สรุปความก้าวหน้างานวิจัยไข้หวัดนกประจำปี 2551
ระหว่างเดือนมกราคม-เดือนธันวาคม 2551

16 ธันวาคม 2551

สวทช.ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยด้านไข้หวัดนก ตั้งแต่ปี 2548 จนถึงปัจจุบันรวมทั้งสิ้น 68 โครงการ โดยอยู่ระหว่างการพิจารณา 2 โครงการ อยู่ระหว่างดำเนินการ 35 โครงการ และปิดโครงการแล้วทั้งสิ้น 20 โครงการ (ไม่รวมโครงการที่ถอน (6) และยุติโครงการ (4)) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นด้านต่างๆ 6 ด้าน ได้แก่

1. ด้านการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย
2. ด้านการพัฒนาวัคซีนไข้หวัดนก สำหรับคน และ สัตว์
3. ด้านการพัฒนายาต้านไวรัสไข้หวัดนก
4. ด้านการศึกษาระบาดวิทยา
5. ด้านการค้นหาองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไข้หวัดนก
6. ด้านการจัดการความรู้

จากงานวิจัยที่ สวทช. ได้ให้การสนับสนุนทั้ง 6 ด้านที่กล่าวมานั้น งานวิจัยมีความก้าวหน้าตามแผนงานที่วางไว้ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเซลล์ฮัยบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วน hemagglutinin ของเชื้อไข้หวัดใหญ่แต่ละชนิด ได้แก่ H1, H3, H5, H7 และ H9 และต่อส่วน NP ของเชื้อไข้หวัดใหญ่กลุ่มเอและบี รวมทั้งทำการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาพลาสมิดโคลนที่สามารถ ผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติเจนของเชื้อแต่ละชนิดดังกล่าว ได้ผลดังนี้คือ H-1 specific MAb เมื่อทดสอบเสร็จแล้วพบว่ามี MAb อย่างน้อย 2-3 โคลนมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้เป็น captured MAb และ/หรือ detecting MAb H-3 specific MAb มี 4 โคลนที่สามารถ inhibit hemagglutination ของเชื้อสายพันธุ์ inf/A/Panama 2007/99 ได้ และไม่ cross react กับ subtype อื่นๆ H-5 specific MAb มี 3 โคลนที่ให้ผลบวก โดยเป็น 2 โคลนที่ให้ผล HA positive โดย Western blot ซึ่งให้ผลบวกใน immunofluorescent staining เช่นกัน ส่วนอีก 1 โคลนให้ผลบวกแต่ไม่ดีเท่า 2 โคลนแรก โดยได้แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สามารถใช้เป็น MAb ที่เหมาะสมในการทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ ปฏิกิริยา sandwich ELISA, hemagglutination inhibition, immunofluorescence และ Western blot H-7 specific MAb ได้ MAb ที่มีคุณสมบัติดีจำนวนอย่างน้อย 5 โคลน ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มี epitope แตกต่างกัน การทดสอบเบื้องต้นพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวน่ามีคุณสมบัติที่ดีสำหรับวิธี ELISA H-9 specific MAb มี 6 โคลนที่เหมาะสมกับการนำมาใช้ตรวจด้วยวิธี ELISA และไม่ crossreact กับ subtype อื่นๆ Nucleoprotein-specific MAb สามารถสร้างเซลล์ฮัยบริโดมาที่มีความจำเพาะได้จำนวน 3 โคลน Influenza B specific MAb สามารถสร้างเซลล์ฮัยบริโดมาที่มีความจำเพาะได้จำนวน 15 โคลน ในส่วน recombinant nucleoprotein ของ Influenza A ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว โดยใช้ prokaryotic expression system แต่การผลิต recombinant HA มีอุปสรรคที่ไม่สามารถผลิตโปรตีนใน prokaryotic system ได้ถึงแม้ว่าจะใช้ระบบการโคลนยีนและเปลี่ยนแปลงขนาดของยีน

หลายวิธี จึงได้ปรับปรุงโครงการและใช้วิธีการสร้างโปรตีนใน eukaryotic expression system โดยใช้ baculovirus ซึ่งสามารถสร้าง recombinant H5 HA ได้สำเร็จแล้ว ขณะนี้ผู้วิจัยยังอยู่ในระหว่างดำเนินการการเรื่องสิทธิบัตรของ Hybridoma cell ที่ผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อ HA ของเชื้อ influenza A แต่ละชนิด รวมทั้ง Hybridoma cell ที่ผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อ NP และ matrix protein ของ influenza A และ Hybridoma cell ที่ผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อ HA ของ influenza B และสิทธิบัตรพลาสมิดโคลนที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติเจนของส่วน HA ของ H5 และพลาสมิดโคลนที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติเจนของส่วน NP ของ influenza A ด้วย

เมื่อวันพุธที่ 7 พฤศจิกายน 2550 ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ ศช. ได้แถลงข่าวความสำเร็จ “ชุดตรวจวินิจฉัยไข้หวัดนกรุ่นใหม่โดยหลักการไบโอเซนเซอร์ ชุดแรกของโลก” โดยความสำเร็จนี้ ถือเป็นส่วนหนึ่งของการบรรเทาปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของหลายประเทศทั่วโลก นั่นคือ “การติดเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์” ซึ่งมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วของเชื้อไวรัส

ศช. ร่วมกับบริษัท อินโนวา ไบโอเทคโนโลยี จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทร่วมทุนระหว่าง สวทช. กับนักวิชาการและภาคเอกชน ร่วมดำเนินโครงการวิจัยและพัฒนา “ชุดตรวจวินิจฉัยไข้หวัดนกรุ่นใหม่โดยหลักการไบโอเซนเซอร์” โดยมุ่งเน้นการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจากการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นได้ในประเทศไทย และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 ที่กำลังแพร่ระบาดอยู่ทั่วโลก ชุดตรวจนี้ใช้เทคโนโลยีไบโอเซนเซอร์ ซึ่งใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโน เชื่อมต่อเข้ากับแอนติบอดี ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ของโลก จากการประเมินประสิทธิภาพในการตรวจสอบ พบว่าชุดตรวจมีความไวในการตรวจสูงกว่าชุดตรวจแบบเดิมถึง 100 เท่า โดยใช้เวลาตรวจเพียง 15 นาที ได้ทำการผลิตระดับอุตสาหกรรมในชื่อ INNOVA Platinum® H5 Biosensor และ AIV Biosensor (ราคาประมาณชุดละ 300 บาท) นับเป็น “ชุดตรวจไข้หวัดนกแบบไบโอเซนเซอร์ที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ชุดแรกของโลก” ขณะนี้ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจอย่างเข้มงวดตามหลักวิทยาศาสตร์ในระดับสากลในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม และได้ยื่นจดทะเบียนสิทธิบัตรแล้ว

ด้านการพัฒนาชุดตรวจไวรัส H1-H3-H5 โดยวิธี Multiplex RT-PCR และ Multiplex TaqMan real-time RT-PCR ผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวนยีนต่างๆ ได้แก่ GADPH, Matrix ของไวรัส Flu A และ B และยีน HA ของไวรัส Flu A สายพันธุ์ H1, H3, H5 จากตัวอย่างที่เคยได้ศึกษาก่อนหน้านี้และยืนยัน subtype เพื่อใช้เป็น positive control และได้ออกแบบ primer/ probe แล้ว คณะผู้วิจัยได้ทดสอบเทคนิค Multiplex RT-PCR และ Multiplex TaqMan real-time RT-PCR ที่พัฒนาขึ้น พบว่า ให้ผลการแยก type (A/B) และ subtype (H1/H3/H5) ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ เมื่อทดสอบกับไวรัสระบบทางเดินหายใจชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ ไม่พบว่ามี cross amplification ต่อไวรัส FluA subtype อื่นๆ รวมทั้งยังมีความไว (sensitivity) ค่อนข้างสูง เทคนิคดังกล่าวสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว โดยตรวจได้ภายใน 2-6 ชั่วโมงหลังได้รับสิ่งส่งตรวจ โดยไม่จำเป็นต้องมีเชื้อที่มีชีวิตในสิ่งส่งตรวจนั้น และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจที่ไม่สูงนัก จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ คณะผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ผลงานดังกล่าวลงใน Journal of Virology Methods และ Tohoku Journal of Experimental Medicine และได้แถลงข่าวความสำเร็จของชุดตรวจดังกล่าว เมื่อ

วันที่ 29 กันยายน 2551 รวมทั้งกำลังจะจัดประกาศเชิญชวนรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีในเชิงสาธารณประโยชน์กับองค์กรที่เกี่ยวข้องในลำดับต่อไป

โดยสรุปในปี 2551 นี้ประสบผลสำเร็จได้ผลงานวิจัยด้านชุดตรวจไข้หวัดนกต้นแบบทั้งสิ้นจำนวน 5 ชุดดังนี้

1. INNOVA Platinum® H5 Biosensor
2. INNOVA Platinum® Avian Influenza Virus Biosensor (Flu A)
3. Rapid immunochromatography test ต่อ H5
4. ชุดตรวจไวรัส H1-H3-H5 โดยวิธี Multiplex RT-PCR
5. ชุดตรวจไวรัส H1-H3-H5 โดยวิธี Multiplex TaqMan real-time RT-PCR

2. การวิจัยและพัฒนาวัคซีนไข้หวัดนก สำหรับคน และ สัตว์

วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีความสามารถในการป้องกันโรคได้แบบจำเพาะต่อไวรัสสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งซึ่งมีการระบาดในปีนั้นๆ เท่านั้น ไม่ครอบคลุมการป้องกันไวรัสทุกสายพันธุ์ และจะต้องมีการผลิตวัคซีนขึ้นใหม่ทุกปี เนื่องจากเชื้อไวรัสมีการปรับตัวเองตลอดเวลา ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่ต้องการหาข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การผลิตวัคซีนอเนกประสงค์ซึ่งสามารถใช้ป้องกันโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในกลุ่มไข้หวัดใหญ่ได้ทุกสายพันธุ์ โดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาผลิตไวรัสทุกปีตามวิธีการดั้งเดิม ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบระบบเซลล์ต่อยีน PB2, NP และ M ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไวรัสไข้หวัดนก เพื่อดูว่ามีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์กันหรือไม่ และนำมาสร้างแผนที่แสดงชิ้นส่วนของยีนที่มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ในระดับสูง เพื่อเลือกชิ้นส่วนยีนอนุรักษ์ที่มีการตอบสนองสูงเหล่านั้นมาประกอบกับข้อมูลอื่นๆและพัฒนาต่อยอดผลิตเป็นวัคซีนอเนกประสงค์ในอนาคต

โดยในขณะนี้ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยก PBMC จากอาสาสมัครคนไทยที่เคยเป็นไข้หวัดใหญ่มาก่อน จำนวน 38 ราย และทำการออกแบบ และสังเคราะห์ overlapping peptides ของโปรตีน Matrix, NP และ PB2 จาก consensus sequence ที่ได้จากการ alignment ของ sequence จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้ดังนี้ M1: 31 เส้น, M2: 18 เส้น, NP: 67 เส้นและ PB2: 90 เส้น เมื่อนำ peptide ของโปรตีนแต่ละกลุ่มมา pool รวมกันแบบ 2-D matrix แล้วนำมาทดสอบการตอบสนองของ T-cell ของอาสาสมัคร ด้วย ELISPOT พบว่า มีการตอบสนองต่อ M1=6 ราย M2= 4 ราย NP= 9 รายและ PB2=15 ราย โดยที่ PB2 ให้ผลการตอบสนองสูงสุดถึง 506 SFU/10^6 PBMC (แสดงถึงการเป็น immunodominant peptide ของโปรตีน PB2)

จากการทำ individual peptide mapping เพื่อวิเคราะห์ว่าการตอบสนองดังกล่าวเกิดจาก peptide เส้นใดพบว่า มี immunogenic peptides ทั้งหมด 30 เส้น โดย peptides ของโปรตีน PB2 ที่ให้การตอบสนองของ T cell สูงสุด คือ RG20, KP20, EG20, IG20 และ ER20 ซึ่งเป็น peptide ที่อยู่บริเวณ C-terminal ของ PB2 นอกจากนี้ยังพบว่า peptides เหล่านี้กระตุ้น T cell ผ่านทั้ง $CD4^+$ และ $CD8^+$ และทำให้เกิดการหลั่ง IL-2 และ INF-γ ด้วย จากการเปรียบเทียบ peptide sequence กับฐานข้อมูล Los Alamos พบว่า IG20 และ ER20 มีความ conserve มากทั้งใน human flu และ bird flu

(100% identity) ส่วน 3 เส้นที่เหลือก็ conserve ต่างกันในช่วง 95-100% identity แสดงว่า response ผ่านโปรตีน PB2 นี้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบข้ามสายพันธุ์ และน่าจะสามารถใช้ peptide เหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนา universal influenza DNA vaccine ต่อไปได้ในอนาคต

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยไข้หวัดนกรอดชีวิต หรือผู้สัมผัสโรคติดเชื้อไม่แสดงอาการ มีหลายประการ ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งได้แก่ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยจึงมุ่งที่จะศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบสารน้ำและระบบเซลล์ในบุคคลสองกลุ่มนี้เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ เพื่อจะแสวงหาข้อมูลสำคัญสำหรับการพัฒนาวัคซีนซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ระหว่างผู้ที่ติดเชื้อไวรัสในกลุ่มไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยกันเองได้ โดยในขณะนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ H5N1 ของผู้ป่วยและผู้ที่รอดชีวิตจากการติดเชื้อไข้หวัดนก โดยใช้เทคนิค microneutralization test (NT), HI และ Western Blot พบว่า NT titer เพิ่มขึ้น 4 เท่าในสัปดาห์ที่ 2-3 หลัง onset และสามารถอยู่ได้นานถึง 3 ปี โดยในผู้ป่วยที่เป็น compromised host จะไม่สามารถตรวจพบ titer ได้ ทั้งนี้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถทำปฏิกิริยาข้าม clade ได้ (EID journal แล้วเมื่อเดือน พ.ค. 51 ขณะนี้ยังไม่ได้รับการตอบรับใดๆจากวารสาร อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะติดตามอีกครั้ง)

สำหรับ ด้าน Cellular immune response ผู้วิจัยได้ทำการสร้าง recombinant vaccinia อย่างน้อย 3 ตัว ที่มียีน NP, M, HA สำหรับใช้ใน CTL assay เพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันแบบข้าม subtype เสร็จแล้ว ขณะนี้อยู่ระหว่างการทดลอง โดยมีข้อจำกัดคือ ได้เลือดที่เจาะได้จากผู้ป่วยปริมาณน้อย (ตามข้อกำหนดของคณะกรรมการจริยธรรมของกระทรวงสาธารณสุข) ซึ่งส่งผลให้ได้เซลล์ PBMC ปริมาณน้อยตามไปด้วย จึงได้เปลี่ยนมาศึกษาในเลือดของคนปกติ แล้วศึกษาด้วยเทคนิค ELISPOT assay แทน โดย พบว่า ประมาณ 70% ของกลุ่มคนปกติ เคยเป็นไข้หวัดใหญ่มาก่อน ซึ่งในกลุ่มดังกล่าวต้องมีภูมิคุ้มกันต่อไข้หวัดใหญ่ แต่ไม่ทราบว่าจะมี epitope ที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ไปยัง H5N1 หรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกศึกษาเฉพาะ NP ก่อน โดยได้ดำเนินการสังเคราะห์ peptide จำนวน 49 เส้น เพื่อหา common epitope ในคนปกติ 25 ราย พบ peptide จำนวน 5 เส้น และ ในจำนวนนั้นมีเพียง 4 ตำแหน่งที่สอดคล้องกับผลที่เคยมีรายงาน ซึ่งอาจเป็นเพราะมี HLA ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้มีการยืนยันผล ELISPOT ด้วย Flow cytometry ซึ่งพบว่า ในโปรตีน NP พบ CD4 epitope มากกว่า CD8 epitope โดยสรุป หลังจากปรับเปลี่ยนการวิจัยแล้ว ผู้วิจัยคาดว่าจะทราบ epitope ที่น่าจะสามารถทำปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ไปยัง H5N1 ได้ โดยจะรายงานผลได้ในรายงานฉบับสมบูรณ์ต่อไป

สำหรับวัคซีนไข้หวัดนกแบบ reverse genetic ที่ ศ.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดำเนินการแล้วเสร็จนั้น ได้ถูกนำมาทดสอบในไก่ และ ferret เป็นที่เรียบร้อยแล้ว พบว่ามีความปลอดภัย และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในสัตว์ทดลองทั้ง 2 ชนิด ผู้วิจัยจึงได้ทดลองฉีดในไข่ไก่ฟัก พบว่าใน allantoic fluid ของไข่มีปริมาณแอนติเจนชนิด H5 เท่ากับ 20 ng/uL จากนั้นจึงได้ทำการส่งต่อไวรัสต้นแบบดังกล่าวไปยัง มจธ. ให้ทำการเลี้ยงเซลล์ MDCK ในถังหมัก เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป ซึ่งขณะนี้ทาง มจธ. ยังประสบปัญหาในการเลี้ยงเซลล์ในถังหมัก โดยขณะนี้เจ้าภาพโปรแกรม A2 ได้ประสานงานไปทางคณะเวชสาสตร์เขตร้อนขอใช้สถานที่วิจัย BSL2+ จากคณบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อนให้กับนักวิจัยเรียบร้อยแล้ว อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังมีปัญหาในขั้นตอนการแยกอนุภาคไวรัสออกจาก allantoic fluid ของไข่ไก่ฟัก โดยพบว่า หลัง inactivate ไวรัสด้วย β-

propiolactone แล้วพบว่า โปรตีนมีการตกตะกอน (พบภายหลังว่าเป็นโปรตีน Hemagglutinin) ซึ่งมีปัญหาในการ purification ผู้วิจัยจึงนำไปปั่นและนำส่วนใสซึ่งมีไวรัสอยู่ด้วยไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดย ultrafiltration และ ultracentrifugation หลังจากนั้นทำการแยกไวรัสออดมาโดย sucrose-gradient ultracentrifugation และ anion exchange chromatography ซึ่งพบว่า ยังไม่สามารถแยกไวรัสออกมาได้ อย่างไรก็ตามจะมีการส่งเครื่อง Zonal centrifugation จากองค์การเภสัชกรรม (GPO) น่าจะมีโอกาสสามารถแยกไวรัสออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากห้อง BSL2+ ยังไม่แล้วเสร็จ จึงยังไม่สามารถเข้าดำเนินการได้ (ควรแล้วเสร็จปี 2551 นี้ และน่าจะได้ผลการทดลองภายในพฤษภาคม 2552 นี้

ผลที่ได้จากชุดโครงการนี้ ทำให้เรามีเทคนิคในการสร้างไวรัสไข้หวัดนกที่มีคุณลักษณะตามต้องการได้อย่างรวดเร็ว โดยสามารถสร้าง rgH5N1 เพื่อเป็นวัคซีนตั้งต้น (seed vaccine) ที่อาจมีประโยชน์ในการรับมือกับการระบาดใหญ่ของไข้หวัดใหญ่ต่อไป และหากมีไวรัสที่มีคุณลักษณะทางแอนติเจนเปลี่ยนไปเกิดขึ้นในอนาคต ทางโครงการจะสามารถสร้างวัคซีนตั้งต้น จากไวรัสชนิดนั้นได้อย่างทันกาล

3. การวิจัยและพัฒนายาต้านไวรัสไข้หวัดนก

ศ.วันเพ็ญ และคณะได้เสนอการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนต่างๆ ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด H5N1 (avian influenza virus H5N1) ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ต้นแบบเพื่อการพัฒนาใช้ในการรักษา (treatment) ผู้ป่วยโรคไข้หวัดใหญ่หรือ intervene โรคในผู้สัมผัสเชื้อแต่ยังไม่มีอาการ ด้วยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ และเสนอการพัฒนาการนำส่งแอนติบอดีสายเดี่ยวที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนสำคัญของไวรัส H5N1 เข้าไปทำการลบล้าง/หยุดยั้งการทำงานของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ของโฮสต์ โดยผู้วิจัยได้คัดเลือกไวรัส H5N1 สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย และทำการทดสอบหาสภาวะเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของยีน HA และ NA จนสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีนได้แล้ว จากนั้นจึงได้ทำการเตรียม Recombinant expression vectors ซึ่งบรรจุ HA และ NA genes และถ่ายโอน (transform) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* เพื่อสร้างเป็นโคลนที่บรรจุยีนทั้งสองไว้ และเมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสแล้วพบว่าได้ชิ้นส่วนยีนที่ถูกต้องทั้งสองยีน ดังนั้น จึงมีโคลนที่บรรจุยีน HA และ NA ซึ่งพร้อมจะนำไปศึกษาในขั้นตอนการทำการแสดงออก (expression) เป็นโปรตีนลูกผสมแล้ว (recombinant HA and NA protein) ผู้วิจัยได้ดำเนินการจนถึงมี human ScFv ต่อ recombinant HA ที่สามารถ neutralized hemagglutinating activity ของ H5N1 virus ได้ นอกจากนี้ยังมี human ScFv ที่มีความจำเพาะต่อ native HA ของ H5N1 virus ที่สามารถ neutralize hemagglutinating activity ของ H5N1 virus ที่มีต่อเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ได้ด้วย รวมทั้งขณะนี้มี human ScFv ที่ยับยั้งการจับของ H5N1 virus กับ receptor บน host cells แล้ว ผู้วิจัยยังได้นำเสนองานดังกล่าวในการประชุมวิชาการ AI CONF 2008 ณ โรงแรมดุสิตธานี โดยงานดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับงานของบริษัท Crucell ซึ่งต่างก็ใช้เทคโนโลยี phage display library ในการสร้างแอนติบอดีของคน human monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่พยายามแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อไข้หวัด ทั้งสองกลุ่มต่างรายงานความสำเร็จในการสร้างแอนติบอดีที่สามารถขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในหลอดทดลองได้ ยิ่งไปกว่านั้นแอนติบอดีเหล่านั้น ยังสามารถช่วยหนูติดเชื้อ H5N1 ให้รอดชีวิตได้ ความแตกต่างหนึ่งของงานทั้งสองกลุ่มนี้ คือ Crucell ใช้วิธีการผลิตแอนติบอดีในเซลเพาะเลี้ยง ในขณะที่กลุ่มของศิริราชสร้าง

แอนติบอดีในแบคทีเรีย ซึ่งจะมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า หากจะมีการนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคนี้ในอนาคต และในขณะนี้งานวิจัยดังกล่าวมีความก้าวหน้าไปมาก จนสามารถมีแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่สามารถยับยั้งโปรตีน HA และ NA ของไวรัส H5N1 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว(therapeutic human ScFv anti-HA และ NA) นอกจากนี้ยังได้องค์ความรู้ในส่วนของเทคนิคการนำส่งแอนติบอดีเข้าสู่เซลล์ และสามารถสังเคราะห์โปรตีนที่จะเชื่อมต่อกับแอนติบอดีสายเดี่ยวได้เป็นที่เรียบร้อยแล้วเช่นกัน

ศ.พิไลพันธ์ ยังได้ทำการทดสอบ micro NT test พบว่าสามารถตรวจพบ Antibody ได้เร็วที่สุดที่ระยะเวลา 5 วัน และยังพบว่า Antibody ดังกล่าวสามารถคงอยู่ในตัวผู้ติดเชื้อที่หายแล้วได้นานถึง 3 ปี ที่ titer สูงถึง 1,280-2,560 แสดงให้เห็นถึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการใช้ Antibody จากผู้ป่วยที่หายแล้วมาใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อรายใหม่ได้

รศ.ปานเทพ ร่วมกับ ศ.พิไลพันธ์ ยังได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ hyperimmune serum ในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ทดลอง โดยในขณะนี้คณะผู้วิจัยใช้ม้า Pony ผลิต hyperimmune serum โดยทำการ immunize ม้า 2 ตัว ด้วย inactivated Rg virus ที่มี HA จากไวรัสสายพันธุ์ H5N1-KAN1 ที่ HA titer ระดับ 1:128 โดย ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วกระจายฉีดม้าในบริเวณต่างๆ 3-4 ตำแหน่ง (ตำแหน่งละ 200 μl) หลังการฉีดครั้งที่ 1 และเจาะเลือดมาทดสอบ immune response ต่อ ไวรัส Influenza A/ Chicken/ Thailand(Bangkok(vsmu-3/ 2004 (H5N1)) พบว่า มี NT titer ต่อ ในระดับ 1:320 แต่เกิดฝี (abscess) ขนาดใหญ่ขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 โดยไม่แสดงอาการป่วยอื่นๆ ร่วมด้วย จึงหยุดการกระตุ้นในครั้งต่อไป ที่ประชุมขอให้เปลี่ยนชนิดของแอดจูแวนท์ และ/หรือ ใช้ทั้ง completed Freund's กับ Incompleted Freund's adjuvant ในการ immunize ม้า โดยการใช้ Complete Fruend's adjuvant ควรผสมกับวัคซีน แล้วแบ่งฉีดจุดละ 100-200 μl จะช่วยลด tissue reaction จากการ immunize ในครั้งแรก และใช้แอดจูแวนท์อื่นในการ booster เช่น Incompleted Freund's adjuvant, Aluminum hydroxide รวมทั้งขอให้คณะผู้วิจัยพิจารณาการ immunize ด้วย inactivated whole virus โดยไม่มีแอดจูแวนท์ก่อน เพื่อให้สามารถนำผลการทดลองแบบที่มีแอดจูแวนท์มาเปรียบเทียบกันได้

ศ. อภิชาตและคณะได้ดำเนินการทดสอบหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เพื่อนำมาสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเหล่านั้นให้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ oseltamivir ซึ่งขณะนี้คณะผู้วิจัยได้ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจำนวน 40 สารสกัด และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อไวรัส H5N1 ได้สารสกัดที่ออกฤทธิ์จำนวน 2 สารสกัด และหนึ่งใน 2 ชนิดนั้น ได้ถูกนำมาเตรียมสารให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำมาแยกสารออกจากสารสกัดนี้ และสามารถแยกสารได้ 12 ชนิด และเริ่มหาสูตรโครงสร้างได้แล้ว 1 ชนิด

ดร.สุกัญญา และคณะได้กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์นิวรามินิเดสในยีสต์ ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้หวัดนกได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีค่าเทียบเท่ากับการตรวจโดยการใช้เชื้อไวรัสโดยตรง และได้ยื่นจดสิทธิบัตรกรรมวิธีนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

4. การศึกษาระบาดวิทยา

ศ.พิไลพันธ์ จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ได้ทำการเฝ้าระวังเชื้อไข้หวัดนกดื้อยา oseltamivir โดยอาศัยหลักการของ NP reduction based ELISA คู่กับ plaque reduction assay โดยช่วงเวลาที่ผ่านมา จนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบว่ามีเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น และจะยังคงติดตามเชื้อไวรัสจากคนและสัตว์เพื่อเฝ้าระวังการดื้อยาอย่างต่อเนื่องต่อไป

รศ.ปานเทพ รัตนากร ได้ทำการผลิต Standard serum ในการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยขณะนี้คณะผู้วิจัยได้ผลิต standard serum จาก ferret โดยการ immunize ferret ด้วย whole inactivate RG virus จำนวน 4 ครั้ง พบว่า ferret สามารถสร้างแอนติบอดีในระดับที่น่าพอใจ ซึ่งขณะนี้กำลังทดสอบซีรัมกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากสัตว์ติดเชื้อในธรรมชาติต่างๆ รวมทั้งเชื้อไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่ที่แยกได้จากผู้ป่วย รวม 13 isolates

โปรแกรม A2 ยังได้ให้ทุนวิจัย ศ. ยง จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ให้ทำการศึกษาระบาดวิทยา โดยทำการเฝ้าระวังและติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของไข้หวัดนก โดยเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล เพื่อเป็นข้อมูลในการคาดการณ์สายพันธุ์เชื้อไข้หวัดนกชนิดใหม่ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะรุนแรงขึ้นในอนาคต ซึ่งจากการเก็บตัวอย่าง cloacal swab, tracheal swab จากสัตว์ปีกมีชีวิต และชิ้นเนื้อจากสัตว์ปีกตาย ตั้งแต่ปลายปี 2549 ถึงต้นปี 2551 จาก จ.หนองคาย พิจิตร และนครสวรรค์ มาถอดรหัสทั้งหมด 8 ยีน (whole genome sequencing) จำนวน 3 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนต่างๆ พบว่า เชื้อที่แยกได้เมื่อเดือนมกราคม ปี 2551 จาก พิจิตร และนครสวรรค์ ตามลำดับ เป็นไวรัสที่ยังคงมีความรุนแรงและมีลักษณะทางพันธุกรรมที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสที่ระบาดตั้งแต่ปี 2547 (clade 1) โดยยังไม่มีการกลายพันธุ์บริเวณ receptor binding site ของ Hemagglutinin และกรดอะมิโนสำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยา Oseltamivir และ Amantadine บน neuraminidase และ M2 ตามลำดับ ส่วนไวรัสที่ได้จากหนองคายจัดเป็นไวรัส clade 2.3.4 ที่พบทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีน ลาว เวียดนามตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงในจุดสำคัญเช่นกัน ขณะนี้ได้ submit ลำดับเบสที่ได้ เข้าฐานข้อมูลของ GenBank โดยที่จะอนุญาตให้มีการ release ข้อมูลในปี 2552 สำหรับการเฝ้าระวังเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์รุนแรงต่ำ หรือ LPAI นั้น คณะผู้วิจัยพบไวรัส subtype H8N4 ซึ่งมีรายงานอยู่ไม่มากในประเทศแคนาดา จีน และ สหรัฐฯ และได้ถอดรหัสยีน HA และ NA พบว่า มีความใกล้เคียงกับไวรัส A/duck/Yangzhou/02/05 มากที่สุด และไม่พบลักษณะ Multiple insertion of basic amino acids บริเวณ cleavage site บนยีน HA นอกจากนี้ยังได้ทำการจำแนกไวรัส H3N2 ได้เพิ่มเติม และไม่พบว่ามีการกลายพันธุ์ข้ามสามพันธุ์จากคนไปสัตว์ปีกแต่อย่างใด อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกในประเทศไทย มีจำนวนลดลง ตัวอย่างตรวจที่ได้จากพื้นที่ระบาดก็มีจำนวนลดลง ทางโครงการจึงขอขยายระยะเวลาออกไป จนกว่าจะเก็บตัวอย่างไวรัสไหวัดนกได้ครบตามจำนวนที่เสนอไว้ โดยไม่ขอรับการสนับสนุนงบประมาณเพิ่มเติม

5. การค้นหาองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อไข้หวัดนก

ในการศึกษาการศึกษาบทบาทของ quasispecies ของเชื้อไข้หวัดนก (H5N1) ต่อการเปลี่ยน host และ host susceptibility นั้นผู้วิจัยได้ทำการเก็บเชื้อจาก cloacal swabs นกปากห่างที่เก็บได้ตั้งแต่ปี 2004-2006 จำนวน 364 โคลน พบอัตราการเกิด quasispecies ได้ตั้งแต่ 30%-60% และสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะเบสที่ได้ ได้แก่ major population ซึ่งหมายถึง รูปแบบของ

ลำดับเบสที่พบมากที่สุดจากโคลนทั้งหมดที่ทดสอบ และที่เหลือเป็น minor population รวมทั้งพบ mutation เกิดทั้งแบบ substitution และ/หรือ deletion ตั้งแต่ 1 ตำแหน่ง จนถึง 8 ตำแหน่ง โดยใน major population (ปี 2004-2005) มี sequence ของ NA gene ที่เหมือนกัน (identical) และแยกกลุ่มอย่างชัดเจนกับไวรัสที่มีการรายงานพบในประเทศอื่น แสดงให้เห็นว่าการระบาดในปี 2005 เนื่องมาจากเชื้อที่มีอยู่แล้วในปี 2004 โดย ส่งถ่ายไวรัสต่อมาในการระบาดปี 2005 ในนกปากห่าง colony เดิม และเป็นไปได้ว่ามีนกปากห่างจำนวนหนึ่งใน colony ของบึงบอระเพ็ดเป็น reservoir ตั้งแต่ปี 2004 ส่วนใน minor population ที่ถูกส่งถ่ายไปยังปีถัดไป มีอัตราส่วนเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาบทบาทของ quasispecies ต่อการแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ของนกอยู่ในระหว่างดำเนินการ จึงยังไม่ได้ข้อสรุป แต่พบ quasispecies ในรูปแบบที่ binding site เหมือน H5N1 ของคน รวมทั้งทางโครงการยังไม่ประสบผลสำเร็จในการใช้ differentiate primary bronchial epithelial cells เนื่องจากการทดลองด้วย differentiated cell ไป 2 passages พบว่าเซลล์ตายและย้อมไม่ติดสี tubulin ซึ่งเป็น marker ของการสร้าง cilia จึงขอเสนอปรับแผนงานไปใช้ undifferentiated cells แทน เนื่องจากได้ทดลองเบื้องต้นแล้วพบว่า ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนใน primary cells ได้ และหากศูนย์ฯ และคณะกรรมการอนุญาตให้ปรับแผนก็จะดำเนินการต่อทันที

รศ.ศุขธิดา ได้ทำการศึกษาบทบาทของ quasispecies ของเชื้อไข้หวัดนก (H5N1) ต่อการเปลี่ยน host และ host susceptibility โดยทำการศึกษา Quasispecies ของไวรัสใน cloacal swab ใน HA, NA, และ NS : การศึกษา Quasispecies pattern ของ receptor binding site ใน HA พบความหลากหลายสูง ขณะนี้ร่วมวิจัยกับ อ.จักร ในการทำ MD simulation เพื่อดูว่า ความหลากหลายนี้ส่งผลต่อประสิทธิภาพการจับ SA2-3 หรือ SA2-6 หรือไม่ ส่วน pattern ของ NS ก็มีความหลากหลายค่อนข้างสูง แต่ยังไม่มีแนวทางการทดสอบบทบาทความหลากหลายนี้ต่อความรุนแรงของไวรัส สำหรับ pattern ของ NA ได้ร่วมงานกับ อ.สุพจน์ ทำ MD simulation เพื่อทำนายบทบาทของความหลากหลายต่อการจับของยา Oseltamivir พบว่า quasispecies บางลักษณะ ลดประสิทธิภาพการจับของยา จึงเป็นไปได้ว่า การใช้ยารักษาผู้ติดเชื้อ H5N1 จากนกปากห่างอาจไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

6. ด้านการจัดการความรู้ (KM)

เพื่อให้การควบคุมและป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพและทันต่อสถานการณ์เร่งด่วนและรองรับการเกิดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคต ในขณะที่ประเทศไทย ยังไม่มีมาตรฐานของระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อในแบบบูรณาการทั้งในคนและสัตว์ ทั้งจากหน่วยงานของภาครัฐและเอกชน ดังนั้นประเทศไทยจึงควรมีการรวบรวมแนวคิด ข้อมูลทางวิชาการ รวมทั้งเครือข่ายนักวิจัยและการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคแบบบูรณาการขึ้น เพื่อสนับสนุนการดำเนินงานของระบบเฝ้าระวังโรค เพื่อให้ประเทศไทยมีระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่เข้มแข็งและมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการให้ทุนเพื่อจัดทำเอกสารข้อเสนอเชิงนโยบาย เรื่อง “ระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ของประเทศไทย” ภายใต้การบริหารจัดการโดย มูลนิธิสาธารณสุขแห่งชาติ และมี พ.อ. ผศ. นพ. ราม รังสินธุ์ สังกัดวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า เป็นหัวหน้าโครงการ โดยมีระยะเวลาโครงการ 1 ปี ตั้งแต่เดือนกันยายน 2550 – เดือนสิงหาคม 2551 งบประมาณ 2.4 ล้านบาท โดยจะมีรายงาน 5 หัวข้อหลัก ดังนี้

1. สถานการณ์ปัจจุบันของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (Emerging infectious disease)
   - การทบทวนสถานการณ์ปัจจุบันของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่
   - กรอบแนวคิดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในปัจจุบัน (Existing diseases)
   - แนวโน้มการเกิดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (Potential diseases) ภายในประเทศและจากต่างประเทศ
   - ความครอบคลุมและการจัดลำดับความสำคัญของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในประเทศไทย(Disease priority)
   - คำจำกัดความ (Disease definition) ของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ของประเทศไทย
   - การวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาดจากโรคติดเชื้ออุบัติใหม่
2. การทบทวนระบบการเฝ้าระวังการเกิดโรคในคนและในสัตว์ (Existing disease surveillance system) ของประเทศไทย และระดับนานาชาติ
   - องค์ประกอบของระบบการเฝ้าระวังโรคระบาดในคนและในสัตว์
   - ระบบเครือข่ายข้อมูลทางด้านสาธารณสุขของคน (Human health information system)
   - ระบบเครือข่ายข้อมูลทางด้านสาธารณสุขในสัตว์ (Animal Health information system)
   - ระบบข้อมูลเชิงภูมิศาสตร์ และเทคโนโลยีของระบบการเฝ้าระวังโรค
   - ระบบเครือข่ายทางห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคระบาดในคนและในสัตว์
   - ระบบสนับสนุนการเฝ้าระวังโรค และระบบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
3. การทบทวนวรรณกรรมและระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ปัจจุบัน
   - องค์กรผู้รับผิดชอบระบบเฝ้าระวังโรคภาพรวมของประเทศ
   - สถานการณ์ปัจจุบันของการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในคน เช่น ข้อมูลการสัมภาษณ์เจ้าหน้าที่ผู้ดูแลระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในคน
   - สถานการณ์ปัจจุบันของการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในสัตว์ เช่น ข้อมูลการสัมภาษณ์เจ้าหน้าที่ผู้ดูแลระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในสัตว์
   - การบริหารจัดการระบบเครือข่ายการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ภายในประเทศ
   - การบริหารจัดการระบบเครือข่ายการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ภายนอกประเทศ
4. แนวทางการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่
   - แนวทางการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในคน
   - แนวทางการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในสัตว์
   - แนวทางการพัฒนาเทคโนโลยีทางห้องปฏิบัติการและเครือข่ายห้องปฏิบัติการ เพื่อการสนับสนุนการเฝ้าระวังโรค
   - แนวทางการพัฒนาการพัฒนากำลังคน เพื่อการรองรับระบบเฝ้าระวังโรค
   - แนวทางการพัฒนาระบบเทคโนโลยีสารสนเทศ เพื่อการสนับสนุนการเฝ้าระวังโรค
   - แนวทางการบูรณาการระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ในอนาคตทั้งในคนและในสัตว์
5. ข้อเสนอแนวนโยบาย “ระบบการเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ของประเทศไทย” ในมุมมองของระบาดวิทยาและการจัดการระบบด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่

โครงการฯ ได้เสนอ แนวทางการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ มีประเด็นสำคัญดังต่อไปนี้

1. การประสานข้อมูลการเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ในสัตว์ ให้อยู่ในการบริหารจัดการของระบบเฝ้าระวังโรคในคน โดยถือเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อในคน

2. การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจทางห้องปฏิบัติการของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ ทั้งในคนและสัตว์ รวมถึงการเสริมศักยภาพการอำนวยการการส่งตรวจตัวอย่างที่ได้จากการเฝ้าระวังและการสอบสวนโรคให้อยู่ในการบริหารจัดการของระบบเฝ้าระวังโรคในคน

3. การใช้เทคโนโลยีการสื่อสารที่ทันสมัย เพื่อเพิ่มศักยภาพการรายงานจากพื้นที่เข้าสู่ระบบ โดยอาศัยระบบเทคโนโลยีการสื่อสารพื้นฐานที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องของประเทศไทย

4. การสร้างความรู้ความเข้าใจกับผู้ที่เกี่ยวข้องในเรื่องของหน้าที่ของบุคคลแต่ละระดับที่มีต่อระบบการรายงานโดยเริ่มตั้งแต่ระดับพื้นที่ในหมู่บ้าน สถานพยาบาลต่างๆ ทุกระดับ จนถึงระดับประเทศ โดยใช้หลักการการเรียนรู้แบบมีส่วนร่วม และการจัดการความรู้อย่างต่อเนื่อง เข้ามาใช้เพื่อให้เกิดการรายงานที่มีประสิทธิภาพและมีการตอบโต้ได้อย่างทันท่วงทีในระดับพื้นที่

ข้อเสนอแนวทางการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่นี้ อยู่ระหว่างขั้นตอนการนำเสนอให้ที่ประชุมผู้เชี่ยวชาญและผู้ที่เกี่ยวข้องและมีส่วนได้ส่วนเสียได้พิจารณาให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงให้ได้รูปแบบของข้อเสนอแนวทางการพัฒนาระบบเฝ้าระวังโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่สามารถนำมาใช้บนพื้นฐานของระบบเฝ้าระวังโรคที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน

ทางคณะทำงานยังได้ประชุมหารือเพื่อเลือกโรค EID ที่สำคัญขึ้นมา 10 โรคที่ควร focus ดังนี้ ซาร์ส ไข้หวัดนก ไข้หวัดใหญ่ ไข้สมองอักเสบ Nipa virus, west nile virus โรคมือ เท้า ปาก และอื่นๆ ซึ่งทางโปรแกรม EID จะได้ใช้เป็นแนวทางในการ focus โรคของโปรแกรมต่อไป

ผลการดำเนินงาน

ผลการดำเนินงานในปี 2551 ระยะเวลา 12 เดือน แบ่งเป็น

- Publication 39 เรื่อง
- Prototype product 9 ชุด
- สิทธิบัตร 4 เรื่อง

Publication จำนวน 39 เรื่อง ดังรายละเอียด

1. Uiprasertkul, M., Kitphati, R., Puthavathana, P., Kriwong, R., Kongchanagul, A., Ungchusak, K., Angkasekwinai, S., Chokephaibulkit, K., Srisook, K.,Vanprapar, K. and Auewaraku P.. (2007). Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A (H5N1) Virus in Humans. EMERG INFECT DIS. 13.
2. Buranathai, C., Amonsin, A., Chaisigh, A., Theamboonlers, A., Pariyothorn, N., Poovorawan, Y. (2007). AVIAN INFLUENZA SURVEILLANCE AND MONITORING OF GENETIC VARIATIONS IN THAILAND. AVIAN DISEASES. 51(1 Suppl), 194-200.
3. Chan, K.H., Lam, S.Y., Puthavathana, P., Nguyen, T.D., Long, H.T., Pang, C.M., Chan, K.M., Cheung, C.Y., Seto, W.H., Peiris, J.S.M. (2007). COMPARATIVE ANALYTICAL SENSITIVITIES OF SIX RAPID INFLUENZA A ANTIGEN DETECTION TEST KITS FOR DETECTION OF INFLUENZA A SUBTYPES H1N1, H3N2 and H5N1. J CLIN VIROL. 38(2), 169-171.
4. Louisirirotchanakul, S., Lerdsamran, H., Wiriyarat, W., Sangsiriwut K., Chaichoune, K., Pooruk, P., Songserm, T., Kitphati, R., Sawanpanyalert, P., Komoltri, C., Auewarakul, P., Puthavathana,

P. (2007). ERYTHROCYTE BINDING PREFERENCE OF AVIAN INFLUENZA H5N1 VIRUSES. J CLIN MICROBIOL. 45, 2284–2286.

5. Amonsin, A., Songserm, T., Chutinimitkul, S., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Poovorawan. Y.. (2007). GENETIC CHARACTERIZATION OF INFLUENZA A VIRUS (H5N1) DERIVED FROM NATURALLY INFECTED DOMESTIC CAT AND DOG. ARCH VIROL. 152, 1925-33.
6. Chutinimitkul, S., Suwannakarn, K., Chieochansin, T., Le, Q.M., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Amonsin, A., Landt, O., Songserm, T., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y.. (2007). H5N1 OSELTAMIVIE-RESISTANCE DETECTION BY REAL-TIME PCR USING TWO HIGH SENSITIVITY LABELED TaqMan PROBES. J VIROL METHODS. 139, 44-49.
7. Thitithanyanont A, Engering A, Ekchariyawat P, Wiboon-ut S, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Kum-Arb U, Kanchongkittiphon W, Utaisincharoen P, Sirisinha S, Puthavathana P, Fukuda MM, Pichyangkul S.. (2007). HIGH susceptibility of human dendritic cells to avian influenza H5N1 virus infection and protection by IFN-alpha and TLR ligands. . J IMMUNOL. 179 (8), 5220-7.
8. Yong Poovorawan.. (2007). MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF AVIAN INFLUENZA H5N1 IN THAILAND. SCIENCEASIA. 33(s1), 87-90.
9. Chutinimitkul, S., Songserm, T., Amonsin, A., Payungporn, S., Suwannakarn, K., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Nuansrichay, B., Chieochansin, T., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., (2007). NEW STRAIN OF H5N1 INFLUENZA VIRUSE IN THAILAND. EMERG INFECT DIS. 13, 506-507.
10. Apisarnthanarak, A.,Pilaipan Puthavathana, P. and Mundy, L.M. . (2007). Risk Factors and Outcomes of Influenza A (H3N2) Pneumonia in an Area Where Avian Influenza (H5N1) Is Endemic. INFECT CONT HOSP EP. 28, 479-482.
11. Horthongkham N, Srihtrakul T, Athipanyasilp N, Siritantikorn S, Kantakamalakul W, Poovorawan Y, Sutthent R. . (2007). SPECIFIC ANTIBODY RESPONSE OF MICE AFTER IMMUNIZATION WITH COS-7 CELL DERIVED AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) RECOMBINANT PROTIEN. . J IMMUNE BASED THER VACCINES. 5(1), 10.
12. Thontiravong, A., Payungporn, S., Keawcharoen, J., Chutinimitkul, S., Wattanodorn, S., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., Oraveerakul, K.. (2007). THE SINGLE-STEP MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR DETECTING H5 AND H7 AVIAN INFLUENZA A VIRUSES. TOHOKU J EXP MED. 211(1), 75-79.
13. Tiensin T, Nielen M, Vernooij H, Songserm T, Kalpravidh W, Chotiprasatintara S, Chaisingh A, Wongkasemjit S, Chanachai K, Thanapongtham W, Srisuvan T, Stegeman A.. (2007). Transmission of the highly pathogenic avian influenza virus H5N1 within flocks during the 2004 epidemic in Thailand. J INFECT DIS. 196 (11), Epub 2007 Oct 25.
14. Schunemann, H.J., Hill, S.R., Kakad, M., Bellamy, R., Uyeki, T.M., Hayden, F.G., Yazdanpanah, Y., Beigel, J., Chotpitayasunondh, T., Del Mar, C., Farrar, J., Hien, T.T., Ozbay, B., Sugaya, N., Fukuda, K., Shindo, N., Stockman, L., Vist, G.E., Croisier, A., Nagjdaliyev, A., Roth, C.,

Thomson, G., Zucker, H., Oxman, A.D. (2007). WHO RAPID ADVICE GUILDLINES FOR PHARMACOLOGICAL MANAGEMENT OF SPORADIC HUMAN INFECTION WITH AVIAN INFLUENZA A (H5N1) VIRUS. LANCET INFECT DIS. 7(1), 21-31.

15. Thontiravong, A., Payungporn, S., Keawcharoen, J., Chutinimitkul, S., Wattanodorn, S., Damrongwatanapokin, S., Chaisingh, A., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. and Oraveerakul, K. (2007). The single-step multiplex reverse transcription- polymerase chain reaction assay for detecting h5 and h7 avian influenza a viruses. TOHOKU J EXP MED. 211(1), 75-9.
16. A nationally coordinated laboratory system for human avian influenza A (H5N1) in Thailand: program design, analysis, and evaluation. Kitphati R, Apisarnthanarak A, Chittaganpitch M, Tawatsupha P, Auwanit W, Puthavathana P, Auewarakul P, Uiprasertkul M, Mundy LM, Sawanpanyalert P. Clin Infect Dis. 2008 May 1;46(9):1394-400
17. Pitirat Boonsuk, Sunchai Payungporn, Thaweesak Chieochansin, Rujipat Samransamruajkit, Alongkorn Amonsin, Thaweesak Songserm, Arunee Chaisingh, Pornchai Chamnanpood, Salin Chutinimitkul, Apiradee Theamboonlers, Yong Poovorawan Detection of Influenza Virus Types A and B and Type A subtypes (H1, H3 and H5) by Multiplex Ploymerase Chain Reaction. Tohoku J. Exp. Med., 2008, 215, 247-255
18. Kamol Suwannakarn, Sunchai Payungporn, Thaweesak Chieochansin, Rujipat Samransamruajkit, Alongkorn Amonsin, Thaweesak Songserm, Arunee Chaisingh, Pornchai Chamnanpood, Salin Chutinimitkul, Apiradee Theamboonlers, Yong Poovorawan Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. Journal of Virological Methods 2008, 3 June
19. Prasert Auewarakul, Arunee Thitithanyanont, Anucha Apisarnthanarak, Pokrath Hansasuta, Porntippa Lekcharoensuk and Pilaipan Putvathana. Bangkok International Conference on Avian Influenza 2008. Expert Rev. Vaccines 7(3), 293-298 (2008)
20. Thathaisong U, Maneewatch S, Kulkeaw K, Thueng-in K, Poungpair O, Srimanote P, Songserm T, Tongtawe P, Tapchaisri P, Chaicumpa W. (2008) Human monoclonal single chain antibodies (HuScFv) that bind to the polymerase proteins of influenza A virus. Asian Pac J Allergy Immunol; 26: 23-35.
21. Suptawiwat, O., Kongchanagul, A., Chan-It, W., Thitithanyanont, A., Wiriyarat, W., Chaichuen, K., Songserm, T.,Suzuki, Y., Puthavathana, P., Auewarakul, P.. (2008). A simple screening assay for receptor switching of avian influenza viruses. J CLIN VIROL. , Epub ahead of print
22. Suwannakarn, K. et al. (2008) Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. J GEN VIROL; 152: 25-31
23. Boonsuk, P. et al. (2008) Detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, and H5) by multiplex polymerase chain reaction.Tohoku J Exp Med. 2008 Jul;215(3):247-55
24. Apisarnthanarak, A. et al. (2008). Outbreaks of Influenza A Among Nonvaccinated Healthcare Workers: Implications for Resource-Limited Settings. Infect Control Hosp Epidemiol 2008;29:777-80

25. Apisarnthanarak, A. et al. (2008). Impact of Knowledge and Positive Attitudes About Avian Influenza (H5N1Virus Infection) on Infection Control and Influenza Vaccination Practices of Thai Healthcare Workers. Infect Control Hosp Epidemiol 2008;29 472-474
26. Apisarnthanarak, A. et al. (2007). Issues Relevant to the Adoption and Modification of Hospital Infection-Control Recommendations for Avian Influenza (H5N1 infection) in Developing Countries: CID 2007:45
27. Kitphati, R. et al. (2008). A Nationally Coordinated Laboratory System for Human Avian Influenza A (H5N1) in Thailand: Program Design, Analysis, and Evaluation CID 2008:46
28. Chutinimitkul, S. et al Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. Virus Research 132 (2008) 122–131
29. Chutinimitkul, S. et al .Genetic characterization of H1N1, H1N2, and H3N2 swine influenza virus in Thailand. Archives of Virology, 2008 vol153:6
30. Suptawiwat, O. et al.(2008). A simple screening assay for receptor switching of avian influenza viruses. J Clin Virol. 2008 Jun;42(2):186-9
31. Aeuwarakul, P. et al.(2008). An avian influenza H5N1 virus that binds to human-type receptor: Journal of Virology p. 9950-9955, Vol. 81
32. Kongchanakul, A. et al.(2008). Positive selection at the receptor-binding site of haemagglutinin H5 in viral sequences derived from human tissues. J Gen Virol;89
33. Aeuwarakul, P. et al.(2008). Bangkok International Conference on Avian Influenza 2008.Expert Rev Vaccines.Vol 7: 293-298
34. Chaichoune, K. et al. Indigenous sources of 2007-2008 H5N1 avian influenza outbreaks in Thailand. In preparation.
35. Normile D.(2008). Flu Virus Research Yields Results But No Magic Bullet for Pandemic. SCIENCE. Vol 319:1178-1179
36. Maneewatch S, Thanongsaksrikul J, Songserm T, Thueng-in K, Kulkeaw K, Thathaisong U, Srimanote P, Tongtawe P, Tapchaisri P, Chaicumpa W. **(Submitted)** Human single chain antibodies (HuScFv) that neutralize homologous and heterologous influenza A virus subtypes. Submitted to and revised for *Antivirus therapy*.
37. Poungpair O, Chaicumpa W, Kulkeaw K, Thueng-in K, Srimanote P, Songserm T, Lekcharoensuk P, Tongtawe P, Tapchaisri P. **(Submitted)** Human Single Chain Monoclonal Antibody (HuScFv) That Recognizes Matrix Protein (M1) of Heterologous Influenza A Virus Subtypes. Submitted to *BMC Infectious Disease*
38. Apisarnthanarak, A. and Mundy, LM. **(Submitted)** Use of Antiviral therapeutics for Avian Influenza (H5N1) at Two Thai Medical Centers: Survey findings and implications for pandemic preparedness

สิทธิบัตร จำนวน 4 ฉบับ ดังนี้

ปี งปม. ที่ยื่นขอ	วันที่ยื่นขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	ประเภทคำขอ	ชื่อสิ่งประดิษฐ์	ชื่อผู้ประดิษฐ์
2551	31/10/2550	701005489	ไทย	สิทธิบัตร	เซลล์ฮัยบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วน Hemaggulutinin ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ subtype H5	นางสาวธารารัชต์ ธารากุล, นายสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, นายจรินทร์ เทพทัย
2551	6/11/2550	701005627	ไทย	สิทธิบัตร	ชุดตรวจไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5 และชนิด influenza A	นางสาวธารารัชต์ ธารากุล, นายสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, นางศิริทิพย์ วิริยะจิตรา
2551	11/6/2551	801002945	ไทย	สิทธิบัตร	กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์นิวรามินิเดสในยีสต์และการใช้	นางสาวสุกัญญา ยงเกียรติสกุล นางสาวลิลี่ เอื้อวิไลจิตร นางสาวเกตุวดี บุญญาภากร
2551	31/10/2550	701005489	ไทย	สิทธิบัตร	เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วน Hemagglutinin ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ subtype H5	นางสาวธารารัชต์ ธารากุล, นายสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, นายจรินทร์ เทพทัย

Prototype products จำนวน 9 ชุด

ประเภทต้นแบบผลิตภัณฑ์/เทคโนโลยี	ชื่อต้นแบบผลิตภัณฑ์/เทคโนโลยี	การนำไปใช้ประโยชน์
1. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับอุตสาหกรรม	ชุดตรวจต้นแบบสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกกลุ่ม H5 โดยวิธีไบโอเซนเซอร์ (H5 Biosensor)	ชุดตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 ที่กำลังแพร่ระบาดอยู่ทั่วโลก จากการประเมินประสิทธิภาพในการตรวจสอบ พบว่าชุดตรวจมีความไวในการตรวจสูงกว่าชุดตรวจแบบเดิมถึง 100 เท่า โดยใช้เวลาตรวจเพียง 15 นาที ได้ทำการผลิตระดับอุตสาหกรรมในชื่อ INNOVA Platinum® H5 Biosensor และ AIV Biosensor (ราคาประมาณชุดละ 300 บาท)

ประเภทต้นแบบผลิตภัณฑ์/เทคโนโลยี	ชื่อต้นแบบผลิตภัณฑ์/เทคโนโลยี	การนำไปใช้ประโยชน์
2. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	ชุดตรวจต้นแบบสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกกลุ่มเอโดยวิธีไบโอเซนเซอร์ (AIV Biosensor)	ชุดตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5
3. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	ชุดตรวจต้นแบบสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดนกกลุ่ม H5 โดยวิธี lateral flow immunochromatography	ชุดตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5
4. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	ชุดตรวจไวรัส H1-H3-H5 โดยวิธี Multiplex RT-PCR	ชุดตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H3-H5
5. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	ชุดตรวจไวรัส H1-H3-H5 โดยวิธี Multiplex TaqMan real-time RT-PCR	ชุดตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1-H3-H5 แบบทราบจำนวน
6. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	Phage clones ที่มี human ScFv ที่เฉพาะต่อ recombinant และ native HA,NA และ M1 ของไวรัส H5N1	ผลิต therapeutic human ScFv anti-HA และ NA
7. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	human monoclonal ScFv ต่อ M1	ใช้ในการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการรักษา
8. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	transbody ต่อ M1	ใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งแอนติบอดีเพื่อใช้ในการรักษา
9. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	เทคนิค phage bio-panning และ phage rescuing เพื่อให้ได้ high affinity phage clones ที่มี HuScFv ต่อ HA, NA, และ M1 ของ influenza A virus	ใช้ในการคัดเลือกphage clones ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของไวรัส H5N1