บทคัดย่อ

รหัสโครงการ:

ชื่อโครงการ : อณูชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1

ชื่อนักวิจัย : พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : pilaipan.put@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรง และเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ A(H1N1) 2009 รวมทั้งศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสทั้งสองด้วย การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่าอนุภาคไวรัสมากกว่า 80% มีรูปร่างเป็นทรงกลม และส่วนน้อยที่เหลือ มีรูปร่างแบบสายยาว หรือรูปร่างไม่แน่นอน กลไกในการก่อโรคของไวรัส H5N1 ประการหนึ่ง คือความสามารถในการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้เกิดการสร้าง cytokine ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดดำของมนุษย์ได้ดี นอกจากนี้ยังได้ค้นพบกลไกใหม่อีกประการหนึ่ง ที่ทำให้ไข้หวัดนกมีความรุนแรงในการก่อโรค คือ ฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัส H5N1 ช่วยให้ไวรัสสามารถทนทานต่อสารยับยั้งที่มีอยู่ในซีรั่มได้ งานวิจัยนี้ได้ทำการเฝ้าระวังและสำรวจหาไวรัสไข้หวัดนกลูกผสมที่อาจมียีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ของมนุษย์รวมอยู่ในอนุภาคด้วย ได้ตรวจไวรัสไข้หวัดนกทั้งหมดจำนวน 109 สายพันธุ์ ในระหว่างปี พ.ศ. 2546-2549 โดยวิธี multiplex RT-PCR แต่ก็ไม่พบว่ามีไวรัสลูกผสมเกิดขึ้น การวิเคราะห์ทาง phylogenetic แสดงให้เห็นว่าการกลับมาของการระบาดของเชื้อ H5N1 มักเกิดจากไวรัสที่รอดเหลือจากการระบาดครั้งก่อน ไม่ใช่เป็นการนำสายพันธุ์ใหม่เข้ามาจากประเทศอื่น การวิจัยยังได้พบไวรัสลูกผสม 2 เชื้อ อุบัติขึ้นในปี พ.ศ.2550 จากการรวมตัวระหว่างไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ด้วยกันเอง ในปี พ.ศ. 2550 ได้ทำการวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดนก clade 2.3.4, genotype V ในผู้ป่วยชาวลาวซึ่งเข้ามารับการรักษาในประเทศไทยและเสียชีวิตในโรงพยาบาลที่จังหวัดหนองคาย

เทคนิค hemagglutination-inhibition (HI) assay โดยการใช้เม็ดเลือดแดงห่านร่วมกับ เทคนิค microneutralization (microNT) assay ซึ่งทำการทดสอบในเซลล์ MDCK ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ H5N1 ระดับของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นในซีรั่มคู่จะสามารถตรวจพบได้ที่ประมาณ 15 วัน หลังเริ่มมีอาการป่วย ทั้ง HI และ NT antibody ที่ระดับ titer ≥40 (ไม่คิดรวมปริมาตรในหลุมทดสอบ) สามารถคงอยู่ได้เป็นเวลานานถึง 5 ปี หลังจากการป่วย นอกจากนี้ยังพบว่า ผู้สูงอายุที่ได้รับวัคซีนไข้หวัดใหญ่จำนวน 5.2% มีการเพิ่มขึ้นของระดับ

แอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาข้าม (cross-neutralizing antibody) กับเชื้อ H5N1 ได้ งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้าง vaccinia recombinant viruses ทั้งหมด 6 แบบ ที่มีการสอดแทรกยีนต่างๆ ของไวรัส H5N1 ได้แก่ HA, NA, NP, M, และ NS รวมทั้ง vaccinia recombinant virus ที่มีการใส่เฉพาะ pSC11 plasmid vector เข้าไปเท่านั้นเพื่อใช้เป็น control จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot พบว่าผู้รอดชีวิตจากการติดเชื้อ H5N1 ทั้ง 4 ราย มีแอนติบอดีต่อฮีแมกกลูตินิน 3 แบบ คือ HA0, HA1และ HA2 domains ในขณะที่ผู้ไม่ติดเชื้อ H5N1 จะมีแอนติบอดีต่อ HA2 domain เท่านั้น และเมื่อนำเซลล์ที่ติดเชื้อ vaccinia recombinant viruses ที่มีการแสดงออกของโปรตีนต่างๆของเชื้อไข้หวัดนกมาใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ H5N1 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence ได้ผลว่าซีรั่มของผู้รอดชีวิตจากการติดเชื้อ H5N1 ทั้ง 4 ราย และซีรั่มจากกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ H5N1 เกือบทั้งหมดสามารถมีแอนติบอดีต่อโปรตีนทดสอบทุกชนิด แต่กลุ่มผู้รอดชีวิตจากการติดเชื้อ H5N1 จะมีระดับของแอนติบอดีที่สูงกว่า นอกจากนี้การทดสอบด้วยวิธี ELISpot โดยใช้ overlapping peptide pools ที่ครอบคลุมโปรตีน NP และ M ทั้งสาย ยังทำให้ทราบว่าผู้รอดชีวิตจาก H5N1 มีการสร้างภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ซึ่งสามารถคงอยู่ได้นานเท่ากับภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ และเมื่อทำการวิเคราะห์ต่อไปด้วยเทคนิค flow cytometry ก็พบว่า cytotoxic T cells ที่มีอยู่นั้นส่วนมากเป็นชนิด CD4+ T lymphocyte ในขณะที่พบ CD8+ T lymphocytes เป็นส่วนน้อย และ NP peptides ทำให้เกิดการกระตุ้นได้สูงกว่า M peptides

จากการใช้เทคนิคการสื่อสารผ่านสัญญาณดาวเทียม (satellite telemetry) ในการติดตามนกนางนวลที่บางปู แสดงให้เห็นว่าเส้นทางบินของนกนางนวลครอบคลุมถึง 7 ประเทศที่มีรายงานการระบาดของเชื้อไข้หวัดนก ได้แก่ ไทย กัมพูชา เวียดนาม จีน อินเดีย บังคลาเทศ และเมียนม่าร์ โดยมี 3 ประเทศเป็นถิ่นที่อยู่อาศัย ได้แก่บริเวณทะเลสาบในธิเบต และซินเจียงเป็นที่ผสมพันธุ์และวางไข่ บริเวณอ่าวไทยตอนใน และทะเลสาบกัมพูชา เป็นที่ที่นกอพยพมาอาศัยในฤดูหนาว ส่วนอีก 4 ประเทศที่เหลือเป็นจุดหยุดพักในระหว่างอพยพ เนื่องจากลักษณะพันธุกรรมของไวรัสในประเทศไทยและจีนมีความแตกต่างกัน โดยไวรัสในประเทศไทยจัดอยู่ใน clade 1 แต่ไวรัสในประเทศจีนจัดอยู่ใน clade 2 จึงไม่พบความเชื่อมโยงระหว่างเชื้อที่ก่อการระบาดในสองประเทศนี้ ในขณะที่เชื้อไข้หวัดนกที่พบในไทย กัมพูชา และเวียดนาม เป็นไวรัส clade 1 เหมือนกัน นอกจากนั้นการระบาดของโรคไข้หวัดนกครั้งแรกๆ ในประเทศทั้งสามนี้ยังเกิดขึ้นในเวลาใกล้เคียงกันแสดงว่าเชื้อไวรัสน่าจะมีที่มาจากแหล่งเดียวกัน จากข้อมูลที่ได้จากการติดตามเส้นทางการบินของนกประกอบกับผลการทดสอบเกี่ยวกับความทนทานของนกที่ฉีดเชื้อไวรัสเข้าไป ทำให้สันนิษฐานได้ว่านกอพยพอาจมีบทบาทในการแพร่กระจายของเชื้อไข้หวัดนก

หลังจากสิ้นสุดการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ระลอกแรก พบอัตราการติดเชื้อในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตจำนวน 7% และ ในกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์จำนวน 12.8% การศึกษาในระดับชุมชนพบอัตราการติดเชื้อในเด็กจำนวน 58% ในขณะที่พบการติดเชื้อใน

ผู้ใหญ่เพียง 3.1% เท่านั้น นอกจากนี้งานศึกษาวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่า nasopharyngeal aspirate เป็นสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลไวต่อการวินิจฉัยการติดเชื้อดีที่สุด รองลงมาคือ nasal swab และ throat swab ตามลำดับ การวิเคราะห์ตัวอย่างจากทางเดินหายใจที่เก็บอย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณไวรัสที่ถูกปล่อยออกมาจากผู้ป่วยจะอยู่ในช่วง 2.6×10^{2} - 8.1×10^{9} copies/ml และช่วงเวลาที่ผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อจะอยู่ระหว่าง 1 ถึง 11 วัน (เฉลี่ย 5 วัน) การประเมินความสามารถของวัคซีนเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 ชนิด monovalent inactivated ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อ HIV เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ พบว่าในกลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV ที่ได้รับวัคซีน มีอัตรา seroconversion เท่ากับ 32% และ seroprotection เท่ากับ 33.3% ขณะที่ในกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ HIV พบอัตรา seroconversion และ seroprotection เท่ากันคือ 35%

งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค 4 อย่าง ได้แก่ การหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน NA, การลดลงของจำนวน plaque (plaque reduction assay), การยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase inhibition- NAI assay) และ วิธีวัดปริมาณนิวคลิโอโปรตีนที่ลดลง (ELISA-based viral nucleoprotein reduction assay) มาใช้ในการศึกษาและเฝ้าระวังการเกิดเชื้อไข้หวัดใหญ่ดื้อต่อยา โดยข้อดีของเทคนิค ELISA based viral nucleoprotein reduction assay คือ สามารถใช้ในการทดสอบกับยาหรือสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งต่อยีนใดของไวรัสก็ได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงดีกว่าวิธี NAI ที่ใช้ทดสอบกับยาที่ออกฤทธิ์ต้านเฉพาะนิวรามินิเดสของไวรัสเท่านั้น นอกจากนี้วิธีนี้ใช้เวลาไม่นานและใช้สารเคมีทดสอบในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานคือ plaque reduction assay แต่ข้อเสียของวิธี ELISA based viral nucleoprotein reduction assay คือ ไม่สามารถใช้ทดสอบกับไวรัสซึ่งมีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ช้าผิดปกติได้

คำหลัก : ไข้หวัดนก H5N1, ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009, การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน, ระบาดวิทยาทางซีรั่ม, นกอพยพ, ระบบสื่อสารผ่านดาวเทียม

Abstract

Project Code:

Project Title: Molecular biology and immunology of avian influenza H5N1 viruses

Investigator: Prof.Dr. Pilaipan Puthavathana, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol Universisty

E-mail Address: pilaipan.put@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years

The present study investigated the molecular biological properties of the highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 viruses and the 2009 pandemic A(H1N1) viruses (H1N1pdm virus) as well as the immunological responses against those viral infections. Electron microscopy demonstrated that more than 80% of the viral particles in a population of an influenza isolate were spherical type, while filamentous and pleomorphic forms were the minor populations. Based on M protein, morphological type of influenza viruses was unlikely under control of genetic control. A pathogenic mechanism of HPAI H5N1 viruses involved the active replication and cytokine induction in human vein endothelial cells. Additionally, a novel pathogenic mechanism that made HPAI H5N1 virus virulent involved the viral hemagglutinin mediated resistance to the serum inhibitors. Surveillance for the reassortant H5N1 virus carrying human genomic segment had been conducted in 109 HPAI H5N1 viruses collected between 2003 and 2006 by using multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and no reassortant was found. Our genetic analysis showed that the resurgence of the HPAI H5N1 outbreak usually occurred from the indigenous viruses surviving after subsidence of the previous outbreaks, not from the re-introducing of the new strain from the other country. Two reassortants emerged from the reassortment between two H5N1 parental viruses were discovered in 2007. An infection caused by the clade 2.3.4, genotype V virus was diagnosed in a Lao patient who came into Thailand for receiving medical care and died in the Nongkhai hospital in 2007.

Goose erythrocyte-hemagglutination inhibition (HI) assay together with microneutralization (microNT) assay in MDCK cells were used for the detection of antibody to H5N1 viruses. The increasing antibody titer in paired blood was shown

approximately 15 days after disease onset. Both HI and NT antibodies at the titer of ≥ 40 (regardless of total volume in the reaction) persisted for almost 5 years after the disease onset in cases that could be followed-up that far. An increase in level of cross neutralizing antibody against HPAI H5N1 could be seen in 5.2% of the old-age vaccinees who received seasonal influenza vaccine. Six recombinant vaccinia viruses carrying individual gene of HPAI H5N1 virus, i.e., HA, NA, NP, M and NS and the pSC11 plasmid vector control were constructed. Western blot analysis showed that all 3 form of HA: HA0 and its cleavage products, HA1 and HA2 domains were expressed in the HA recombinant vaccinia virus-infected TK^- cells. H5N1 survivors contained the antibodies that directed against all 3 forms of HA; while all non-H5N1 subjects contained cross reactive antibody against the HA2 domain only. The viral proteins expressed in cells infected with these constructs were used as the test antigen in the indirect immunofluorescence assay for detection of the H5N1 antibodies. The result demonstrated that sera from all 4 survivors and almost of the non-H5N1 subjects were reactive against all kinds of these viral proteins; but the antibody titers were higher in the survivors. H5N1 survivors also developed cell-mediated immunity which lasted as long as the humoral immunity as determined by ELISpot assay using overlapping peptide pools spanning the entire NP and M proteins. Flow cytometry assay demonstrated that majority of the reactive cytotoxic T cells from H5N1 survivors were CD4+T lymphocytes whereas CD8+T lymphocytes were the minor population; and NP peptides yielded stronger reactivity than M peptides.

Satellite telemetry tracking of the Brown headed gulls from the Bang Poo study site demonstrated their flyways that spanned 7 countries (Thailand, Cambodia, Vietnam, China, India, Bangladesh and Myanmar) which were affected by H5N1 AI. This gull species inhabits 3 countries; Tibet lake area and Xinjiang in west China as the breeding grounds, and the inner gulf of Thailand as well as the TonLe Sap lake area in Cambodia as the places for overwintering. The other 4 countries were the places for stopover during migration. The difference in the viral genetic clades between H5N1 viruses in Thailand (clade 1 virus) and China (clade 2 virus) suggested that there was no linkage between AI spread between the two countries. On the other hand, the HPAI H5N1 virus found in Thailand, Cambodia and Vietnam belonged to clade 1; and the firstly AI outbreaks in these countries occurred at about the same time, suggestive of the same virus origin. The data from satellite telemetry together with the result on virus

inoculation in gulls kept in captivity suggested the possible role of AI spread by migratory birds.

At the end of the first epidemic wave of the 2009 pandemic influenza the infection rates of 7% were found in blood donors and 12.8% in health care workers. The community based study reported the higher infection rates in children (58%) than adults (3.1%). Our study also showed that nasopharyngeal aspirate was the best sample which yielded the most sensitive result in the disease diagnosis, and followed in order by nasal swab and throat swab specimens. Using sequential respiratory samples, the viral load at the amount of 2.6×10^{2} - 8.1×10^{9} copies/ml were shed from the patients and duration of viral shedding lasted between 1 and 11 days (mean = 5 days). The immunogenicity of monovalent, inactivated H1N1pdm vaccine was evaluated in HIV infected individuals and the uninfected controls after single injection by HI assay. The seroconversion rate of 32% and the seroprotection rate of 33.3% were found in the HIV infected vaccinees; while the seroconversion rate as well as the seroprotection rate of 35% was found in the uninfected control group.

Our group has established 4 techniques: direct nucleotide sequencing, plaque reduction assay, neuraminidase inhibition (NAI) assay and ELISA based viral nucleoprotein (NP) reduction assay for using in the surveillance for anti-viral drug resistant influenza viruses. The advantage of ELISA based viral NP reduction assay is its ability to investigate the drug or compounds targeting any viral gene; therefore, it has an advantage over the NAI assay which can investigate only the compounds targeting NA protein. Moreover, it has an advantage over the gold standard plaque reduction assay such that it consumes less reagents and time. The pitfall of ELISA based viral NP reduction assay is its inability to test the viruses with unusually slow rate of replication.

Keywords : Highly pathogenic influenza H5N1 virus, 2009 pandemic A(H1N1) virus, satellite telemetry