เดือนมีนาคม 2553

โครงการ กลไกการเกิดโรคในระดับโมเลกุล และการหาแนวทางป้องกันต่อการติดเชื้อ ***Burkholderia pseudomallei***

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน

สังกัด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วันที่ประชุม 8 มีนาคม 2553

สรุปการประชุมโดยย่อ

- คณะผู้วิจัยได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วน ได้แก่

  ส่วนที่ 1 เป็นการค้นหาองค์ประกอบของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เป็น virulent factor และได้ผลค่อนข้างชัดเจนว่า LPS และ flagellin มีบทบาทต่อความรุนแรงของเชื้อ

  ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษายีน Sigma N (rpoN) ต่อความ virulence ของเชื้อ ซึ่งคณะผู้วิจัยสามารถสร้าง rpoN2 mutant และ complement strain ได้สำเร็จ ซึ่ง rpoN2 เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน และเกี่ยวข้องกับ Multinucleated Giant Cell formation และ Biofilm formation (virulent properties)

  ส่วนที่ 3 เป็นการศึกษากลไกการใช้ CpG ร่วมกับ liposome ในการป้องกันการติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า CpG ปกป้องหนูได้ในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงบทบาทของ CpG ต่อ adaptive immune response ได้อย่างชัดเจน
- คณะผู้วิจัยได้ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์แล้ว มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว 3 ฉบับ อยู่ในระหว่างรอพิจารณา 1 ฉบับ และอยู่ในระหว่างเตรียมอีก 2 ฉบับ ตรงตามที่คาดการณ์ไว้

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม

1. **ส่วนที่ 1** ควรระบุว่า mutants ต่างๆ เกิด mutation ที่ยีนใด และเชื้อที่ให้ phenotype rough เกี่ยวข้องกับ virulence phenotype อย่างไร
2. **ส่วนที่ 2** ควรศึกษาว่า sigma N2 อยู่บน PAI หรือไม่ และดูว่าจะนำข้อมูลเรื่อง amino acid utilization ของ rpoN2 mutant มาต่อกันเป็น pathway ได้อย่างไร รวมทั้งน่าจะศึกษา rpoN ในแง่บทบาทในสิ่งแวดล้อม และเปรียบเทียบกับ rpoN ใน *B.mallei* เพราะ *B.mallei* อยู่ในสิ่งแวดล้อมไม่ได้ ต้องอยู่ใน host เท่านั้น นอกจากนี้ น่าจะทดสอบ Rpo N mutants และศึกษา virulence ในสัตว์ทดลอง
3. **ส่วนที่ 3** CpG และ Protection experiment มี variation ได้มาก หากผู้วิจัยลด experimental protocol ลงน่าจะเห็นข้อมูลที่น่าสนใจชัดขึ้น นอกจากนี้ ยังน่าจะศึกษาบทบาท ของ CTL ภายหลังจากที่ฉีด CpG ODN และ challenge แล้ว นอกเหนือจาก IFN-9 และ IL-4 รวมทั้งควรศึกษา specific immune response โดยดู Th1 cytokine เช่น IL-18 ด้วย การศึกษาเพิ่มเติมจะทำให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์มากขึ้น เพื่อนำไปสู่การออกแบบวัคซีนหรือ intervention measure ที่ลดอัตราการตายได้

โครงการ การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของระบบการส่งสัญญาณผ่านทาง Toll-like receptor (TLR) ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่ได้รับเชื้อ ***Burkholderia pseudomallei***

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ

สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วันที่ประชุม 8 มีนาคม 2553

สรุปการประชุมโดยย่อ

- คณะผู้วิจัยได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับ TLR pathway ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่ถูก infect ด้วยเชื้อ *B.pseudomallei* wild type เปรียบเทียบกับ LPS mutant ด้วยเทคนิค gene array พบว่า LPS mutant สามารถกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง cytokines ได้สูงกว่า wild type
- จากการ validate ผลการทดลองจาก TLR gene array ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า genes ที่น่าจะเกี่ยวข้องมี 4 ยีน คือ *il-1β, irf 7, cdf 3* และ *lta*
- คณะผู้วิจัยเลือกศึกษายีน คือ *il-1β* และ *irf 7* ก่อน และพบว่า IL-1β ไม่สามารถทำลายเชื้อ *B.pseudomallei* ได้โดยตรง แต่อาจจะทำโดยผ่านการควบคุมยีนอื่น และอยู่ระหว่างศึกษาว่า irf7 เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของ LPS mutant ในเซลล์แมคโครฟาจอย่างไร รวมทั้งเกี่ยวข้องกับ MyD88 pathway อย่างไร

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม

1. องค์ความรู้ที่ได้ และจะนำไปสู่ความเข้าใจใน innate immune system ในบทบาทของการ interact กับเชื้อ *B. pseudomallei* ในการก่อโรค ซึ่งอาจนำไปสู่ความเข้าใจ CpG vaccination ของ อ.สุรศักดิ์ ได้
2. ควรศึกษากระบวนการ activate TLR2 และ TLR4 โดยการ silence MD-2 ซึ่งเป็น receptor ของ LPS (TLR4)
3. *B.pseudomallei* เหนี่ยวนำให้เกิดการ regulate หลายยีน (เป็น pathway ที่ complex) จึงควรดูบทบาททาง TLR2, TLR4, TLR5 และดู cytokine ที่สำคัญคือ IFN-8 ด้วย gene expression ในหนู ในคน หรือใน culture จะแตกต่างกัน ดังนั้น จึงต้องนำข้อมูลที่ได้มาสรุปอย่างระมัดระวัง

โครงการ **การวิเคราะห์ virulence factors ของ *Burkholderia pseudomallei* ที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดภายในเซลล์ฟาโกซัยท์**

หัวหน้าโครงการ **รศ.ดร. สุนีย์ กอรปศรีเศรษฐ์**

สังกัด **คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล**

วันที่ประชุม **8 มีนาคม 2553**

สรุปการประชุมโดยย่อ

- การดำเนินงานวิจัย จะแบ่งเป็น 2 ส่วนได้แก่ ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษายีนที่อยู่ใน Bsa type III secretion system (T3SS) และส่วนที่ 2 เป็นการศึกษายีน *bimA*

  ส่วนที่ 1 คณะผู้วิจัยได้สร้าง bpss1516 mutant ได้สำเร็จ และได้ characterize mutant ด้วยการทำ growth curve analysis พบว่าไม่แตกต่างจาก wild type และได้ทดสอบการอยู่รอดใน infected cell ของ mutant ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี plaque assay ซึ่งอยู่ระหว่างรอยืนยันผล

  ส่วนที่ 2 คณะผู้วิจัยได้ศึกษา heterogeneity ของ *bimA* จาก strains ต่างๆ ของเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า *bimA* ของ Australian strains บางสายพันธุ์ มี homology (95%) กับเชื้อ *B.mallei* นอกจากนี้ยังสามารถระบุ Domain ของ BimA ซึ่งเกี่ยวข้องกับ actin-based motility โดยการทำ deletion พบว่า WH2 และ PDST domains จำเป็นต่อการสร้าง actin polymerization assay

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม

ส่วนที่ 1 ควรพิสูจน์ว่าโปรตีนเป้าหมายเข้าเซลล์ของ host ได้จริงผ่านทาง T3SS หรือเกิด cell invasion โดยแบคทีเรียโดย titrate MOI; inhibit phagocytosis และศึกษา kinetics ของ cell invasion เพื่อเลือก condition ที่เหมาะสม โดยให้ host และ cell แตก รวมทั้งควรศึกษา bpss1516 mutant เพื่อดูว่า effector protein ใน BsaT3SS นี้ localize อยู่ที่ใด นอกจากนี้ เนื่องจาก T3SS มี 3 แบบ น่าจะเปรียบเทียบว่าที่ผู้วิจัยศึกษาแบบที่ 3 จะมี interaction กับอีก 2 แบบหรือไม่ และเมื่อศึกษาตามที่ทำอยู่จนเสร็จสิ้นแล้ว จะได้ข้อสรุปรวมทั้งระบบของ T3SS หรือไม่

ส่วนที่ 2 น่าจะมีการศึกษาบทบาทของ actin ว่าเกี่ยวข้องกับ virulence ของเชื้อนี้อย่างไร รวมทั้งน่าจะมีความร่วมมือกับ Biochemist ที่สนใจเกี่ยวกับ actin chemistry เพื่อศึกษาว่า เหตุใด actin polymerization จึง propel ได้ รวมทั้งการศึกษา equilibrium shift ระหว่าง G และ F actin

โครงการ **การตรวจหาปัจจัยที่ทำให้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำไขสันหลังมีความรุนแรงในการก่อโรค**

หัวหน้าโครงการ **รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ**

สังกัด **คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล**

วันที่ประชุม **11 มีนาคม 2553**

สรุปการประชุมโดยย่อ

- โครงการได้ทำการศึกษาเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคจำนวน 10 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะลายพิมพ์ DNA และการมี 7 bp insertion ที่ยีน *pks15/1* โดยดูอัตราการรอดชีวิตภายในเซ็ลล์ THP-1 ความสามารถในการสร้าง MMP-9, VEGF, TNF-alpha และ apoptosis เปรียบเทียบกับเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv และเชื้อสายพันธุ์วัคซีน BCG ผลที่ได้พบว่า สายพันธุ์ Nonthaburi สามารถกระตุ้นการผลิต TNF-α และ MMP-9 ได้ในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังพบว่าสายพันธุ์ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการ apoptosis ได้ดีที่สุดคือ *M. bovis* BCG ซึ่งขณะนี้ได้ตีพิมพ์บทความทางวิชาการในวารสารนานาชาติแล้ว 1 ฉบับ และอยู่ระหว่างการเตรียม manuscript อีก 1ฉบับ

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม :

1. ควรเพิ่ม positive control เช่น THP-1 cell กับ LPS ในการทำทดสอบหา level ของ MMP-9, TNF-α, VEGF และ apoptosis เพื่อเป็นการลด background และยืนยันได้ว่า เชื้อที่นำมาศึกษาสามารถกระตุ้นการผลิต MMP-9, TNF-α, VEGF ได้อย่างมีนัยสำคัญ และเนื่องจากเชื้อวัณโรค Beijing strain มีความหลากหลายสูง ในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกมาเพียง 2 ตัว ซึ่งอาจทำให้ผลที่ได้ไม่เหมือนที่มีรายงานในการ ศึกษาจากกลุ่มอื่นๆ
2. ควรเพิ่มการทดสอบ apoptosis ด้วยวิธีอื่นๆ เพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ได้ เช่น วัดด้วย Flow cytometry, Faq, ดู morphology ของเซลล์
3. อาจนำ Stage ของผู้ป่วยแต่ละรายที่เก็บตัวอย่างได้ไปศึกษาดูความสัมพันธ์กับชื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยดูการกระจายของเชื้อแต่ละสายพันธุ์
4. นอกจาก THP-1 เซลล์ แล้ว ควรทำการศึกษากับ HUVEC เซลล์เพิ่มเติม หรือหาเซลล์อื่นๆ ที่ target ไปใน blood brain barrier ได้ดีกว่า ซึ่งอาจจะเห็นผลการศึกษาของ VEGF เปลี่ยนแปลงไป
5. อาจลองเพิ่มเติมการทำ MOI ที่ dilution อื่นๆ เพื่อดูผลการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ Nontaburi เป็นเชื้อที่ไม่ดื้อยา หากแต่มีการกระจายตัวสูงในประชากรที่ติดเชื้อ ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้ อาจจะพิจารณาการรวมสายพันธุ์ตาม spoligotyping ที่ได้ เพื่อเป็น Preliminary study ของ เพื่อทำการศึกษาความเป็นมาของเชื้อต่อไป

โครงการ **การพัฒนาระบบพลาสมิดสำหรับการผลิตไวรัสไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกจากเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิค reverse genetics**

หัวหน้าโครงการ **รศ.สพ.ญ.ดร.พรทิพภา เล็กเจริญสุข**

สังกัด **คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**

วันที่ประชุม **18 มีนาคม 2553**

สรุปการประชุมโดยย่อ

- หลังการแยกและเพิ่มจำนวนเชื้อไข้หวัดใหญ่ H3N2 จากทางเดินหายใจส่วนบนของหมู ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน NS, PB2, NP ของเชื้อดังกล่าวออกมา และนำไปเป็นส่วนผสมในการสร้างไวรัสร่วมกับสารพันธุกรรมของไวรัส PR8 ในเซลล์ 293T+MDCK จากการ rescue ไวรัสพบว่า ไวรัสทุกตัวมีคุณสมบัติในการติดเชื้อยกเว้นตัวที่มียีน NP ของเชื้อที่แยกได้ (5.1NP) เมื่อทำ growth curve ซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า ไวรัสที่มียีน NS (5.1NS) สามารถเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับไวรัส PR8 โดยที่ในช่วงแรกมีการเจริญเติบโตดีกว่าเล็กน้อย อย่างไรก็ตามได้มีการแนะนำโดยผู้ประเมินว่าให้ลองเพิ่ม titer ในเซลล์ไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้ปริมาณที่สูงพอก่อนที่จะแยกยีนออกมา ซึ่งมีการดำเนินการแล้วพบว่า ไม่สามารถเพิ่ม titer ของไวรัสได้ คณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนเชื้อเป็น H1N1 สายพันธุ์ ATCC 3222 ซึ่งมี titer ค่อนข้างสูง แล้วทำการแยกยีน NS, PB2 และ NP ไปสร้างไวรัสเช่นเดิม ซึ่งพบว่า ไวรัสทุกตัวที่สร้างมีคุณสมบัติในการติดเชื้อ และจากการทำ growth curve พบว่า ไวรัสที่มียีน NS (3222NS) มีการเจริญเติบโตดีกว่าไวรัส PR8 ในทุกช่วงเวลาที่ทำการทดลอง อย่างไรก็ตามเมื่อทำการนำยีน HA และ NA จากไวรัสต่าง subtype ได้แก่ H5N1 และ H3N2 เข้าไปเป็นส่วนผสมในการ transfection เพื่อสร้างไวรัสใหม่ ปรากฏว่าไม่ประสบความสำเร็จ

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม :

1. เนื่องจากโครงการมีข้อจำกัดทั้งด้านเวลาและทรัพยากร ผู้เชี่ยวชาญจึงขอให้คณะผู้วิจัยรวบรวมข้อมูลที่พบว่า ยีน NS มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส PR8 มาเรียบเรียงเป็น manuscript เพื่อตีพิมพ์ผลงาน โดยหากพบว่ามีข้อมูลใดที่ยังขาดอยู่ ให้รีบดำเนินการทดลองเพิ่มเติม เพื่อให้ผลงานมีความสมบูรณ์มากขึ้น ทั้งนี้ผู้เชี่ยวชาญได้เสนอแนวคิดในการทดลองโดยควรหาว่า determinant ใด หรือ mutation ในตำแหน่งใดของ NS ที่ช่วยให้ไวรัส PR8 เพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น หรือ มีผลต่อการปรับตัวของไวรัสให้เข้ากับเซลล์สัตว์เลี้ยวลูกด้วยนม โดยต้องยืนยันว่าคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นในเซลล์ Vero ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนด้วย
2. จากผลการดำเนินงานที่พบว่า ไวรัส H5N1 ที่สร้างจากระบบ VR3222 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าไวรัสที่ได้จากระบบ PR8 นั้น ในแง่การเจริญเติบโต อาจแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าไวรัส VR3222 อาจถูกใช้เป็น master donor virus ตัวใหม่ได้ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยต้องหาข้อมูลด้านความปลอดภัยของไวรัสดังกล่าวมาสนับสนุนเพิ่มเติมอีกมาก

โครงการ **การเลือกตอบสนองต่อ epitopes ของ hemagglutinin ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในผู้ติดเชื้อ**
หัวหน้าโครงการ **ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส**
สังกัด **คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**
วันที่ประชุม **18 มีนาคม 2553**

สรุปการประชุมโดยย่อ

- โครงการได้ดำเนินการสร้างไวรัสด้วยเทคนิครีเวอร์สเจเนติกส์ให้มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ ในบริเวณ antigenic site 4 ตำแหน่ง ได้แก่ S124D, E126D, K152N, K140N และ นอก antigenic site ได้แก่ Y137H site สำหรับใช้เป็น Negative control ได้สำเร็จ ถึงแม้ว่าในระยะแรกของโครงการจะใช้เวลาในการเรียนรู้และฝึกหัดวิธีการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ การติดตามการเจริญเติบโต และการใช้เทคนิครีเวอร์สเจเนติกส์ ในขณะที่ได้มีการเรียนรู้การทำ Hemagglutination inhibition (HI) และ Microneutralization กับห้องปฏิบัติการที่มีประสบการณ์ด้วย เมื่อมีการนำไวรัสรูปแบบต่างๆ มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยที่รอดชีวิต (survivor) เพื่อศึกษาการเลือกตอบสนองต่อ epitope ด้วยวิธี microneutralization พบว่าไม่สามารถแปลผลการทดลองได้ว่า มีการเลือกตอบสนองต่อ epitope ใด epitope หนึ่งหรือไม่ ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่มีความเชี่ยวชาญในเทคนิคดังกล่าว

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม :

1. เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่มีความเชี่ยวชาญในเทคนิค microneutralization มากนักประกอบกับปริมาณซีรัมของผู้รอดชีวิตที่มีอยู่จำกัด และเป็นซีรัมที่มีค่ามาก ผู้เชี่ยวชาญจึงขอให้ทำการทดสอบซ้ำ โดยปรับการศึกษาไปใช้ซีรัมจากหนูทดลองที่ได้รับ inactivated wild type virus สายพันธุ์ KAN1 เพื่อให้แน่ใจก่อนว่า ผลการทดสอบจากการใช้เทคนิค microneutralization มีความน่าเชื่อถือเพียงพอ แล้วจึงใช้ซีรัมผู้ป่วยที่รอดชีวิตภายหลัง
2. นอกจากนี้เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดว่าสัตว์ปีกซึ่งเป็น natural host ของไวรัส H5N1 มี immune bias หรือไม่ ดังนั้นหากผู้วิจัยต้องการดำเนินงานวิจัยดังกล่าวต่อไป น่าจะลองทำการทดสอบกับซีรัมของไก่เพิ่มเติมด้วย

โครงการ **การพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีน influenza (H5N1)**
หัวหน้าโครงการ **ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุทรา**
สังกัด **คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี**

วันที่ประชุม **18 มีนาคม 2553**

สรุปการประชุมโดยย่อ

- โครงการมีความมุ่งหวังที่จะพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงไวรัส H5N1 reverse genetic โดยใช้เซลล์ MDCK บน Microcarrier ซึ่งได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว แต่มีอุปสรรคคือไม่มีห้องปฏิบัติการ BSL3 สำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัส ทั้งนี้ สวทช.ได้ประสานงานให้สามารถเข้าใช้ห้องปฏิบัติการ BSL3 ที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดลได้แล้ว แต่ยังมีปัญหาคือไม่สามารถนำ fermenter ไป operate ใน biosafety cabinet ได้ ผู้วิจัยจึงขอปรับเปลี่ยนแผนเป็นการผลิต Viral like particles ที่มีการผลิต HA NA และ M ของไวรัส H5N1 reverse genetics แทน เพื่อหลีกเลี่ยงการดำเนินการใน BSL3

ข้อเสนอแนะของที่ประชุม:
คณะอนุกรรมการ เห็นด้วยกับการปรับโครงการเป็น Virus like particle โดยใช้งบประมาณเท่าเดิม โดยให้นักวิจัยทำแผนงานวิจัยมานำเสนอในที่ประชุมคณะกรรมการเทคนิคโปรแกรมฯต่อไป