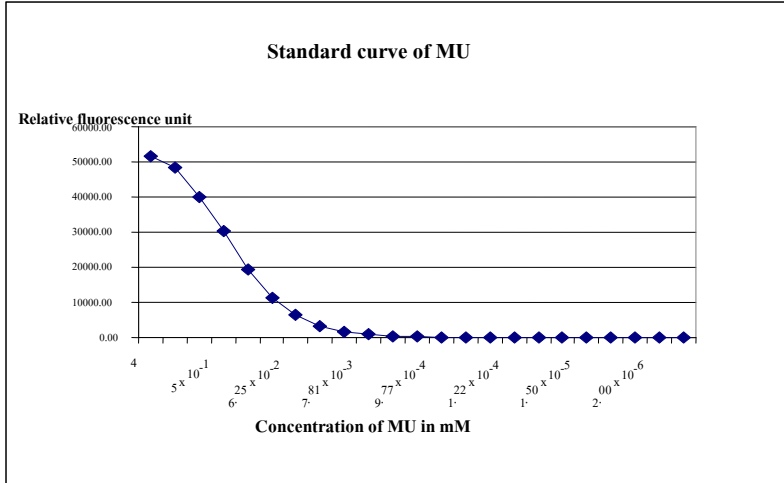
NA subtype	NA mutation positions (N2 numbering)	
	Oseltamivir	Zanamivir
A/H1N1	H274Y, N294S	Q136K
A/H3N2	E119V, D151E, I222V, R224K , R292K, N294S, R371K, E276D	E119A/D/G, R224K, R292K, R371K, E276D
B	E119A/D/G/V, R152K, D198N, R292K	E119A/D/G, R152K, D198N, R292K

Table 2. Susceptibility of seasonal influenza H1N1 virus isolates to NA inhibitors

Year	Number tested	Mean, median and range of IC50 in nM	
		Oseltamivir	Zanamivir
2006	18	0.93, 0.94, (0.50-1.42)	1.22, 1.02, (0.42-2.11)
2007	4	1.40, 1.32, (1.02-1.94)	2.04, 1.91, (0.63-3.71)
2008	5	437.12, 428.03, (370.73-495.54)	2.19, 2.13, (1.45-3.30)
2009	1	709.05	4.89

Table 3. Nucleotide sequencing for drug resistant markers in clinical samples from patients with seasonal H1N1 virus infection

Year	Number tested	Amino acid positions on NA gene (N2 numbering)			
		H274	H274Y	N294	N294S
2006	32	32	-	32	-
2007	3	3	-	3	-
2008	6	-	6	6	-



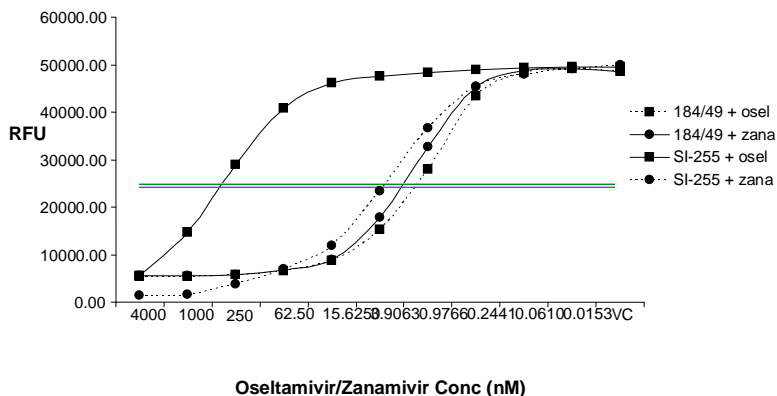


Fig 3. NA inhibition assay of U184/49 and SI-255 against oseltamivir and zanamivir. U184/49 is sensitive to both drugs (IC₅₀ = 1.46 nM for oseltamivir, and 2.51 nM for zanamivir), while SI-255 is sensitive to zanamivir (IC₅₀=3.31 nM),but resistant to oseltamivir (IC₅₀ = 372.18 nM)

Discussion

The oseltamivir resistant H1N1 viruses become a growing problem worldwide after its emergence in Europe in late 2007 (11). All of these resistant viruses had H274Y mutational change in amino acid sequence derived from *N* gene. High levels of resistance was found in Europe, South Africa, Australia, New Zealand and some Southeast Asian countries, all of which used little or no oseltamivir for the treatment of influenza (12, 13). Based on phenotypic and genotypic based assay, our study could not detect any drug resistant seasonal influenza H1N1 virus between 2006 and 2007; meanwhile the high percentages of drug resistance have been discovered in 2008 and 2009. Our result was supported by the data from the Thai NIH when 17 drug resistant influenza H1N1 isolates were found in 2008 by phenotypic assay; and in 2009, all of the isolates tested by genotypic assay were drug resistant. In another

word, drug resistant influenza H1N1 virus was discovered in Thailand at one year after its emergence in Europe. And it is noticeable that level of IC50 of the resistant virus in 2009 was dramatically higher than the IC50 level in 2008. More isolates are needed for further investigation.

Regarding zanamivir phenotypic-based sensitivity assay, all of the viruses tested were drug sensitive. Additionally, mutation indicating zanamivir resistant was not found in all clinical samples investigated. Nevertheless, it is interesting to see that the viruses have a trend towards an increasing IC50 values by years; and this point is to be further explored.

Acknowledgement

This study was supported by the Thailand Research Fund for Senior Research Scholar; and the National Science for Technology Development Agency.

References

1. Sidwell RW, Huffman JH, Barnard DL, Bailey KW, Wong M, Morrison A, et al. Inhibition of influenza virus infections in mice by GS4104, an orally effective influenza virus neuraminidase inhibitor. *Antivir Res* 1998;37:107-20.
2. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2395–402.
3. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraiishi K, Kawakami C, Kimura K, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004;364:759-65.
4. Hurt AC, Ernest J, Deng Y, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antivir Res* 2009;83:90-3.

5. Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 2004;103:199-203.
6. Thai National Influenza Center, National Institute of Health, Thailand. [online] 2009 [cited 2009 Nov 3]. Available from:<http://www.thainihnic.org/Files/ResistantInfluenzaThailand2008>
7. World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5. [online] 2002 [cited 2009 Nov 3];[99 screens]. Available from: URL:<http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>
8. Lackenby A. Determination of influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors using a fluorescent substrate. [online] [cited 2009 Nov 3]. Available from: http://www.nisn.org/documents/Zambon_-_VIRGIL_IC50_SOP.pdf
9. Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol* 2009;83:10366-73.
10. Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol* 2008;41:13-9.
11. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Eurosurveillance* 2008;13:1-2.
12. Besselaar TG, Naidoo D, Buys A, Gregory V, McAnemey J, Manamela JM, et al. Widespread oseltamivir resistance in influenza A viruses (H1N1). *South Africa Emerg Infect Dis* 2008;14:1809-10.
13. Hurt AC, Barr IG, Hartel G, Hampson AW. Susceptibility of human influenza viruses from Australasia and South East Asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. *Antivir Res* 2004;62:37-45.

Comparison of multiplex and monoplex reverse transcription-polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A and hepatitis E Viruses

Aphinya Narmsai¹, Poonsap Virulhakul², Pilaipan Puthavathana¹, Uamporn Siripanyaphinyo³, Myint Khin Saw Aye⁴, Manee Gannarong⁵, Ratchada Ittapong⁶, Niracha Wongchinda², Suda Louisirotchanakul¹

¹*Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok;* ²*Central Government, Department of Fisheries, Bangkok;* ³*Research Collaboration Center on Emerging and Re-emerging Infections (RCC-ERI), Department of Medical Sciences, Nonthaburi;*

⁴*Virology Unit, Armed Forces Research Institute of the Medical Sciences, Bangkok;* ⁵*Fish Inspection and QC Division, Surat Thani;* ⁶*and Fishery Technological Development Division, Bangkok, Thailand.*

Abstract

In order to survey for viruses of food-borne transmission, a molecular technique has been developed for the detection of hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) in the environment. In this study, reverse transcription (RT)-multiplex PCR for a simultaneous detection of HAV and HEV by using two specific primers targeting the conserved regions of HAV capsid (VP3-VP1) and HEV ORF2/3 was developed; and their sensitivities were compared with monoplex individual PCR. By using RNA standard obtained from *in vitro* transcription, the limit of HAV detection by multiplex and monoplex PCR was 40 copies/reaction (40,000 copies/ml) and at least 2.5 copies/reaction (2,500 copies/ml), respectively. The limit of HEV detection by multiplex and monoplex PCR was 20 copies/reaction (20,000 copies/ml) and 5 copies/reaction (5,000 copies/ml), respectively. Therefore, RT-monoplex PCR for HAV and HEV detection was more sensitive and more applicable in the surveillance for contamination of these two viruses in seafood.

Introduction

At present, nucleic acid-based assays such as PCR is a sensitive and specific method that has been used for detecting enteric viruses including HAV and HEV in environment; water and seafood such as shellfish [1]. HAV and HEV have the same mode of transmission: fecal-oral route, food-borne or water-borne, which resulted in community-wide outbreak. Genomes of both viruses are positive-sense, single-stranded RNA [2-4]. In order to reduce labor and reagent costs and handling time, RT-multiplex PCR was developed for the detection of HAV and HEV simultaneously in one reaction tube. The analytical sensitivity of this assay was evaluated against RNA standards and compared with RT-monoplex PCR for individual virus.

Material and Methods

Construction of RNA standards: For HAV, viral RNA extraction from HM175 HAV strain infected BSC-1 cells was performed using the TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacture's instructions. Viral genome segments were amplified by RT-PCR with 5'UTR F and VP1-2A R primers for HAV; and HE-ORF2 R and HE361 primers for HEV plasmid (Thai-swHEV07 strain) (Table 1). Amplified products were cloned and identified by restriction endonuclease and nucleotide sequencing. Linearized plasmid DNAs were transcribed *in vitro* using the Riboprobe[®] System-SP6/T7 (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacture's instructions. Subsequently, the concentration of RNA transcripts was measured by using Quant-iT[™] assay (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacture's instructions and number of RNA molecules was calculated based on Avogadro's number as reported by Hoffmann et al. [5].

RT-PCR by monoplex and multiplex: Serial dilution of RNA standards were reverse transcribed into cDNA prior to PCR using random hexamers primer and SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacture's instructions. HA2 and HA1 primers specific to HAV were used for detection of VP3-VP1; and HE366 and HE363 primers specific to HEV were used for detection of ORF 2/3 (Table 1). In monoplex PCR, only a pair of primers was used to detect each virus. PCR was performed in 25 µl reaction volume. cDNA (2 µl) was added to PCR mixture (23 µl) consisting of 1x PCR buffer (^{Mg2+} free), 1.5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 0.4 µM sense primer, 0.4 µM antisense primer and 0.625 U of *TaKaRa Taq* (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan). The PCR conditions was performed at 94°C for 3 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for HAV at 30 sec or 58°C for HEV, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min. In multiplex PCR, the two pairs of specific primers for HAV and HEV were mixed in a PCR mixture. The HAV primer pair, DNA polymerase, PCR buffer, dNTPs and temperature cycling procedure used in the multiplex-PCR was the same as those used in the monoplex-PCR for HAV except that 0.6 µM of HE366 primer, 0.6 µM of HE363 primer and 1x Q solution (QIAGEN, Valencia, CA) were also added into the PCR mixture. Subsequently, amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The sizes of amplified products of HAV and HEV were 247 and 137 bp, respectively.

Table 1 Oligonucleotide primers used for construction of RNA standards and PCR amplification of HAV and HEV.

The use of primer	Viruses	Primers	Sequence (5'→3')	Regions	Product size (bp)	References
RNA standard	HAV	5'UTR	TGATACCTCACCCGCCGTTTGCC	5'UTR	3,316	This study
		VP1-2A	TCMARWGTCACACACTYCTRCC	Capsid		
	HEV	HE361	GCRGTGGTTTCTGGGGTGAC	ORF2/3	1,863	[7]
		HE-	CCCGRGTTTTACCYACCTTC	ORF2		
PCR amplification	HAV	HA2	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	Capsid (VP3-VP1)	247	[6]
		HA1	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG			
	HEV	HE366	GYTGATTCTCAGCCCTTCGC	ORF2/3	137	[7]
		HE363	GMYTGGTCDGCGCAAGHGGA			

* M = (A/C), R = (A/G), W = (A/T), Y = (C/T), D = (A/G/T), H = (A/C/T)

Results

Serially diluted RNA transcripts were amplified using RT-monoplex and multiplex PCR. The sensitivity of the multiplex PCR for HAV and HEV detection in one tube was found to be lower than that of individual monoplex PCR. The limit of detection with HA2-HA1 primers for HAV by multiplex and monoplex PCR was 40 copies/reaction (40,000 copies/ml) and at least 2.5 copies/reaction (2,500 copies/ml), respectively (Figure 1). The limit of detection with HE366-HE363 primers for HEV by multiplex and monoplex PCR was 20 copies/reaction (20,000 copies/ml) and 5 copies/reaction (5,000 copies/ml), respectively (Figure 2). The multiplex assay with simultaneous detection of HAV and HEV gave the PCR amplified products at 247 bp for HAV and at 137 bp for HEV (Figure 3).

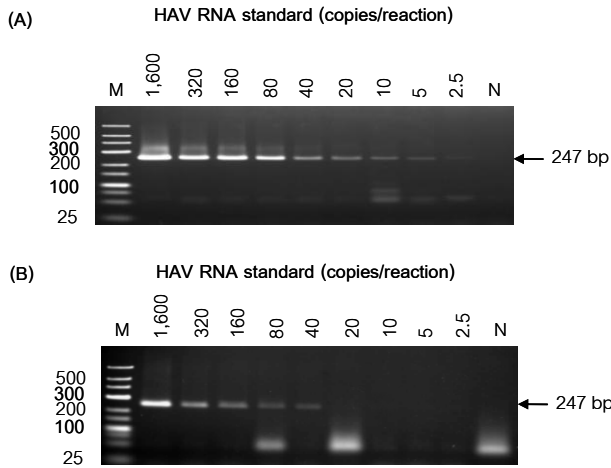


Figure 1 The limit of HAV detection using HA2-HA1 primers with serially diluted HAV RNA transcript by monoplex PCR (A) and multiplex PCR (B), lane M: marker 25 bp DNA ladder; lane N: negative control.

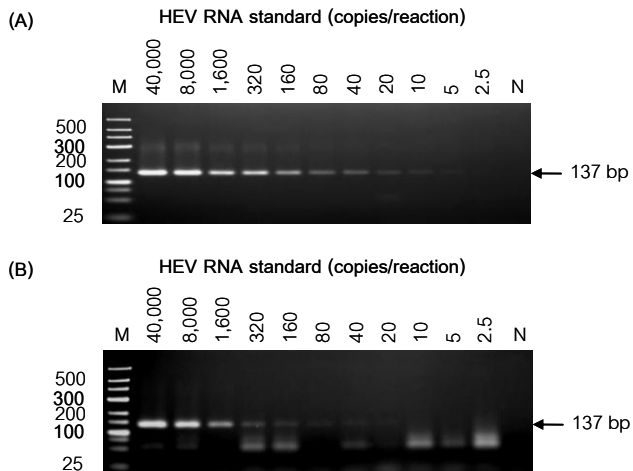


Figure 2 The limit of HEV detection using HE366-HE363 primers with serially diluted HEV RNA transcript by monoplex PCR (A) and multiplex PCR (B), lane M: marker 25 bp DNA ladder; lane N: negative control.

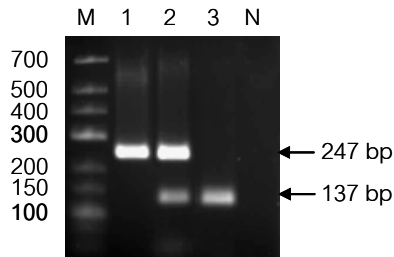


Figure 3 Multiplex PCR with RNA transcripts, amplicons of HAV and HEV at 247 bp and 137 bp, respectively, lane 1: HAV RNA transcript; lane 2: mixed HAV and HEV RNA transcripts; lane 3: HEV RNA transcript; lane M: marker 25 bp DNA ladder; lane N: negative control for PCR.

Discussion

Many factors might affect amplification efficiency in PCR assay such as primer dimers, concentration of primers, annealing temperature, extension temperature and other PCR components (buffer constituents, dNTPs, enzyme concentrations and PCR additives) [8,9]. The presence of more than one primer pair in the multiplex PCR increases the chance of obtaining nonspecific products more often than the target products, primarily because of the formation of primer dimers [10]. In the present study, the optimal primers of RT-multiplex PCR for HAV and HEV detection were selected at conserve regions of the genes encoding capsid protein of HAV and ORF2/3 overlapping region of HEV. Annealing temperature is generally considered the critical factor for the specificity and amplification efficiency of PCR [11]. From previous reports, PCR component additives including dimethyl sulfoxide, glycerol, bovine serum albumin, or betaine could be beneficial in multiplex PCR [8, 9, 12]. Although Q solution in this study was used as one of the additive substance to decrease nonspecific priming and found to be effective in reducing formation of primer dimers or other artifacts (data not shown), small amount of primer dimers still persisted.

In summary, the multiplex PCR assay was developed for simultaneous detection of HAV and HEV with a sensitivity 4-16 folds lower than monoplex PCR. Therefore, in the regard of the detection of minute amount of HAV and HEV in the environment, RT-PCR for HAV and HEV detection by monoplex PCR should be more effective.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Ompreya Suptawiwat, Miss. Achareeya Korkusol, Miss. Bussaba Srimee and all of the staffs in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for their technical assistances and some laboratory equipments provided. Moreover, this work could not be completed without supporting grants from the Department of Fisheries and the Siriraj Graduate Thesis Scholarship, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

References

1. Jothikumar N, Paulmurugan R, Padmanabhan P, Sundari RB, Kamatchiammal S, Rao KS. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples. *J Environ Monit* 2000;2:587-90.
2. Hadler SC, Webster HM, Erben JJ, Swanson JE, Maynard JE. Hepatitis A in day-care centers. A community-wide assessment. *N Engl J Med* 1980;302:1222-7.
3. Cristina J, Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res* 2007;127:151-7.
4. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007;127:216-28.
5. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirmeier H, Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 2005;130:36-44.

6. Cromeans TL, Nainan OV, Margolis HS. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:2460-3.
7. Inoue J, Takahashi M, Yazaki Y, Tsuda F, Okamoto H. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods* 2006;137:325-33.
8. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:559-70.
9. Wei T, Lu G, Clover GRG. A multiplex RT-PCR for the detection of Potato yellow vein virus, *Tobacco rattle virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in potato with a plant internal amplification control. *Plant Pathology* 2009;58:203-9.
10. Li XM, Huang Y, Song C, Zhao MP, Li YZ. Several concerns about the primer design in the universal molecular beacon real-time PCR assay and its application in HBV DNA detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007;388:979-85.
11. Ma ZH, Michailides TJ. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 2007;26:145-61.
12. Jackson R, Morris DJ, Cooper RJ, Bailey AS, Klapper PE, Cleator GM, et al. Multiplex polymerase chain reaction for adenovirus and herpes simplex virus in eye swabs. *J Virol Methods* 1996;56:41-8.

Utilization of red blood cells and microcentrifugation in the preparation of influenza A viral particles for electron microscopy

Pornpan Rojanasang¹, Kleophant Thakergpol², Naree Choosrichom², Witthawat Wiriyarat³, Kridsda Chaichoune³, Rassameepen Thonarknguen³, Phisanu Pooruk¹, Robert Webster⁴, Pilaipan Puthavathana¹, and Suda Louisirotchanakul¹

¹ *Departments of Microbiology and* ² *Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok,* ³ *Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhonpathom, Thailand,* ⁴ *and St. Jude Children Research Hospital, Tennessee, U.S.A.*

Abstract

Electron microscopy is a useful method for morphological characterization of viral particles. However, the standard method requires a high speed of ultracentrifuge to concentrate virus. Owing to the high biohazard risk of highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) H5N1, the virus should be processed under a strictly controlled condition. Herein, we design two simple methods for transmission electron microscopy of influenza virions by using the ability of red blood cells to adsorb influenza virus and using centrifugation by microcentrifuge. We performed electron microscopy of seasonal influenza virus, HPAI H5N1 and low pathogenic influenza virus by these preparation methods. The methods gave similar virion morphology as compared to standard viral preparations by ultracentrifugation.

Introduction

Influenza A virus carries two kinds of glycoprotein projections on its envelope: hemagglutinin (H) and neuraminidase (N). At least 16 H and 9 N lineages have been found in various host species, especially aquatic birds (1, 2). Various combinations of H and N gave rise to numerous viral subtypes, most of which are low pathogenic avian influenza (LPAI) virus. Some avian influenza viruses carrying H5 and H7 can cause severe disease in avian species and are considered as highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses (2, 3). H5N1 HPAI has caused widely spread epidemic in poultry and human and posed a serious pandemic threat. Influenza virions can be spherical, filamentous or pleomorphic, and various viral strains can vary markedly in their morphology and proportion of various forms (4, 5). Morphological characterization can provide some important insight into the viral biology, and comparative study of viral morphology by electron microscopy is needed (6, 7). For electron microscopy, ultracentrifugation is usually used for concentrating the virus. The ultracentrifugation is time-consuming and poses a biohazard risk to researchers. The eluting method of the viruses adsorbed onto red cells was previously reported (8). In order to prepare viruses for electron microscopy without ultracentrifugation step, we developed a simple method for concentrating the viruses by adsorbing them onto red blood cell surface. In addition, we also adapted the spinning method using a microcentrifuge for the concentration of viruses in this study. We would like to study their morphology and demonstrate the feasibility of these methods.

Materials and methods

The viruses

Human influenza viruses A/New Caledonia/20/1999(H1N1), H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses [A/Chicken/Thailand/

ICRC-VS195/2008 and A/Open-billed stork/Thailand/VSMU-32/2005] were kindly provided by Siriraj ICRC, Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital and Faculty of Veterinary Science, Mahidol University whereas low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses [A/Aquatic bird/Hong Kong/D125/2002 (H1N1), A/Duck/Jiangxi/6151/2003 (H5N3)] were provided by St. Jude Children Research Hospital, USA through Siriraj ICRC. The experiments on H5N1 HPAI from animal viruses were performed within BSL-3 Facility at Veterinary Science. Electron micrograph was taken under a transmission electron microscope, TEM (JEM-1230, JEOL Company, Tokyo, Japan) in the Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

Method

Virus preparation by centrifugation

In order to inactivate virus, influenza virus from culture fluid in this study was treated with 1% glutaraldehyde at 4°C overnight as previously described in tissue (9). The treated virus was concentrated with the standard method using ultra centrifuge (UC, Beckman coulter/Optima™ I-100XP) at 80,000 rpm for 2 hours (6, 10). In addition, the treated virus was also pelleted by spinning using a microcentrifuge (Hettich/MIKRO 22R) at 18,000 rpm for 90 min. Morphology of viruses in the pellet was demonstrated TEM using phosphotungstic acid (PTA) as the negative stain. Briefly, 3 ml of virus at 256 HA (Hemagglutination) unit was centrifuged in UC at 80,000 rpm for 2 hours. Subsequently, 10 µl of the virus suspension was adsorbed on a grid (SPI supplies, 200 meshes, West Chester, USA) coated with formvar-carbon for 1 minute; the excess virus suspension was drained off, followed by UV irradiation of both sides of the grid for 5 minutes. Subsequently, a drop of 1.6% PTA, pH 7.0 is then applied for 1 minute, and the excess was removed out prior to examining under a TEM.

Virus preparation by adsorption onto red blood cells

Influenza virus suspension was mixed with erythrocyte and thin section from this mixture was prepared in order to demonstrate the virus on surface of cells using uranyl acetate and lead citrate as positive staining. (7). The mixture of 1,500 μ l of virus suspension at 256 HA units and 500 μ l of 0.5% goose erythrocytes was incubated overnight at 4°C. In order to inactivate virus, this mixture was pre-fixed with 4% glutaraldehyde for 30 minutes at 4°C. After 3 times washing, post-fixation was followed with 2% osmium tetroxide for 30 minutes at room temperature. After 2 washes in distilled water, the cells were stained with 2% uranyl acetate aqueous solution for 20 minutes at room temperature. The stained sample was dehydrated in order of steps as follows: 70% ethyl alcohol for 90 seconds with 2 changes, 80% ethyl alcohol for 90 seconds with 2 changes, 90% ethyl alcohol for 3 minutes with 2 changes, 95% ethyl alcohol for 3 minutes with 3 changes, absolute ethanol for 3 minutes with 3 changes, and lastly with propylene washing for 3 minutes with 3 changes. Then, the stained sample was infiltrated with 50:50 mixture of propylene oxide and epoxy resin for 30 minutes at 37°C. Then, the mixture solution was replaced with epoxy resin solution alone and incubated for 120 minutes at 37°C. Finally, the sample was embedded in polypropylene capsules and polymerized in hot air oven at 70°C overnight followed by sectioning with ultra microtome. The ultra thin section was mounted onto copper support grid (SPI supplies, 200 meshes, West Chester, USA), then, nuclear stained with uranyl acetate for 30 minutes, and cytoplasmic stained with lead citrate for 15 minutes. The stained grid was examined under a TEM.

Result

Viral preparations by centrifugation of seasonal influenza virus H1N1, LPAI, and H5N1 HPAI showed similar virion morphology. Most of the virions were spherical (diameter 80-120 nm) (90%), large spherical (diameter > 120 nm) (8%), some showed rod (length 120-300 nm) (1-2%) or filamentous morphology (length >300 nm) (0-1%). A representative micrograph of influenza A/Siriraj/07/00 (H1N1) is shown in Fig. 1. Without the ultracentrifugation, virions were difficult to observe by TEM when the concentration of virus stocks was less than 256 HA unit/50 μ l. Using the same virus stocks pre-adsorbed onto red blood cells, virions could be easily observed. On average, 7 to 10 virions could be observed on each red blood cell. The morphology of virions on red blood cells was similar to that of virions prepared by UC (Fig. 2). The proportion of different forms of virions was also comparable these preparation methods (data not shown). This suggests that all forms of virions were similar in their binding affinity to red blood cell surface.

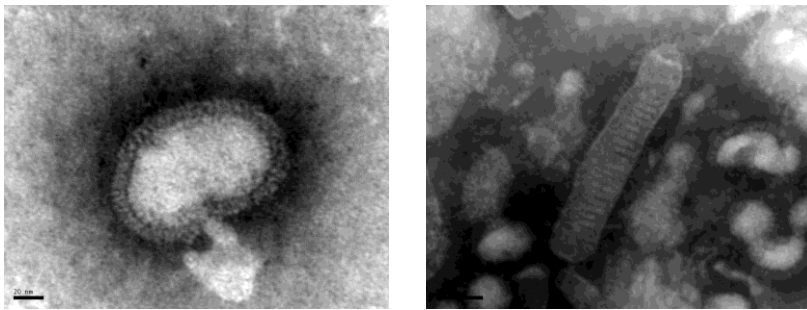


Figure 1 Electron micrographs of A/Siriraj07/00 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99-like virus) virions prepared by ultracentrifugation. Original magnification = 400,000X and 200,000X with bar = 20 and 50 nm in respectively.

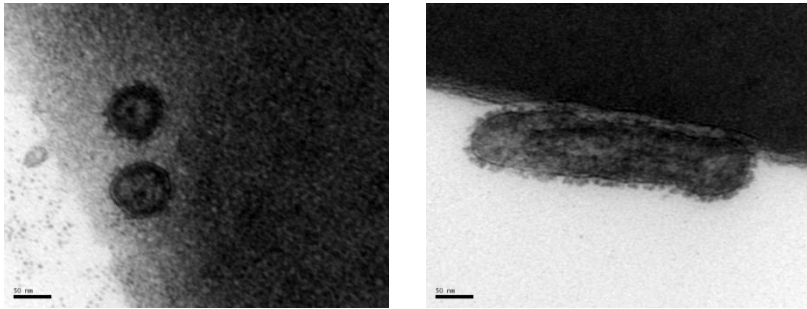


Figure 2 Electron micrograph of A/Siriraj07/00 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99-like virus) virions adsorbed onto red blood cell surface. Original magnification = 200,000X with bar =50 nm.

Discussion

The concentrating method can be used for detecting small amount of the virus in large volume of water (11). Concentrating influenza virus by adsorbing onto red blood cells and followed by eluting virus was previously demonstrated (8). This eluting method in virus preparation was not succeeded in this study. This might be due to the amount of virus stock. By the direct observation of virus morphology from the adsorption onto red blood cell surface, we could demonstrate the feasibility of this concentrating method for electron microscopy and show that this method did not affect virion morphology. The localization on red blood cell surface also makes the virions easy to be found, since red blood cell surface is usually smooth and devoid of any protruding structure, and any irregularity on the smooth surface can be easily identified. Therefore, this method is one of the suitable for morphological study of influenza virus. Herein, we also adapted the preparation of virus concentration by centrifugation method. Since the microcentrifuge is available in most of the molecular laboratory, the machine can be done for the biohazard risk within biosafety level 3 instead of using a complicated UC. The amount of

proportion virus and the virus morphology with this spinning with a microcentrifuge was comparable with the standard method. Our concentrating methods for preparation of influenza A viral particles for electron microscopy were simple and could be applied to laboratories with limiting resources since an ultracentrifuge is a very expensive equipment.

Acknowledgements

This study was supported by Thailand Research Fund through a Senior Research Scholar grant of Prof. Pilaipan Puthavathana, Siriraj Graduate Thesis Scholarship, Mahidol University Research Grant and Srinakharinwirot University.

References

1. Mubareka S, Palese P. Influenza virus: The biology of a changing virus. In: Rappuoli R, Del Giudice G, editors. Influenza vaccines for the future. Birkhäuser: Berlin; 2008. p. 9-30.
2. Sandrock C, Kelly T. Clinical review: update of avian influenza A infections in humans. *Crit care* 2007; 11: 209.
3. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 463-8.
4. Stevenson JP, Biddle F. Pleomorphism of influenza virus particles under the electron microscope. *Nature* 1966; 212: 619-21.
5. Lamb RA, Choppin PW. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 467-506.
6. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 294-303.
7. Thakerngpol K, Stitnimankarn T. The role of electron microscopy in viral diagnosis. *Siriraj Hosp Gaz* 2003; 55: 459-62.

8. Hirst GK. Absorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells. *J Exp Med* 1942; 76: 195-209.
9. Sabel FL, Hellman A, McDade JJ. Glutaraldehyde inactivation of virus in tissue. *Appl Microbiol* 1969;17:645-6
10. Hayat MA, Miller SE. Negative staining. New York: Mcraw-Hill Publishing; 1990.
11. Khalenkov A, Laver WG, Webster RG. Detection and isolation of H5N1 influenza virus from large volumes of natural water. *J Virol Methods* 2008; 149: 180-3.

**บทคัดย่อผลงานวิจัยของสมาชิก
ที่เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ
ระหว่าง เดือน พ.ย. 51- ต.ค. 52**

The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16.

Wanram S, Limpai boon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Guiney DG, Lulitanond V, Jearanaikoon P.

OBJECTIVE: The purpose of this study was to assess the effectiveness of the use of human papillomavirus type 16 (HPV16) physical status and viral load in combination to predict clinical outcome during cervical development. **STUDY DESIGN:** A follow-up study was monitored in association with HPV integration and viral load in 121 cervical samples with the use of multiplex quantitative polymerase chain reaction. **RESULTS:** A significant increase of viral load was found earlier from preinvasive to invasive groups compared with normal groups, except with clinical staging and clinical outcome. High occurrence of integrated HPV16 was observed in preinvasive (27/44 samples) and invasive cervical carcinoma (40/68 samples). Cervical progression was observed significantly in most preinvasive (18/27 samples) and invasive cases (25/40 samples) that were infected with integrated HPV. Integrated HPV16 with significant viral load can be used as a predictive marker for tumor progression in the early stage of invasive cervical carcinoma. **CONCLUSION:** Integrated HPV16 in combination with viral load is a predictive indicator for tumor progression in early invasive stage but not in preinvasive and advanced invasive stage.

[Am J Obstet Gynecol. 2009 Jul;201(1):79.e1-7.]

Patterns of managing chronic hepatitis B treatment-related drug resistance: a survey of physicians in Mainland China, South Korea, Taiwan, and Thailand.

Chainuvati S, Cheng J, Hou JL, Hsu CW, Jia JD, Komolmit P, Kwon SY, Lee CH, Li H, Li Y, Liu CJ, Neo BL, Peng CY, Tanwandee T, Wongcharatrawee S, Wu JC, Yu ML, Zhang XX.

PURPOSE: The emergence of antiviral resistance can negate the benefits of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B (CHB). This study aimed to assess how physicians in Asia manage suspected antiviral resistance. **METHODS:** Randomly selected CHB-treating physicians in Mainland China, South Korea, Taiwan, and Thailand underwent a face-to-face interview. A standardized questionnaire was used to assess how physicians identify, monitor, and manage suspected resistance and its associated medical costs. **RESULTS:** We interviewed 575 physicians from January to May 2008. Most physicians preferred a "prevention-of-antiviral resistance" strategy over a "rescue-once-resistance-develops" strategy. Physicians had encountered lamivudine resistance most frequently (96-100% of respondents), followed by the resistance to adefovir (18-58%) and entecavir (3-7%). While physicians in South Korea and Taiwan have access to resistance testing, physicians in Mainland China and Thailand have limited access to resistance testing but rely on HBV DNA and alanine aminotransferase (ALT) tests to identify resistance. Once resistance is suspected, 60% of the physicians in Mainland China, South Korea, and Thailand monitored these patients quarterly and the remaining 40% opted for monthly follow-up. In comparison, 70% of the Taiwanese physicians monitored these patients monthly. The average total direct medical costs, excluding antiviral costs, to manage a patient during the first year after suspected resistance is identified ranged from USD \$319 to USD \$709. **CONCLUSIONS:** Limited access to HBV resistance tests causes

physicians in Asia to manage suspected resistance by various HBV DNA assays and ALT tests. This raises concerns that resistance may not be detected early enough to be rescued efficiently.

[Hepatol Int 2009 Jun 24.]

In Vitro Recombination of Japanese Encephalitis Virus

Tangkananond W, Collett J, Shaw J, Williams D, Stewart JP, Solomon T.

Abstract: Across Asia there are at least four, and possible five genotypes of *Japanese encephalitis virus* (JEV). Genotype III is the most widely distributed, being found in tropical and temperate regions. Data on JEV recombination show that all recombinants so far identified involve a genotype III parental strain. Whether the ability to form recombinants is involved on the explanation of JEV genotype III's wider distribution is not clear. To begin investigating the factors involved in recombination, an in vitro system was developed and created recombinants.

One recombinant JKT9092 (genotype IV) and its parents JKT27-085 (genotype III) and JKT7003 (genotype IV) were twice reisolated and co infected on BHK21 and C6/36 cells separately. The molecular genetics of 96 JEV isolates from both cell lines were analysed as follows: extraction of viral RNA, reverse transcription, polymerase chain reaction (PCR), agarose gel electrophoresis, extraction of PCR product from gel, DNA ligation into vector, vector/DNA (plasmid) transformation into E.coli, plasmid extraction, restriction digest to confirm inserted and amplified cDNA, steps to create a phylogenetic tree and analyse recombinant.

98-100% (genotype III) of the JEV isolates from both cell lines was detected in this recombination. One (2%) putative recombinant (genotype IV) isolated from BHK21 was further characterised. These results have significance for JEV vaccine development or JEV control programmes in the future, especially in Thailand.

[Samaggi Annual Academic Review 2008,

<http://www.samaggiconference.com/>, Page iv and 153-78.]

Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber

Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S,
Hansasuta P, Bhattarakosol P

Human papillomavirus (HPV) plays important role in developing several types of cancer especially cervical cancer. In order to understand the viral pathogenesis, the animal model of HPV infection is very necessary. This communication reports establishment of an animal model carrying implanted HeLa cells, a human cervical cancer cell line via dorsal skinfold window chambers. Nude mice were divided into 4 groups; each group contained different amount of HeLa cells, 2.5×10^5 , 5×10^5 , and 1×10^6 cells, and cell free medium (control), respectively. The results showed that even using the low number of HeLa cells (2.5×10^5), the tumor microvasculature was developed at 2 weeks after implantation with the enlarged tumor margin which then progressed to tumor mass in the following week. The existing tumor was confirmed to be HeLa-cell type by PCR, in situ hybridization, and HPV genotyping. By using linear regression analysis, it indicated that means of tumor size from each group significantly increased in relation to number of HeLa cells used ($R^2 = 0.98$, $y = 0.1171x + 4.35$). This mouse model will be useful for the further HPV studies particularly anti-cancer drugs efficacy.

[Indian J Exp Biol 2009 May;47(5):327-32]

HLA-Cw*04 allele associated with nevirapine-induced rash in HIV-infected Thai patients

Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S,
Prasithsirikul W, Tunthanathip P, Nakayama EE, Shioda T.

BACKGROUND: A high incidence of rash has been reported in HIV-1 patients who received the anti-retroviral drug nevirapine. In addition, several studies have suggested that polymorphisms of human leukocyte antigen (*HLA*) genes may play important roles in nevirapine-induced rash. The aim of the present study was to evaluate the effects of different *HLA-C* alleles on rash associated with nevirapine in patients who started highly active anti-retroviral therapy (HAART) containing nevirapine in Thailand.

RESULTS: A case-control study was carried out involving HIV-1 patients under treatment at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Nonthaburi, Thailand between March 2007 and March 2008. The study included all HIV/AIDS patients being treated with nevirapine-containing regimens. The study population comprised 287 HIV/AIDS patients of whom 248 were nevirapine-tolerant and 39 developed rash after nevirapine treatment. From the nevirapine-tolerant patients, 60 were selected as the control group on the basis of age, sex, and therapy history matched for nevirapine-induced rash cases. We observed significantly more *HLA-Cw*04* alleles in nevirapine-induced rash cases than in nevirapine-tolerant group, with frequencies of 20.51% and 7.50%, respectively ($P=0.009$). There were no significant differences between the rash and tolerant groups for other *HLA-C* alleles except for *HLA-Cw*03* ($P=0.015$).

CONCLUSION: This study suggests that *HLA-Cw*04* is associated with rash in nevirapine treated Thais. Future screening of patients' *HLA* may reduce the number of nevirapine-induced rash cases, and patients with alleles associated with nevirapine-induced rash should be started on anti-retroviral therapy without nevirapine.

[*AIDS Res Ther* 2009 Oct 21;6(1):22.]

**One-year experience of nucleic acid technology testing for
human immunodeficiency virus type 1, hepatitis C virus,
and hepatitis B virus in Thai blood donations.**

Phikulsod S, Oota S, Tirawatnpong T, Sakuldamrongpanich T,
Chalermchan W, Louisirirothanakul S, Tanprasert S, Chongkolwatana V,
Kitpoka P, Phanuphak P, Wasi C, Nuchprayoon C;

BACKGROUND: Blood donations collected at the National Blood Center, the Thai Red Cross Society, Bangkok, in 2007 were tested by nucleic acid amplification technology (NAT) using the Chiron TIGRIS/Procleix Ultrio test and the Roche cobas s 201/cobas TaqScreen multiplex (MPX) test.

STUDY DESIGN AND METHODS: The sensitivity, specificity, and robustness were determined by testing 486,676 seronegative blood donations. Samples from each day of collection were divided into two sets; the odd-numbered samples were tested individually on the TIGRIS and the even-numbered samples were tested in pools of 6 on the cobas s 201. The status of reactive samples was confirmed by duplicate testing of samples from the plasma bag to calculate the test specificity. Reactive samples were tested on the alternate system and followed up.

RESULTS: The analytical sensitivity of both systems met the 95% limits of detection claimed by the respective package inserts. No cross contamination was seen with either system. Test specificity was 99.93 and 99.90% for the Procleix Ultrio and cobas TaqScreen tests, respectively. The NAT yield rates for human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1), hepatitis C virus (HCV), and hepatitis B virus (HBV) were 1:97,000, 1:490,000, and 1:2800, respectively. Several occult HBV donors, the majority of whom were detected by both tests, were also identified. The HIV-1 and HCV window cases were detected with both tests.

CONCLUSION: The performances of the systems and tests indicated that both were acceptable for routine NAT by the National Blood Center, the Thai Red Cross Society. However, the Procleix Ultrio test appeared to be less sensitive than the cobas TaqScreen test for HBV.

[Transfusion 2009 Jun;49(6):1126-35.]

Molecular genetic relationship of the 3'untranslated region among Thai dengue-3 virus, Bangkok isolates, during 1973–2000

Pankhong P, Weiner DB , Mathura P, Anathan R, Nisalak A,
Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Attatippaholkun W.

Dengue virus serotype 3 (DENV-3) was associated with severe dengue epidemics in Thailand during 1973–1999. We studied Thai DENV-3 viruses isolated from hospitalized children in Bangkok with differing disease severity during that period. Viruses were sequenced at their 5' and 3' untranslated regions (UTRs), which are regions that play a pivotal role in viral replication. Our results indicated that the primary sequences as well as the secondary structures at both ends of Thai DENV-3 viruses were highly conserved over almost three decades. We found nucleotide insertions and deletions at the variable region (VR) that is located just downstream of the nonstructural protein 5 (NS5) stop codon among these viruses. The phylogenetic tree derived from the size heterogeneity of VR in the 3' UTR divided DENV-3 into four genotypes, and Thai DENV-3 viruses in this study belonged to genotype II. The replication efficiency of the candidate viruses with different lengths at the VR were assessed in the mosquito C6-36 and human (HepG2) cell lines. Our results show that the viruses with nucleotide insertions at VR replicated better than the virus that contained deletions. Our findings indicate that Thai DENV-3 demonstrated a remarkable conservation of nucleotides over 28 years. Correlation with disease severity suggests that both primary sequences and secondary structures of the 3' UTR do not appear correlated with disease severity in humans.

[DNA AND Cell Biol 2009;28(10):481-91]

Highlights from the October 2009 Issue of DNA and cell biology

Pankhong P, Weiner DB, Anathan R, Nisalak A, Kalayanaroj S,
Nimmannitya S, Attatippaholkun W.

Dengue is a mosquito-borne viral infection affecting millions of people each year. Most often, these infections take the form of dengue fever. However, for reasons that are unclear, some infections progress to cause significant morbidity. There are no therapeutics or vaccines for dengue. It is against this backdrop that Pankhong and coworkers sequenced the 5' and 3' untranslated regions from a collection of dengue virus serotype 3 isolates, which were associated with severe disease epidemics in Thailand (Pankhong et al. , 2009).

Pankhong et al. present their findings in this month's DNA and Cell Biology in the article "Molecular Genetic Relationship of the 3' Untranslated Region Among Thai Dengue-3 Virus, Bangkok Isolates, During 1973–2000." They found little variation in the primary sequence or secondary structure of the 5' and 3' untranslated regions of these viruses except for the variable region of the 3' untranslated region. Pankhong and colleagues created a phylogenetic tree grouping these isolates based on nucleotide insertions or deletions in the variable region. Replication of representative viruses from each clade were compared in human and mosquito cell lines. Although replication rate did not seem to correlate with virus strain characteristics, such as the severity of the resulting disease, the strain collection, sequence data, and replication information assembled in this article may prove to be a valuable step toward unlocking the mysteries of this pathogen.

[DNA AND Cell Biol 2009;28(10):479]

Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients.

Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C,
Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Chokephaibulkit K, Perng GC.

Though thrombocytopenia or dysfunction of platelets is common in dengue virus infection, the role of platelets has not been established. We enrolled 33 hospitalized children with serologically confirmed dengue virus infection. Blood specimens were collected during hospitalization. Platelets and plasma were isolated from the whole blood. Detection of dengue virus in plasma and platelets was carried out by RT-PCR with primers that can differentiate different dengue serotypes simultaneously, and by electron transmission microscopy (EM). Dengue viral RNA was detected in the platelets and plasma by conventional RT-PCR. A significantly higher percentage of dengue viral RNA was detected in platelets than in plasma ($p = 0.03$). Platelets isolated 5 days after onset of fever were most likely positive for viral RNA. Concurrent infection or co-circulation with multiple dengue serotypes was observed in 12% of patients. Infrequently, negative-stranded dengue viral RNA was detected in platelets and in plasma. Importantly, EM confirmed the presence of dengue viral-like particles inside platelets prepared from dengue patients. Our findings suggest the presence of dengue virus in platelets may be associated with the dysfunction of platelets observed in dengue patients.

[Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 2009 Mar;40(2):253-62.]

Furious and paralytic rabies of canine origin: Neuroimaging with virological and cytokine studies

Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlerdacha B,
Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P,
Asavaphatiboon S, Worapruekjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N,
Lafon M, Wilde H, Hemachudha T.

Furious and paralytic rabies differ in clinical manifestations and survival periods. The authors studied magnetic resonance imaging (MRI) and cytokine and virus distribution in rabies-infected dogs of both clinical types. MRI examination of the brain and upper spinal cord was performed in two furious and two paralytic dogs during the early clinical stage. Rabies viral nucleoprotein RNA and 18 cytokine mRNAs at 12 different brain regions were studied. Rabies viral RNA was examined in four furious and four paralytic dogs during the early stage, and in one each during the late stage. Cytokine mRNAs were examined in two furious and two paralytic dogs during the early stage and in one each during the late stage. Larger quantities of rabies viral RNA were found in the brains of furious than in paralytic dogs. Interleukin-1 β and interferon- γ mRNAs were found exclusively in the brains of paralytic dogs during the early stage. Abnormal hypersignal T2 changes were found at hippocampus, hypothalamus, brainstem, and spinal cord of paralytic dogs. More widespread changes of less intensity were seen in furious dog brains. During the late stage of infection, brains from furious and paralytic rabid dogs were similarly infected and there were less detectable cytokine mRNAs. These results suggest that the early stage of furious dog rabies is characterized by a moderate inflammation (as indicated by MRI lesions and brain cytokine detection) and a severe virus neuroinvasiveness. Paralytic rabies is characterized by delayed viral neuroinvasion and a more intense inflammation than furious rabies. Dogs may be a good model for study of the host inflammatory responses that may modulate rabies virus neuroinvasiveness.

[*J NeuroVirol* 2008;14: 119–29, ISSN: 1355-0284]

Inhibition of rabies virus replication by Multiple Artificial MicroRNAs

Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N,
Khawplod P, Hemachudha T.

The RNA interference (RNAi) technology has been recognized as a promising antiviral therapy for a few years. One of the potential limitations for applying this technology against wild type rabies virus is its high rate of genetic variation. Recently, an RNAi vector system that incorporated modified dsRNA within microRNA structure [or artificial miRNAs (amiRNAs)] has been described. This allowed expression of multiple amiRNAs of single or multiple targets from a single construct. In this study, we evaluated a benefit of using amiRNA vector against different rabies strains. We found that applying single targeting amiRNA against challenged rabies virus standard (CVS) rabies nucleocapsid (N) mRNA resulted in more than 90% reduction of viral genome in Neuro2A cells up to 72 hours after infection. Multiple amiRNAs aiming at single or multiple NmRNA target(s) yielded comparable inhibitory results as with a single amiRNA against perfectly matched target. Although the level of each mature miRNA generated from multiple amiRNA construct was slightly reduced as assessed by stem-loop RT and real-time PCR techniques, its effectiveness remained unchanged even when an ineffective or scrambled amiRNA was also included in the transcript. Against highly pathogenic wild type virus, single amiRNA construct activity was reduced when mismatching with target sequence occurred at critical site whereas multiple targeting amiRNA construct remained highly effective. Our results suggest the benefit of using multiple targeting amiRNAs when confronting with wild type rabies virus, the sequence of which is not completely known.

[To appear in: Antiviral Research Received date: 13-5-2009

Revised date: 18-7-2009 Accepted date: 21-7-2009

PII: S0166-3542(09)00390-8 DOI: doi:10.1016/j.antiviral.2009.07.012]

HIV-1 neutralization by monoclonal antibody against conserved region 2 and patterns of epitope exposure on the surface of native viruses.

Sreepian A, Permmongkol J, Kantakamalakul W, Siritantikorn S,
Tanlieng N, Sutthent R.

BACKGROUND: Conserved neutralizing epitopes are considered to be a key role for eliciting broadly neutralizing antibody (NAb). Previously, two conserved neutralizing epitopes of HIV-1 CRF01_AE envelope were identified at amino acid 93-112 of the C1 (C1E) and at 218-239 of the C2 (C2E) regions. To access the potency of antibody directed against conserved epitopes, a monoclonal antibody (MAb) specific to the C2E region was developed and characterized. **METHODS:** The immunogenicity of two epitopes was examined by immunizing BALB/c mice with the matching synthetic peptides. One MAb, C2EB5, directed against peptide C2E, was generated by conventional methods, while C1E1 and C1E2 peptides induced slight antibody response in mice. The neutralizing activity of MAb C2EB5 was examined using a peripheral blood mononuclear cell (PBMC) based method and various HIV-1 subtypes including A, B, C, D, and CRF01_AE; C2EB5 was compared with other known neutralizing MAbs (4E10, 447-52D) and with sCD4. The exposure of the C2 epitope on native virus was investigated using virus capture by these MAbs. **RESULTS:** The MAb C2EB5 demonstrated cross-neutralization against various HIV-1 subtypes. The overall potency of MAb C2EB5 against 5 subtypes was ranked in the following order: subtype C > CRF01_AE > subtype D > subtype A > subtype B. The epitope exposure for MAb C2EB5 was also correlated with the neutralization properties of each subtype. **CONCLUSIONS:** This study demonstrates the cross-clade neutralizing activity of a MAb directed against an epitope located in the C2 region of the HIV-1 env and highlights differences in the exposure of antigenic epitopes on the surface of various HIV-1 subtypes. The epitope for this newly identified neutralizing MAb made against a subtype CRF01_AE peptide is particularly exposed in subtype C viral isolates.

[J Immune Based Ther Vaccines 2009 Oct 12;7(1):5.]

Stable expression of EBV-gp350 on the surface of NC37 cells confers natural killer(NK)-cell susceptibility or resistance, depending on the assay used to assess NK-mediated function.

Sumonwiriya M, Horhthongkham N, Pattanapanyasat K, Ampol S,
Sutthent R, Kantakamalakul W.

NC37 cells containing the Epstein-Barr virus (EBV) genome do not express the viral glycoprotein-350 (gp350) on the cell surface. Despite being a cancer cell line, NC37 cells show resistance to natural killer (NK) cell cytotoxicity by the standard chromium ((⁵¹)Cr) release assay (CRA). EBV-gp350 has been identified as a ligand for antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The stable expression of gp350 on the NC37 cell surface membrane could make this cell line a suitable target for measuring ADCC antibody. The pcDNA3.1-gp350 was transfected into the stably expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP)-NC37 cell line. The transfected cells were then selected for expression of gp350 on the cell surface using immunomagnetic bead-based sorting. The gp350-EGFP-NC37 cell line was then re-examined for resistance to NK cytotoxicity, and compared with the standard K562 and EGFP-K562 cell lines using the CRA and a flow cytometric method, respectively. Surprisingly, the gp350-EGFP-NC37 cells, like the parental NC37 cell line, showed comparable resistance to NK cell-mediated cytotoxic activity by the CRA, while demonstrating susceptibility to NK cell cytotoxicity comparable to EGFP expressing K562 cells by the flow cytometric method. The susceptibility of gp350-EGFP-NC37 cells to NK cell cytotoxic activity is dependent on the type of assay

[J Virol Methods 2009 Oct 161(1):154-60.]

HIV-1 subtype B *Tat* gene activities and disease progression in HIV-1 CRF01_AE infection.

Niyasom C, Horthongkham N, Sreephiang A, Kantakamalaku W,
Louisirirotchanaku S, Chuenchitra T, Sutthent R.

HIV-1 *tat* gene function and immunogenicity of HIV-1 Tat protein from 3 low (PS01, PS40, PS58) and 3 high (PS19, PS65, LP22) viral load infected, untreated and asymptomatic individuals from Thailand were compared. Levels of Tat-dependent chloramphenicol acetyltransferase (CAT) induced in HL3T1 cells with *tat1* gene from HIV-1 isolates of high viral load group was significantly higher than those from low viral load group. HIV-1 subtype determination using env (C2-V4) gene demonstrated that 2/3 (PS01 and PS40) and 1/3 (PS58) from low viral load group were CRF01_AE and subtype B, while all 3 HIV-1 isolates from high viral load group were CRF01_AE. However, all 3 HIV-1 *tat* nucleotide sequences from low viral load group, which contained env CRF01_AE sequence, belonged to subtype B whereas all those from high viral load group contained CRF01_AE sequence. HIV Tat recombinant proteins from these groups were tested for immunogenicity in mice. All recombinant Tat proteins (except from PS58) were immunogenic in a dose-dependent manner, but with significant differences of the immunogenicity levels between high and low viral load groups. These results indicated that HIV-1 subtype B *tat* gene activities might be associated with reduced disease progression of HIV-1 CRF01_AE infected individuals.

[*Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 2009 Jul;40(4):748-58.]

Characteristics of Gp120 Envelope and Predicted Coreceptor Usage of HIV-1 Subtype CRF01_AE Infected Individuals with Different Rates of Disease Progression in the North of Thailand

Chuenchitra T, Dettrairat S, Ruangpung A, Chaitaveep P,
Sukwit S, Viputtikul K, Tabprasit S, Srisurapanon S, Kohrianudom S,
Sutthent R, Sirisopana N, Nitayaphan S.

BACKGROUND: Understanding sequence characteristics of gp120 envelope and coreceptor usage of HIV-1 infected individuals with different rate of disease progression are important in facilitating the development of AIDS vaccine and treatment. This study analyzed envelope gene and predicted coreceptor usage of HIV-1 subtype CRF01_AE infected individuals with different rates of disease progression in the North of Thailand.

METHODS: The sequences of the V1-V5 region of the HIV-1 envelope gene from forty four HIV-1 subtype CRF01_AE infected Thais were analyzed. Twenty four are progressors (PRs; symptomatic or AIDS within 5 years and CD4+ < 200/mm³) and twenty are slower progressors (SPs; asymptomatic more than 5 years and CD4+ >350/mm³). The V1-V5 regions were DNA amplified by nested PCR and sequenced directly from the whole blood of HIV-1 infected individuals. Coreceptor usage was predicted using online tool HIV-1 PhenoPred.

RESULTS: The median CD4+ counts of PRs and SPs are 66 and 510/mm³, respectively. The Envelope sequence analysis showed that V3 motif of SPs were dramatically dominated by GPGQ (16/20) but by GPGQ (14/24) and GPGR (11/24) in PRs. Interestingly, an extra disulfide bridge in the V4 region was found in 38.6% (17/44) of HIV-1 subtype CRF01_AE infected individuals. No significant of V4 loop lengths between PRs and SPs was found. The predicted coreceptor usage demonstrated, 14 viruses used CCR5 (58.3%), 8 used CXCR4 (33.3%) and 2 used both CCR5 and CXCR4 (8.3%) among the 24 PRs. In 20 SPs, 15 viruses used CCR5

(75%), 1 used CXCR4 (5%), and 4 used both CCR5 and CXCR4 (20%).

CONCLUSION: These findings show that most of V3 motif of HIV-1 CRF01_AE in SPs are GPGQ and the predicted coreceptor usage is CCR5. However, most viruses in PRs were R5 and X4. Thus, our results may provide valuable information on CCR5 antagonists therapy and AIDS vaccine development.

[5th IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Cape Town, South Africa, 18-22 July 2009, Abstract no. TUPEA060]

HIV-1 incidence estimates among young Thai men using IgG-Capture BED-Enzyme Immunoassay (BED-CEIA) during 2005 – 2008

Kana K, Tabprasit S, Chuenchitra T, Sirisopana N, Rangsin R,

BACKGROUND: Knowledge about the most recent HIV epidemic among young generation of Thailand is crucial for improving the prevention programs. It is important to distinguish between recent and long-term HIV-1 infections among the sero-surveillance populations to estimate the HIV-1 incidence.

OBJECTIVE: To obtain the HIV-1 incidence estimates in young Thai men from the HIV-1 sero-surveillance among the Royal Thai Army (RTA) conscripts induced between November 2005 and November 2006.

MATERIAL AND METHODS: The confirmed HIV-1 positive serum samples obtained from the November 2005, May 2006, and November 2006 rounds of RTA conscripts induction were selected to be included in the study. The recent HIV-1 infections were detected among the confirmed HIV-1 positive serum samples using an HIV-1 BED incidence EIA kit (Calypte HIV-1 Incidence EIA, Calypte Biomedical Corporation, Maryland, USA). The incidence estimates were obtained in each round to the induction using a consensus formula was agreed upon at the US Centers for Disease Controls and Preventions (CDC).

RESULTS: Eighty seven thousand one hundred seventy eight RTA conscripts were tested for HIV-1 infection between November 2005 and November 2006. The prevalence of HIV-1 infection was 0.51%, 0.60%, and 0.50% for the period of November 2005, May 2006, and November 2006, respectively. The HIV-1 incidence estimates were 0.14% year (95% CI, 0.09-0.20), 0.20% year (95% CI, 0.13-0.28), and 0.17% year (95% CI, 0.10-0.29) in November 2005, May 2006, and November 2006, respectively.

CONCLUSION: We reported the HIV-1 incidence estimates obtained from the IgG-capture BED-enzyme immunoassay (BED-CEIA) method in the RTA conscripts sero-surveillance population. The incidence estimates were ranging from 0.14% - 0.20%/year between November 2005 and November 2006. The estimates could serve as the recent basement information for the future HIV prevention interventions in Thailand.

[J Med Assoc Thai 2009; 92 (Suppl1): S112-6]

Novel anti-dengue monoclonal antibody recognizing conformational structure of prM-E heterodimeric complex of dengue virus

Puttikhunt C, Keelapang P, Khemnu N, Sittisombut N, Kasinrerak W, Malasit P

An interaction between the premembrane (prM) and envelope (E) glycoproteins as prM-E heterodimer is required for proper folding and transport of E during the formation and release of new flaviviral progeny. More evidence, however, is needed to confirm this interaction of prM and E during dengue virus replication. In this study, 2E11, a mouse monoclonal antibody (Mab) that specifically recognizes dengue prM-E heterodimeric complex in either intracellular or secreted dengue virions, was generated and characterized. In immunofluorescence and immunopull down assays, the Mab 2E11 recognized an epitope present in 293T transfectants that coexpressed prM and the full-length form of E in cis and in trans, but it failed to react with prM or E protein expressed individually. The reactivity of Mab2E11 was diminished in transfected cells that coexpress prM together with a truncated form of E lacking the 84-residue stretch at the C-terminal transmembrane region, presumably essential for prM and E interaction. The Mab2E11 described in this study is a novel Mab with a unique capability in detecting the conformational structure of prME heterodimeric complex of dengue virus. It will be a new biological tool for identification and characterization of dengue prM-E heterodimer as well as virus maturation and export.

[J Med Virol 2008; 80: 125-33]

Production and characterization of anti-dengue capsid antibodies suggesting the N terminus region covering the first 20 amino acids of dengue virus capsid protein is predominantly immunogenic in mice

Puttikhunt C, Ong-ajchaowlerd P, Prommool T, Sangiambut S, Netsawang J, Limjindaporn T, Malasit P, Kasinrerak W.

We produced monoclonal and polyclonal antibodies to the capsid (C) protein of dengue serotype 2 virus (DV2 C). First, a maltose-binding protein fused to DV2 C protein (MBP-C) was overproduced in *E. coli*. The affinity-purified MBP-C protein was cleaved by factor Xa protease to obtain a recombinant DV2 C protein, which was then used for mouse immunizations. Two hybridoma cell lines producing anti-C Mabs as well as anti-C polyclonal antibody were successfully generated and characterized. Interestingly, all of the generated antibodies specifically recognized the first 20 amino acids of the DV2 C protein, as determined by peptide epitope mapping and via a recombinant DV2 C protein in which this region was deleted. The results suggested that this region is predominantly immunogenic in mice.

[Arch Virol 2009;154: 1211-21]

Kinetics and longevity of antibody response to influenza A H5N1 virus infection in humans

Kitphati R, Pooruk P, Lerdsamran H, Poosuwan S,
Louisirootchanakul S, Aewarakul P, Chokphaibulkit K,
Noisumdaeng P, Sawanpanyalert P, Puthavathana P.

Anti-H5N1 antibody was determined by microneutralization, hemagglutination inhibition, and Western blotting assays in serial blood samples collected from eight Thai patients, including four fatal cases and four survivors. The antibody was detected as early as 5 days and, typically, with an increase in titer in paired blood at about 15 days after disease onset. The anti-H5 antibody response was long-lasting, for almost 5 years in cases which can be followed that far. In addition, cross-neutralizing activity to related clade 1 viruses was observed.

[Clin Vaccine Immunol 2009;16:978-81]

Double-stranded RNA adenosine deaminases enhance expression of human immunodeficiency virus type 1 proteins.

Phuphuakrat A, Kraiwong R, Boonarkart C, Lauhakirti D,
Lee TH, Auewarakul P.

ADARs (adenosine deaminases that act on double-stranded RNA) are RNA editing enzymes that catalyze a change from adenosine to inosine, which is then recognized as guanosine by translational machinery. We demonstrate here that overexpression of ADARs but not of an ADAR mutant lacking editing activity could upregulate human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) structural protein expression and viral production. Knockdown of ADAR1 by RNA silencing inhibited HIV-1 production. Viral RNA harvested from transfected ADAR1-knocked-down cells showed a decrease in the level of unspliced RNA transcripts. Overexpression of ADAR1 induced editing at a specific site in the env gene, and a mutant with the edited sequence was expressed more efficiently than the wild-type viral genome. These data suggested the role of ADAR in modulation of HIV-1 replication. Our data demonstrate a novel mechanism in which HIV-1 employs host RNA modification machinery for posttranscriptional regulation of viral protein expression.

[J Virol. 2008 Nov;82(21):10864-72. Epub 2008 Aug 27.]

Avian influenza virus (H5N1) in human, Laos.

Puthavathana P, Sangsiriwut K, Korkusol A, Pooruk P, Auewarakul P,
Pittayawanganon C, Sutdan D, Kitphati R, Sawanpanyalert P,
Phommasack B, Bounlu K, Ungchusak K.

The article reported phylogenetic analysis of A/Laos/Nongkhai 1/07 (H5N1) which is a virus isolate in clade 2.3.4 this case was transferred from Vientiene to receive medical care in hospitals in Nongkhai.

[Emerg Infect Dis 2009 Jan;15(1):127-9.]

Indigenous sources of 2007-2008 H5N1 avian influenza outbreaks in Thailand.

Chaichoune K, Wiriyarat W, Thitithanyanont A, Phonarknguen R, Sariya L, Suwanpakdee S, Noimor T, Chatsurachai S, Suriyaphol P, Ungchusak K, Ratanakorn P, Webster RG, Thompson M, Auewarakul P, Puthavathana P.

Outbreaks of H5N1 avian influenza show strong seasonality. It is not clear where the source of virus originates from in each new outbreak season. This study sought to understand the nature of viral resurgence in recent outbreak seasons in Thailand, where the epidemic is relatively well controlled. In such a situation, indigenous viruses surviving the inter-outbreak season would have to pass through a bottleneck. In order to look for evidence of the bottleneck effect, viral genome sequences from recent outbreaks in the country were analysed. H5N1 avian influenza viruses were isolated from six outbreaks in the rainy season and winter of 2007 through to early 2008. Most of the outbreaks were in the Yom-Nan River basin in the southern part of the northern region of the country. Sequences of these viral isolates were identified as clade 1, genotype Z, similar to viruses from previous years in the central region of the country. The sequences clustered into two groups, one of which was closely related to viruses isolated from the same area in July 2006. These analyses indicated that there was a strong bottleneck effect on the virus population and that only a few lineages remained in the area. In addition, evidence of reassortment among these viruses was found. These indicated re-emergence of viruses from a small pool of indigenous sources that had been silently perpetuated over the dry summer months. Therefore, an approach to eradicate H5N1 avian influenza from the area by eliminating these local reservoirs may be feasible and should be seriously considered.

[J Gen Virol 2009 Jan;90(Pt 1):216-22.]

Codon volatility of hemagglutinin genes of H5N1 avian influenza viruses from different clades.

Auewarakul P, Chatsurachai S, Kongchanagul A, Kanrai P, Upala S, Suriyaphol P, Puthavathana P.

Codon volatility is a method recently developed to estimate selective pressures on proteins on the basis of their synonymous codon usage. Volatility of a codon was defined as the fraction of single nucleotide substitutions that would be nonsynonymous. Higher volatility may indicate that the gene has been under more positive selection in the recent past. We analyzed volatility of hemagglutinin genes of H5N1 viruses in the recent outbreaks and observed differences in the volatility among viruses of different clades. The codon volatility of subclade 2.1 viruses from Indonesia was the lowest among all H5N1 clades and subclades. Time series analyses since the beginning of the epidemic in 2004 showed that codon volatility of subclade 2.1 has gradually decreased, while those of other major clades have been increasing. This may reflect differences in the recent evolution of these viruses.

[Virus Genes 2009 Jun;38(3):404-7]

Dengue virus infection in late pregnancy and transmission to the infants

Phongsamart W, Yoksan S, Vanaprapa N, Chokephaibulkit K.

BACKGROUND: Vertical dengue virus transmissions have been infrequently described. To date there are no published data on long-term outcome and antibody kinetics of infants who were infected in utero. This is the first report of vertical dengue transmission with 12 months follow-up evolution of antibody and the clinical outcome.

METHODS: Three mother-infant pairs were confirmed to have perinatally dengue infection by serology, viral isolation, or reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The infants were followed clinically at 1, 2, 4, 6, 9, and 12 months. Sera were collected at 1, 6, and 12 months of age for serologic testing.

RESULTS: Three mothers developed symptomatic dengue infection 1 day, 12 days, and 5 weeks before delivery of their infants. The first infant developed presumed bacterial illness on day 6 of life. Dengue virus serotype 1 was detected by RT-PCR and viral isolation. The second infant developed fever, petechiae, and hepatomegaly 9 hours after birth. Dengue virus serotype 2 was detected by RT-PCR. The third infant was asymptomatic. All mothers and infants had uneventful recoveries. One year follow-up revealed normal growth and development in all infants. The pattern of antibody kinetics suggested primary infection in the first and second infants, and the transferred antibody without infection in the third infant.

CONCLUSION: In endemic areas, dengue infection can cause an acute febrile illness in pregnant women and sepsis-like illness in neonates. Vertical infection did not result in long-term sequelae.

[Pediatr Infect Dis J 2008;27: 500–4]

Efficacy and tolerability of nevirapine-versus efavirenz-containing regimens in HIV-infected Thai children

Lapphra K, Vanprapar N, Chearskul S, Phongsamart W,
Chearskul P, Prasitsuebsai W, Chokephaibulkit K.

Summary

BACKGROUND: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-based highly active antiretroviral therapy (HAART) has been the most affordable regimen for the HIV-infected in developing countries. There are limited data comparing nevirapine (NVP) to efavirenz (EFV) in HIV-infected children. This study aimed to assess the efficacy and tolerability of NVP-based regimens compared to EFV-based regimens in HIV-infected children in Thailand.

METHODS: The medical records of HIV-infected children who had received NNRTI-based regimens for more than 6 months at the Department of Pediatrics, Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand, were reviewed.

RESULTS: Of the 139 HIV-infected children studied, 70 were male, and the median age at treatment initiation was 6.08 years (range 0.32-14.56 years); the median duration of followup was 36 months (range 6-66 months). The median baseline CD4 cell count was 185 cells/mm³ (range 2—3482 cells/mm³) and the median baseline CD4 percentage was 7.20% (range 0.11—36.57%). An NVP-based regimen was initiated in 61 (44%): 38 antiretroviral (ARV)-naïve and 23 ARV-experienced. An EFV-based regimen was initiated in 78 (56%): 34 ARV-naïve and 44 ARV-experienced.

The CD4 cell count and percentage gains were not different between the NVP and EFV groups in both the ARV-naïve and the ARV-experienced. However, ARV-naïve children who received an EFV regimen had significantly lower baseline CD4 levels than those who received an NVP regimen. ARV-naïve children had a better CD4 response than the

ARV-experienced. The survival rates of children in the NVP groups were not different from those in the EFV groups for both the ARV-naïve and the ARV-experienced. Treatment failure occurred in one ARV-naïve NVP case (2.6%), two ARV-naïve EFV cases (5.8%), and nine ARV-experienced NVP cases (39%) at 24 months of treatment, and 11 ARV-experienced EFV cases (25%) at 18 months of treatment. Seven

[Int J Infect Dis 2008;13:e33-8.]

Evaluation of NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness

Lapphraa K, Sangcharaswichaia A, Chokephaibulkit K, Tiengrima S, Piriyakarnsakula W, Chakorna T, Yoksanb S, Wattanamongkolsila L, Thamlikitkula V.

Abstract: Diagnosis of dengue infection during the febrile stage has been challenging. We evaluated the accuracy of NS1 protein detection in diagnosing dengue infection in patients presenting with acute febrile illness in Bangkok, Thailand. Of the 235 subjects presented with fever of unknown source within 5 days, 132 (56.2%) were male with the median age of 17.8 (range, 3–52) years. The median duration of fever was 4 (range, 1–5) days. One hundred seventy-one (72.8%) patients had dengue infection, of which 158 (92.4%) were secondary infections. The sensitivity of NS1 Ag test was 63.2% (95% confidence interval [CI], 55.7–70.0), and the specificity was 98.4% (95% CI, 91.7–99.7). The positive and negative predictive values were 99.0% and 52.5%, respectively. The immune complex dissociation by acid treatment increases sensitivity from 63.2% to 72%. In an endemic area, Platelia™ NS1 Ag test has limited sensitivity but very high specificity for diagnosis of dengue infection in patients with acute febrile illness. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

[Diagn Microbiol Infect Dis 2008;60:387-91.]

A re-evaluation of the mechanisms leading to dengue hemorrhagic fever

Noisakran S, Chokephaibulkit K, Songprakhon P, Onlamoon N, Hui-Mien Hsiao, Francois Villinger, Aftab Ansari, and Guey Chuen Perng

Viremia is one of the features of dengue virus infection among the flaviviruses. Dengue virus infection results in a spectrum of clinical symptoms, ranging from undifferentiated flu-like illness, mild dengue fever, to dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS), a life-threatening illness. Several mechanisms have been hypothesized based primarily on data collected from post-acute clinical phase to account for DHF/DSS. Lack of a suitable animal model for DHF/DSS has hindered progress in defining the etiology of DHF/DSS. Levels of circulating dengue virus have been wellcorrelated to severe dengue disease. However, the cell lineage(s) serving as a primary target for the source of viremia are largely unknown. Results from *in vivo* and *in vitro* pilot studies using molecular and more advanced technologies reveal that dengue virus appears to be associated with platelets and themegakaryocytic lineage. The observation may partially explain the dysfunction of platelets observed in dengue affected patients.

[*Ann N.Y. Acad. Sci* 2009;1171:E24-E35.]

Hepatitis B virus infection in non-human primates.

Sa-Nguanmoo P, Rianthavorn P, Amornsawadwattana S, Poovorawan Y.

Hepatitis B viruses (HBVs) represent a serious public health problem affecting 350 to 400 million HBV carriers worldwide. The virus does not exclusively infect humans, but can also be found in non-human primates as in the families Hominidae (chimpanzee, gorilla, orangutan) and Hylobatidae (gibbon), which are distributed over Africa (chimpanzee and gorilla) and Southeast Asia (orangutan and gibbon), the endemic areas of human HBV. The prevalence of asymptomatic HBV carriers reaches in gibbons 23-33% and in orangutans 15%. The genome organization of non-human primate HBVs is nearly identical to that of human HBVs. Because of this close similarity, the question of cross-transmission of HBV between species has arisen. There are many data on cross-transmission of human HBVs to the non-human primates. However, a cross-transmission of HBVs from non-human primates to humans has not been reported yet. Using more advanced diagnostic methods, the non-human primates have increasingly been identified as a reservoir of several viruses such as lymphocryptoviruses, Cercopithecine herpesvirus 1 (CeHV-1), Simian immunodeficiency virus (SIV), Simian foamy virus (SFV), and HBVs. Thus veterinarians, zookeepers, or people in close contact with non-human primates may potentially become infected with those viruses causing severe diseases. Enhanced awareness of prevalence, genetic relatedness and evolution of non-human primate HBVs will help prevent further spread and cross-transmission of these viruses between humans and non-human primates.

[Acta Viro 2009;53(2):73-82.]

Liver function test results and outcomes in children with acute liver failure due to dengue infection.

Chongsrisawat V, Hutagalung Y, Poovorawan Y.

This retrospective study compared the liver function test results and outcomes between children with acute liver failure (ALF) due to dengue hemorrhagic fever (DHF) and due to other causes. We retrospectively reviewed patients less than 15 years old with a diagnosis of ALF admitted to 13 participating centers from different parts of Thailand for the years 2000 and 2001, and those admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital for the year 1997 to 2004. The diagnosis of ALF was based on prothrombin time (PT) prolongation to greater than 2 times the normal control value and the presence of encephalopathy without pre-existing liver disease. The patients were divided into 2 groups: group I (n=16) had DHF with ALF and group II (n=37) had ALF due to other causes. DHF patients had AST levels significantly higher than ALT levels. The mortality rate in group I (50%) was lower than in group II (72.9%), although the difference was not statistically significant. The non-DHF patients who died had a significantly longer duration of jaundice before the onset of encephalopathy and a significantly higher PT ratio compared to survivors. There were no significant differences in the duration of jaundice before the onset of encephalopathy and liver function between dengue patients who died and those who survived.

[Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 2009;40(1):47-53.]

Long-term humoral and cellular immune response to hepatitis B vaccine in high-risk children 18-20 years after neonatal immunization.

Chinchai T, Chirathaworn C, Praianantathavorn K, Theamboonlers A, Hutagalung Y, Bock PH, Thantiworasit P, Poovorawan Y.

Eighty-seven high-risk individuals in Thailand who had received a complete course of recombinant HBV vaccine 18-20 y ago were investigated with regard to their immunological memory. To evaluate humoral immunity, anti-HBs antibody titers were measured. Cellular immunity was determined by ELISPOT to detect HBV-specific IFN-gamma-producing cells. Overall 83.9% of participants developed circulating anti-HBs (titer \geq 1 mIU/mL) and 58.6% were seroprotected (titer \geq 10 mIU/mL). As for cellular immunity, 50.6% were positive on ELISPOT. Moreover, there was no correlation between the level of anti-HBs and positive ELISPOT results. However, the majority of participants (81.8%) who were positive for IFN-gamma-producing cells were seropositive, but only 50% of seropositive participants were ELISPOT-positive. Thus, 18-20 y after immunization, it appears that a second booster dose should be considered, especially in high-risk groups.

[Viral Immunol 2009 Apr;22(2):125-30.]

High prevalence of hepatitis C virus genotype 6 in vietnam.

Pham DA, Leuangwutiwong P, Jittmittraphap A, Luplertlop N, Bach HK, Akkarathamrongsin S, Theamboonlers A, Poovorawan Y.

This study aimed to update the prevalence of the various Hepatitis C virus genotypes in Vietnamese blood donors. One hundred and three HCV antibody-positive plasma samples were collected from blood donors at the National Institute of Hematology and Blood Transfusion, Hanoi, Vietnam. All specimens were subjected to RT-PCR of the 5' untranslated region (UTR) to confirm the presence of HCV RNA. The core and NS5B regions of the positive samples were subsequently amplified by RT-PCR followed by direct sequencing and phylogenetic analysis. Seventy out of 103 samples (68.0%) were RNA positive. Core and NS5B were successfully amplified and sequences were obtained for 70 and 65 samples, respectively. Phylogenetic analysis revealed that genotype 6a was the most predominant among Vietnamese blood donors with a prevalence of 37.1% (26/70), followed by genotype 1a at 30.0% (21/70) and genotype 1b at 17.1% (12/70). The prevalence of two other genotype 6 variants, 6e and 6i was 8.6% and 1.4%, respectively. Further analysis of recent studies showed that the geographic distribution of genotype 6 covered mainly southern China and the mainland of Southeast Asia including Vietnam, Laos, Thailand, and Myanmar. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this study are FJ768772-FJ768906.

[Asian Pac J Allergy Immunol 2009 Jun-Sep;27(2-3):153-60.]

Clinical and molecular characterization of chikungunya virus in South Thailand.

Theamboonlers A, Rianthavorn P, Praianantathavorn K,
Wuttirattanakowit N, Poovorawan Y.

In 2008, an outbreak of chikungunya virus (CHIKV) occurred in Narathiwat province, south Thailand. To determine the clinical significance, molecular epidemiology and evolutionary origin of the CHIKV causing this outbreak, 47 patients who had been admitted to Narathiwatratchanakharin provincial hospital due to acute febrile illness were enrolled in this study. Sera were tested for IgM antibodies, and RT-PCR was performed for CHIKV and dengue virus. We diagnosed 10 patients with CHIKV infection and 5 with dengue virus infection. Joint pain is a significant symptom of chikungunya fever. Five strains of CHIKV were isolated. Their genome sequences were different from those isolated from the previous outbreaks in Thailand (1988, 1995-1996) but similar to the sequences isolated from the 2008 Singapore outbreak. We speculated that the outbreak was caused by a group of viruses different from the previous outbreaks. RT-PCR, serology to detect IgM antibodies or paired sera for IgG for CHIKV should be performed in all patients with presumed hemorrhagic fever to promptly detect outbreaks of CHIKV. This precaution would help control global epidemics of this virus.

[Jpn J Infect Dis 2009 Jul;62(4):303-5.]

Long-term benefit of hepatitis B vaccination among children in Thailand with transient hepatitis B virus infection who were born to hepatitis B surface antigen-positive mothers.

Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Theamboonlers A, Srinivasa K, Hutagalung Y, Bock HL, Hoet B.

BACKGROUND: Transmission of hepatitis B virus (HBV) from carrier mothers to their babies appears to be one of the most important factors influencing the prevalence of chronic HBV infection in areas of high hepatitis B endemicity. **METHODS:** Infants born to HBV surface antigen (HBsAg)-positive mothers who were or were not positive for HBV e antigen (HBeAg) or to mothers who were negative for both HBsAg and HBeAg have been followed for 17 years for serological evidence of HBV infection. These infants were divided into 2 groups on the basis of their hepatitis B vaccination protocols: group 1 received vaccine at birth and 1, 2, and 12 months later, and group 2 received vaccine at birth and 1 and 6 months later. Follow-up involved annual clinic visits, during which a blood sample was taken and analyzed for the presence of HBsAg, antibody to HBsAg, and antibody to HBV core antigen (HBcAg). Selected blood samples that tested positive for HBV markers during 2 consecutive visits separated by a long interval were further investigated by polymerase chain reaction to detect HBV DNA. **RESULTS:** Transient presence of HBsAg or transient and/or long-term presence of antibody to HBcAg suggested that this population was heavily exposed to HBV during the follow-up period. Despite these findings, no new cases of chronic HBV infection were observed. None of the subjects with transient presence of HBsAg had any clinical symptoms of liver disease. **CONCLUSIONS:** This study demonstrates the efficacy of the HBV vaccine and its ability to protect against symptomatic disease.

[J Infect Dis 2009 Jul 1;200(1):33-8.]

Susceptibility of antiviral drugs against 2009 Influenza A (H1N1) virus.

Rungrotmongkol T, Intharathep P, Malaisree M, Nunthaboot N,
Kaiyawet N, Sompornpisut P, Payungporn S,
Poovorawan Y, Hannongbua S.

The recent outbreak of the novel strain of influenza A (H1N1) virus has raised a global concern of the future risk of a pandemic. To understand at the molecular level how this new H1N1 virus can be inhibited by the current anti-influenza drugs and which of these drugs it is likely to already be resistant to, homology modeling and MD simulations have been applied on the H1N1 neuraminidase complexed with oseltamivir, and the M2-channel with adamantanes bound. The H1N1 virus was predicted to be susceptible to oseltamivir, with all important interactions with the binding residues being well conserved. In contrast, adamantanes are not predicted to be able to inhibit the M2 function and have completely lost their binding with the M2 residues. This is mainly due to the fact that the M2 transmembrane of the new H1N1 strain contains the S31N mutation which is known to confer resistance to adamantanes.

[Biochem Biophys Res Commun 2009 Jul 31;385(3):390-4.]

Entire genome characterization of human papillomavirus type 16 from infected Thai women with different cytological findings.

Lurchachaiwong W, Junyangdikul P, Payungporn S, Chansaenroj J, Sampathanukul P, Tresukosol D, Termrungruanglert W, Theamboonlers A, Poovorawan Y.

Global prevalence of human papillomavirus type 16 (HPV16) exceeds that of other types. This project has been aimed at attaining basic molecular knowledge of HPV16 by sequencing the whole genome of HPV16 isolated from Thai women at various clinical stages of disease progression. Our group analyzed seven samples of HPV16 in infected women ranging from normal to cervical cancer and discovered two critical non-synonymous changes within the coding region converting the E2-219P prototype to E2-219T in cervical cancer and the L2-269S prototype to L2-269D in CIN III, respectively. Phylogenetic analysis based on the whole genome with special emphasis on the genes E2, E6, L1, and L2 showed the Thai samples to be more closely related to the European than the non-European strains. The vaccine strain's L1 polypeptides showed close relationship to our samples. The results provide basic data for future research on cervical cancer pathogenesis and representative data of HPV16 genome in Southeast Asia.

[Virus Genes 2009 Aug;39(1):30-8.]

High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease.

Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanboonlers A, Poovorawan Y.

OBJECTIVE: To determine the prevalence of human rhinoviruses (HRV) infections in children with lower respiratory disease in Thailand and monitor the association between species of HRV and clinical presentation in hospitalized paediatric patients. **METHOD:** Two hundred and eighty-nine nasopharyngeal (NP) suction specimens were collected from hospitalized paediatric patients admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand during February 2006-2007. Nucleic acids were extracted from each sample with subsequent amplification of VP4/2 by semi-nested RT-PCR for HRV detection. Other viral respiratory pathogens were also detected by PCR, RT-PCR or real time PCR. Nucleotide sequences of the VP4 region were used for genotyping and phylogenetic tree construction.

RESULT: In total, 87 of 289 specimens were positive for HRV indicating an annual prevalence of 30%. Wheezing or asthma exacerbation was the most common clinical presentation observed in infected patients. Sequence analysis and phylogenetic tree showed that 29 (33%) and 8 (9%) specimens belonged to HRV-A and HRV-B, respectively. Most of the HRV positive samples were HRV-C (58%). Moreover, species C was predominantly found in the paediatric population of Thailand in raining season ($p < 0.05$). The frequency of co-infection of HRV-C with other respiratory viral pathogens was approximately 40%. **CONCLUSION:** HRV-C represents the predominant species and is one of the etiologic agents in acute lower respiratory tract infection, causes of wheezing and asthma exacerbation in infants and young children in Thailand.

[J Infect 2009 Aug;59(2):115-21.]

Absence of detectable replication of human bocavirus species 2 in respiratory tract.

Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, Poovorawan Y, Simmonds P.

Human bocavirus (HBoV) commonly infects young children and is associated with respiratory disease; disease associations of the divergent HBoV-2 species are unknown. Frequent HBoV-2 detection in fecal samples indicated widespread circulation in the United Kingdom and Thailand, but its lack of detection among 6,524 respiratory samples indicates likely differences from HBoV-1 in tropism/pathogenesis.

[Emerg Infect Dis 2009 Sep;15(9):1503-5.]

Molecular evolution of H5N1 in Thailand between 2004 and 2008.

Suwannakarn K, Amonsin A, Sasipreeyajan J, Kitikoon P,
Tantilertcharoen R, Parchariyanon S, Chaisingh A, Nuansrichay B,
Songserm T, Theamboonlers A, Poovorawan Y.

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 viruses have seriously affected the Asian poultry industry since their occurrence in 2004. Thailand has been one of those countries exposed to HPAI H5N1 outbreaks. This project was designed to compare the molecular evolution of HPAI H5N1 in Thailand between 2004 and 2008. Viruses with clade 1 hemagglutinin (HA) were first observed in early 2004 and persisted until 2008. Viruses with clade 2.3.4 HA were first observed in the northeastern region of Thailand between 2006 and 2007. Phylogenetic analysis among Thai isolates indicated that clade 1 viruses in Thailand consist of three distinct lineages: CUK2-like, PC168-like, and PC170-like viruses. The CUK2-like virus represents the predominant lineage and has been circulating throughout the course of the 4-year outbreaks. Analysis of recently isolated viruses has shown that the genetic distance was slightly different from viruses of the early outbreak and that CUK2-like viruses comprise the native strain. Between 2005 and 2007, PC168-like and PC170-like viruses were first observed in several areas around central and lower northern Thailand. In 2008, viruses reassorted from these two lineages, PC168-like and PC170-like viruses, were initially isolated in the lower northern provinces of Thailand and subsequently spread to the upper central part of Thailand. On the other hand, CUK2-like viruses were still detected around the lower northern and the upper central part of Thailand. Furthermore, upon emergence of the reassorted viruses, the PC168-like and PC170-like lineages could not be detected, suggesting that the only predominant strains still circulating in Thailand were CUK2-like and reassorted viruses. The substitution rate among clade

1 viruses in Thailand was lower. The virus being limited to the same area might explain the lower nucleotide substitution rate. This study has demonstrated that nationwide attempts to monitor the virus may help curb access and propagation of new HPAI viral genes.

[Infect Genet Evol 2009 Sep;9(5):896-902.]

High prevalence of antibodies against hepatitis A virus among captive nonhuman primates.

Sa-Nguanmoo P, Thawornsuk N, Rianthavorn P, Sommanustweechai A, Ratanakorn P, Poovorawan Y.

Hepatitis A virus (HAV) can infect not only humans but also several other nonhuman primates. This study has been conducted to evaluate the comprehensive anti-HAV seroprevalence in captive nonhuman primate populations in Thailand. The prevalence of antibodies against HAV in 96 captive nonhuman primates of 11 species was evaluated by competitive enzyme immunoassay (EIA). HAV antibodies were found in 64.7% (11/17) of macaques, 85.7% (6/7) of langurs, 28.4% (10/35) of gibbons, and 94.6% (35/37) of orangutans. However, anti-HAV IgM was not found in any sera. These results indicate that the majority of captive nonhuman primates in Thailand were exposed to HAV. It is possible that some of the animals were infected prior to capture.

[Primates 2009 Oct 10.]

Influenza virus (H5N1) in live bird markets and food markets, Thailand.

Amonsin A, Choatrakol C, Lapkuntod J, Tantilertcharoen R,
Thanawongnuwech R, Suradhat S, Suwannakarn K,
Theamboonlers A, Poovorawan Y.

A surveillance program for influenza A viruses (H5N1) was conducted in live bird and food markets in central Thailand during July 2006-August 2007. Twelve subtype H5N1 viruses were isolated. The subtype H5N1 viruses circulating in the markets were genetically related to those that circulated in Thailand during 2004-2005.

[Emerg Infect Dis. 2008 Nov;14(11):1739-42.]

Prevalence, clinical presentations and complications among hospitalized children with influenza pneumonia.

Samransamruajkit R, Hiranrat T, Chieochansin T, Sritippayawan S, Deerojanawong J, Prapphal N, Poovorawan Y.

Viral respiratory tract infections are a major cause of hospitalization in children. Influenza is common but often not laboratory proven. We report a prospective study of children admitted with a clinical diagnosis of pneumonia. Infants and children (ages 1 month-15 years) who were hospitalized with community-acquired pneumonia were enrolled in the study. Their nasopharyngeal aspirated samples were analyzed for common respiratory viruses, including influenza virus, by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) or PCR. Out of 257 patients, we identified 127 (49.4%) cases with respiratory viruses, and influenza was found in 32 of these cases (12.5%). Other common respiratory viruses included respiratory syncytial virus in 42 (16.3%), human metapneumovirus in 24 (9.3%), adenovirus in 17 (6.6%) and parainfluenza virus in 12 (4.7%). The median age of the influenza group was 2 years and 3 months, and 27 (84%) of children in this group were under the age of 5. Asthma was the most common co-morbidity (4/32, 12.5%). Common clinical presentations were fever and cough (100%) with crepitations (90%). The median length of hospitalization was 6 days. Three patients developed respiratory failure, with one mortality (3.1%). One child developed infection-associated hemophagocytic syndrome. Our study demonstrated that young children had a high risk of hospitalization due to influenza pneumonia, which contributed to a significant morbidity.

[Jpn J Infect Dis 2008 Nov;61(6):446-9.]

Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls.

Chieochansin T, Thongmee C, Vimolket L,
Theamboonlers A, Poovorawan Y.

Human bocavirus (HBoV) is a novel virus which can cause respiratory tract disease in infants and children. Recently, the prevalence of this virus was studied worldwide not only in the respiratory tract, but also in the gastrointestinal tract. The results of this study focusing on the HBoV detection in stool samples showed that HBoV could only be found in the stool of children with acute gastroenteritis (0.9%), not in the healthy control samples. Moreover, the complete coding sequences of these HBoV also showed very conserved sequences.

[Jpn J Infect Dis 2008 Nov;61(6):479-81.]

Increased risk of developing chronic HBV infection in infants born to chronically HBV infected mothers as a result of delayed second dose of hepatitis B vaccination.

Tharmaphornpilas P, Rasdjarmrearnsook AO, Plianpanich S, Sa-nguanmoo P, Poovorawan Y.

This two-stage study (cross-sectional and case-control) assessed the effects of delayed second dose HB vaccination on the risk of developing chronic HBV infection in infants born to chronically HBV infected mothers. 521 infants enrolled received the first vaccination by the end of the day after birth, without HBIG. 15 of these infants were chronically HBV infected. In the case-control comparison, controlling for HBeAg in the mother, the risk of an infant becoming chronically infected was 3.74 times (95% CI=0.97-14.39) higher if the interval between the first and the second doses exceeded 10 weeks. This finding suggests it is important that immunization programs ensure timely second dose vaccination to infants born to mothers with chronic HBV infection. Nevertheless, due to the small sample size, these findings should be verified by larger studies.

[Vaccine 2009 Oct 19;27(44):6110-5.]

Low pretreatment serum HBsAg level and viral mutations as predictors of response to PEG-interferon alpha-2b therapy in chronic hepatitis B.

Tangkijvanich P, Komolmit P, Mahachai V, Sa-nguanmoo P, Theamboonlers A, Poovorawan Y.

BACKGROUND: Viral genomic mutations have become increasingly recognized as being associated with the outcome of chronic HBV infection. However, the role of viral mutations as a predictor of response to pegylated-interferon (PEG-IFN) therapy has so far remained unclear. **STUDY DESIGN:** Viral mutations in the enhancer II/basal core promoter (BCP)/precore and the pre-S regions were characterized by direct sequencing in pretreatment serum samples of 50 patients with chronic hepatitis B (33 HBeAg-positive and 17 HBeAg-negative), who were treated for 48 weeks with PEG-IFN alpha-2b.

RESULTS: Sustained virological response at 48 weeks post treatment, defined as HBeAg seroconversion and HBV DNA < 2000 IU/mL for HBeAg-positive patients, and HBV DNA < 200 IU/mL for HBeAg-negative patients, was achieved in 12 (36.4%) and 6 (35.3%) of HBeAg-positive and HBeAg-negative patients, respectively. Response to PEG-IFN therapy correlated to low pretreatment HBsAg level but did not correlate with HBV genotype, pretreatment alanine transaminase and HBV DNA levels. In HBeAg-positive hepatitis, PEG-IFN response correlated with the appearance of double BCP mutations (A1762T/G1764A) at baseline ($P=0.041$). In the HBeAg-negative group, response to PEG-IFN therapy was associated with the presence of pre-S mutation/deletions ($P=0.028$). Multivariate analysis identified low pretreatment HBsAg level as an independent factor associated with SVR in both groups.

CONCLUSIONS: Pretreatment quantitative HBsAg determination is useful for predicting response to PEG-IFN therapy. The presence of double BCP and pre-S mutation/deletions at entry may be associated with a high rate of antiviral response in HBeAg-positive and HBeAg-negative hepatitis, respectively.

[J Clin Virol 2009 Oct;46(2):117-23.]