

การศึกษาด้านลักษณะ วิวัฒนาการเชิงโมเลกุล และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัส

ไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในประเทศไทย



นางสาวจาริกา มากคช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

551663

GENOME CHARACTERIZATION, MOLECULAR EVOLUTION AND ANTIBODY
RESPONSE AGAINST INFLUENZA A VIRUS IN THAILAND

Miss Jarika Makkoch

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

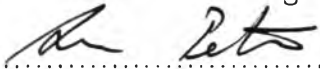
Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University




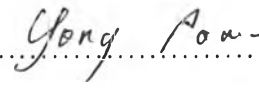
Thesis Title GENOME CHARACTERIZATION, MOLECULAR
EVOLUTION AND ANTIBODY RESPONSE AGAINST
INFLUENZA A VIRUS IN THAILAND
By Ms. Jarika Makkoch
Field of Study Biomedical Sciences
Thesis Advisor Professor Yong Poovorawan, M.D.

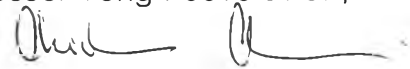
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Doctoral Degree

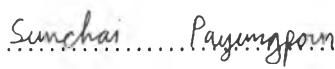

.....Dean of the Graduate School
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Kanisak Oraveerakul, D.V.M.)


.....Thesis Advisor
(Professor Yong Poovorawan, M.D.)


.....Examiner
(Associate Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.)


.....Examiner
(Assistant Professor Sunchai Payungporn, Ph.D.)


.....External Examiner
(Associate Professor Chantapong Wasi, M.D.)

จาริกา มากคช: การศึกษาด้านลักษณะ วิวัฒนาการเชิงโมเลกุล และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ในประเทศไทย. (GENOME CHARACTERIZATION, MOLECULAR EVOLUTION AND ANTIBODY RESPONSE AGAINST INFLUENZA A VIRUS IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, 144 หน้า.

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นเชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในกลุ่ม Influenza-like illness (ILI) ในมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ชนิดอื่นเช่น สัตว์ปีก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น สุนัข แมว เสือหรือสุนัข เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีการแพร่ระบาดของเชื้ออย่างต่อเนื่องทั้งในประชากรมนุษย์และสัตว์ ก่อให้เกิดปัญหาแก่ระบบสาธารณสุขและความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากมาจากการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ มีอัตราการกลายพันธุ์ที่รวดเร็ว ทั้งการเกิดกระบวนการกลายพันธุ์อย่างค่อยเป็นค่อยไป และจากการเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ซึ่งมักเป็นที่มาของการเกิดการระบาดใหญ่ในแต่ละครั้ง การศึกษาทางด้านระบาดวิทยา การหาลำดับวิวัฒนาการของไวรัส และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้านต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จึงล้วนมีความสำคัญในการหาทางควบคุมและการวางนโยบายเพื่อแก้ไขปัญหาการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่กำลังมีการระบาด หรือกำลังจะเกิดการระบาดขึ้นในอนาคต การศึกษาครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อการหาลำดับวิวัฒนาการ และแนวโน้มการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ ที่มีการระบาดในประเทศไทย ประสิทธิภาพของชุดเครื่องมือที่นำมาใช้ทดสอบการติดเชื้อ รวมทั้งการศึกษาด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของประชากรที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในประเทศไทย จากการศึกษพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการระบาดในประเทศไทยในช่วงปี 2009-2012 เป็นจำนวนมากที่สุดได้แก่ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ซึ่งมีการแพร่ระบาดออกเป็น 3 ระลอก และมีแนวโน้มการกลายพันธุ์ที่ค่อยเป็นค่อยไปอย่างต่อเนื่อง และไวรัสในแต่ละ clade ก็มีแนวโน้มที่จะมีการกลายพันธุ์ในบางจุดอย่างเฉพาะเจาะจง ซึ่งอาจมีผลต่อรูปแบบการติดเชื้อและความรุนแรงของโรคได้ จากการกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทำให้ชุดเครื่องมือที่นำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้แก่ ชุดทดสอบชนิด rapid test ควรมีการตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจเป็นระยะ นอกจากนี้การศึกษครั้งนี้ยังพบว่า ภายหลังจากติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่แล้ว เจ้าบ้านยังมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Hemagglutination Inhibition Test (HI) หรือ Microneutralization (MN) ที่จำเป็นจะต้องมีการทดสอบความแม่นยำในการหาระดับแอนติบอดีที่มีต่อการติดเชื้อในประชากรด้วย

สาขาวิชา.....ชีวเวชศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....จาริกา มากคช.....

ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....ยง ภู.....

5187763020 : MAJOR BIOMEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : GENOME CHARACTERIZATION/INFLUENZA/ANTIBODY RESPONSE

JARIKA MAKKOCH: GENOME CHARACTERIZATION, MOLECULAR EVOLUTION AND ANTIBODY RESPONSE AGAINST INFLUENZA A VIRUS IN THAILAND. ADVISOR: PROF.YONG POOVORAWAN, MD., 144 pp.

The continuously sporadic outbreaks of influenza A virus in human and animal populations have impacts on public health problems and economic lost. Previous studies found that influenza virus has high mutation rates in antigenic drift process and antigenic shift process, which is the major cause of epidemic of influenza A virus worldwide. Epidemiological study, molecular evolution and immunological response in host cell against influenza A virus infection will be essential for evaluation and surveillance for being well-prepared and be able to control the current outbreak or future outbreaks. This study aimed to perform the genomic characterization, phylogenetic analysis, and mutational trend of influenza A virus circulated in Thailand, including the study of rapid test efficiency used in influenza A detection and the study of antibody response against influenza virus infection in Thai population. The study found that the human pandemic influenza virus H1N1 is the major influenza A virus circulating in Thailand during 2009-2012, which expressed in 3 peaks with the continuous and gradual mutation, while each clade of virus expressed some significant mutation points, which may affect the virus pathogenesis and transmission process. The rapid test used in influenza virus infection should be evaluated for the accuracy due to the gradual mutation. This study also found that influenza A virus infection will cause the antibody response in human which can be detected by using Haemagglutination Inhibition Test (HI) or Microneutralization (MN) assay which should be assessed before perform the test.

Field of Study : ..Biomedical Sciences.....

Student's signature .......

Academic Year :2012.....

Advisor's Signature .......

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my devout gratitude and appreciation to my supervisor, Professor Yong Poovorawan for his encouragement, inspirational and motivational supports. Being his student, I could not ask for better role model who can sacrifice his own happiness for scientific research. Hopefully, I can pass my knowledge and research skills to other people like I have learned from him. I would like to extend my heartfelt thanks to all of my thesis examiners, Associate Professor Chantapong Wasi, Associate Professor Kanisak Oraveerakul, Associate Professor Chintana Chirathaworn, and Assistant Professor Sunchai Payungporn, who provided me many constructive feedbacks and guided me with valuable comments which inspired me a higher level of thinking. I would like to thank my training supervisor, Professor Paul Digard, University of Edinburgh, for his kind supports, teaching and all suggestions which make me extend my knowledge in pathogenesis of influenza virus. I would also express sincere thank for Dr.Xinhua Lu, Mr.David Wang from Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA for valuable training in Microneutralization techniques and also wonderful memories in Atlanta. I also want to give gratitude for Chula Dusadee Pipat Fund and Chulalongkorn University for scholarship and co-funding support. I would like to thank to Centers of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine and Faculty of Sciences, Chulalongkorn University, which make me view this wonderful world from new perspectives of study. Special thanks for Miss Slinporn Prachayangpreecha, who is willing to give her helping hands as soon as I am in need.

Finally, I am grateful to my beloved parents, who always support me and provide me wonderful will power, love and also carefree environment, so that I can concentrate on my study and I also know that they will always beside me and encourage me as long as they can in this long journey.

CONTENTS

	Page
Abstract in Thai.....	iv
Abstract in English.....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	X
 CHAPTER	
I General introduction.....	1
II Whole genome characterization, phylogenetic and genome signature analysis of human pandemic H1N1 virus in Thailand, 2009-2012.....	31
III Evaluation of rapid influenza virus tests in patients with influenza-like illness in Thailand.....	52
IV Determination of antibody response to the human pandemic influenza H1N1 2009 among patients with influenza-like-illness and high risk groups.....	65
V Erythrocyte binding preference of human pandemic influenza virus A and its effect on antibody response detection.....	82
VI Evaluation of H5N1 specific antibody in high risk people in Thailand.....	98
VII Summarizing discussion.....	108
References.....	116
Appendix.....	137
Biography.....	144

LIST OF TABLES

Table	Page
1	Characteristics and functions of several genes of influenza..... 2
2	Properties of techniques measuring antibody against influenza virus..... 23
3	Details of patients and pH1N1 influenza virus isolated in Thailand from May 2009 to April 2012..... 36
4	Diversity percentages, selection pressure and substitution rates of 40 whole genome sequences of pH1N1 virus circulating in Thailand from May 2009 to April 2012..... 38
5	Amino acid residues of whole genome sequences of human pandemic H1N1 influenza virus strains at 77 positions separated by genes..... 42
6	Amino acid residues of partial sequences of human pandemic H1N1 influenza virus strains at 7 positions separated by gene..... 45
7	Sensitivity and specificity of SD and QV rapid test based on age groups.... 59
8	Sensitivity and specificity of SD and QV rapid test based on types of influenza virus..... 61
9	Sensitivity and specificity of SD and QV rapid test during high and low season of influenza activity..... 62
10	Paired sera with real-time RT-PCR positive for human pandemic influenza (H1N1)..... 75
11	Paired sera with real-time RT-PCR negative for human pandemic influenza (H1N1)..... 77
12	HA titers of H1N1 obtained using 6 different erythrocyte species..... 91
13	CT values of 8 hemagglutination unit serial dilutions for 4 erythrocyte species of human pandemic H1N1 and seasonal H1N1, obtained using real-time reverse transcription (RT)-PCR assays..... 92

LIST OF TABLES

Table		Page
14	GMTs, percent accuracy, and percent acceptability of HI assays obtained with each erythrocyte species, compared to MN assay titers.....	93
15	Characteristics of population study of high risk people of h5N1 avian influenza virus infection in Thailand.....	104
16	Neutralizing antibody titers against avian influenza virus (H5N1) among high risk people in Thailand, determined by microneutralization (MN) assay	105
17	Characteristics of H5N1 antibody positive participants.....	105

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Influenza A virus particle.....	3
2 Host Range Restriction of Influenza A virus in 17 HA and 9 NA.....	6
3 Influenza virus Life Cycle.....	7
4 Antigenic drift and antigenic shift in influenza virus mutation processes.....	11
5 Timeline of Influenza Pandemics and Outbreaks.....	12
6 History of Reassortment Events in the Evolution of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus.....	17
7 Influenza A viruses activity in Thailand since 2009-2012, correlated with relative humidity and temperature.....	19
8 Phylogenetic tree demonstrate the molecular evolution of influenza A virus...	20
9 Principle of hemagglutination (HA) and hemagglutination inhibition (HI) Test.....	24
10 Phylogenetic tree of concatenated sequences of pH1N1 influenza viruses circulating in Thailand during 2009-2012.....	39
11 Phylogenetic tree of the HA gene of pH1N1 influenza viruses circulating in Thailand during 2009-2012.....	40
12 Genome signatures in amino acid residues of human pandemic H1N1 in Thailand during 2009-2011.....	42
13 Percentage of NP Swab Samples Positive for Influenza Viruses in Thailand during 2010-2011.....	64
14 Sero-conversion of HI titer in patients with influenza-like illness.....	76
15 Antibody titers against the human pandemic influenza (H1N1) in single sera obtained from various groups.....	79
16 HA crystal structure showed antigenic sites of A/California/04/2009.....	110
17 Structure of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids.....	113
18 Structure of 2 types of glycosidic linkage of sialic receptor.....	113

LIST OF FIGURES

Figure	Page
19 Antibody titer against influenza A pandemic (H1N1) 2009 by hemagglutination inhibition (HI) test on days 10, 24, and 42 of life of the patient.....	140