

รายงานการวิจัย

การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่
สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจ ประชาชนทั่วไป
และกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์ ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค HI
(Hemagglutination Inhibition) Test

**The study of the change in antibody response to
influenza A H1N1 2009 in people with ILI (Influenza-
like-illness), normal people and healthcaworkers in
Thailand using HI (Hemagglutination Inhibition) Test.**

โดย

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ และคณะ

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีนาคม 2554

สารบัญ

บทนำ	3
วิธีการดำเนินวิจัย	8
วิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการ	9
ผลการวิจัย	10
วิจารณ์	15
สรุป	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	18

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. ปริมาณ HI titer แสดงปริมาณแอนติบอดีที่มีต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในกลุ่มผู้ป่วย ILI ที่มีผล real-time RT-PCR เป็นบวกต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ใหม่ 2009	11
2. ปริมาณ HI titer แสดงปริมาณแอนติบอดีที่มีต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในกลุ่มผู้ป่วย ILI ที่มีผล real-time RT-PCR เป็นบวกต่อการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ใหม่ 2009	12
3. ปริมาณ HI titer แสดงปริมาณแอนติบอดีที่มีต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในกลุ่มผู้ปฏิบัติงานด้านการแพทย์และสาธารณสุข โรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ระหว่างปี 2552-2553	14

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการกระจายของอายุผู้ป่วยในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่และไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลจนถึงต้นเดือนกรกฎาคม	5
2. สัดส่วนร้อยละของปริมาณแอนติบอดีที่มีต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในกลุ่มประชากรไทยแต่ละช่วงอายุ ในประชาชนทั่วไปจากอำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น	13

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณการตอบสนองทางแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในผู้ป่วยติดเชื้อ รวมถึงความชุกของแอนติบอดีต่อ human pandemic influenza (H1N1) ในกลุ่มประชากรทั่วไปและบุคลากรทางการแพทย์โดยใช้เทคนิค HI Test ในเขตอำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น เมื่อทำการนำซีรัมที่เป็น acute serum และ convalescent serum ของผู้ป่วยแต่ละรายมาทำการทดสอบดูปริมาณของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการติดเชื้อ (rising antibody) ในกลุ่มที่ตรวจพบว่าป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 และไม่ได้ป่วย ผลการทดลองพบว่า ในผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยมีการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีจาก acute และ convalescent เพิ่มขึ้นอย่างน้อยสี่เท่า (four-fold rising) และในการหาความชุกของแอนติบอดีในกลุ่มประชากรทั่วไปและบุคลากรทางการแพทย์นั้น ได้ผลการทดลองว่าซีรัม 48.2 % (123/255) ที่เก็บจากบุคลากรทางการแพทย์ในช่วงเดือนธันวาคมปี 2009 มี positive antibody titers ในขณะที่ประชากรทั่วไปมีซีรัมที่ positive 35.50% (109/307) และครั้งที่สองและสามได้เก็บซีรัมในช่วงเดือนมิถุนายนและธันวาคม 2010 มี 89 of 397 (22.4%) และ 94 of 366 (25.7%) ที่มี positive HI antibody titers นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึง cross reactivity ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 และไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H1N1) แอนติเจนจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 พบว่า HI titers มีผลเป็น negative และในตัวอย่างของบุคลากรทางการแพทย์ที่เก็บก่อนและหลังการระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่นั้น ที่นำมาทดสอบวิธี HI โดยใช้แอนติเจนต่อไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H3N2) พบว่าผลเป็น negative เช่นกันจึงสรุปได้ว่าไม่มี cross reactivity ต่อระหว่างไวรัสอื่นกับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009

Abstract

This study was aimed to determine the antibody titers in human pandemic influenza (H1N1) among patients with respiratory tract diseases and healthcare personnel in Chumphae district, Khon Kaen province, Thailand by using hemagglutination inhibition (HI) assay. Forty-five paired serum samples of ILI patients with either positive or negative RT-PCR results were subjected to hemagglutination inhibition (HI) test to evaluate the antibody titers against human pandemic influenza (H1N1). The result show that most serum samples of ILI patients with positive pandemic H1N1 virus displayed at least four-fold antibody increase of HI titers against pandemic influenza (H1N1). Moreover, HI assay was performed to detect the antibody titers against pandemic influenza in medical personnel and general populations. The HI titer after the first outbreak showed that 123 of 255 (48.24%) sera collected from medical personnel contained specific antibodies (HI titers ≥ 40) whereas 109 of 307 (35.50%) sera obtained from general population were positive for specific antibodies against pandemic influenza. After second and third wave 89 of 397 (22.4%) and 94 of 366 (25.7%) had positive HI antibody titers. In addition, to determine cross-reactivity with human seasonal H1N1 influenza, viral antigen from the seasonal H1N1 was used to detect antibody against seasonal H1N1 influenza and all sera showed negative results. We also studied the single sera samples from the high risk medical personals collected before and after the pandemic influenza outbreaks for antibodies against seasonal H3 influenza virus infection. The results showed lack of cross-reactivity to the human pandemic influenza virus. In conclusion, HI antibody testing to pandemic influenza can be used for the diagnosis, preventive and control measures of potential outbreaks.

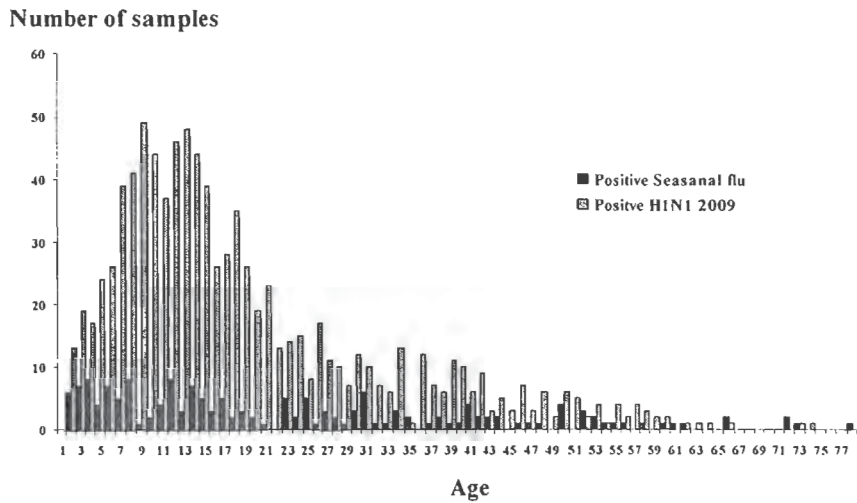
บทนำ

ราวกลางเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 มีผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจเกิดขึ้นจำนวนมากที่ประเทศเม็กซิโก และเกิดมีอาการปอดบวม จนทำให้มีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งเสียชีวิต โรคดังกล่าวได้ระบาดขึ้นโดยไม่ทราบสาเหตุจนกระทั่งกลางเดือนเมษายน 2552 โรคดังกล่าวได้เข้าสู่ประเทศสหรัฐอเมริกา พบผู้ป่วยเด็ก 2 ราย ทางตอนใต้ทางมลรัฐคาลิฟอร์เนีย (วันที่ 15 และ 17 เมษายน) ป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่จากการตรวจไวรัสด้วยการถอดรหัสพันธุกรรม (21 เมษายน 2552) พบว่าเป็นไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่คล้ายไข้หวัดใหญ่ในหมู และไม่เคยพบในคนมาก่อน จึงได้มีความสนใจเป็นพิเศษและย้อนไปดูในประเทศเม็กซิโก และพบว่าไวรัสที่เป็นสาเหตุที่พบในเม็กซิโก เป็นไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เดียวกัน โรคได้ลุกลามอย่างรวดเร็ว กระจายไปทั่วสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ในระยะแรกเรียกไข้หวัดใหญ่ว่าไข้หวัดหมู (swine flu) ต่อมาเมื่อศึกษาเพิ่มเติมไม่สามารถหาหลักฐานได้ว่าจุดเริ่มต้นของเชื้อไข้หวัดใหญ่มาจากหมู เพียงแต่พบว่ามีพันธุกรรมหรือ “เชื้อชาติ” มาจากหมูในอดีต การเรียกไข้หวัดหมูจึงไม่ถูกต้อง ทางองค์การอนามัยโลกจึงจะเปลี่ยนจากไข้หวัดหมู เป็นไข้หวัดเม็กซิกัน หรือไข้หวัดใหญ่อเมริกาเหนือแต่ทางประเทศต้นกำเนิดได้ขอรับรอง จึงได้ใช้ชื่อ “ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009”

การเดินทางในปัจจุบันเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในช่วงที่มีการระบาดของโรคพบว่าในระยะเวลานั้นๆ เพียง 1-2 เดือน มีการเดินทางข้ามประเทศจากเม็กซิโกเข้าสู่ประเทศต่างๆ หลายล้านคน โดยเฉพาะเข้าสู่ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้โรคดังกล่าวกระจายอย่างรวดเร็วเกินกว่าที่จะควบคุมได้ โรคดังกล่าวได้ระบาดไปในทุกรัฐของสหรัฐอเมริกา แคนาดา โดยมีการระบาดไปอย่างรวดเร็ว และเกินกว่าที่จะควบคุมได้ มีการระบาดไปมากกว่า 200 ประเทศ และมีผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันทางห้องปฏิบัติการมากกว่า 500,000 ราย ตัวเลขดังกล่าวต่ำกว่าความเป็นจริงอย่างแน่นอน เพราะการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีขีดจำกัดในการทำการตรวจวินิจฉัยในช่วงที่มีการระบาดเป็นอย่างมากถึงแม้จะมีการควบคุมกันอย่างเต็มที่ โรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ได้เข้าสู่ประเทศไทย โดยพบผู้ป่วยรายแรกในประเทศไทย เมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม 2552 และนับตั้งแต่นั้นมาก็พบรายที่ 2-3-4 ดูเหมือนว่าจะมีการควบคุมโรคได้ ต่อมาก็ปรากฏว่ามีการระบาดในโรงเรียนเกิดขึ้น และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วยากที่จะควบคุมและทำให้มีผู้เสียชีวิตโดยที่ผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่มีโรคอื่นร่วมด้วย ขณะนี้มีผู้ป่วยที่เสียชีวิตมากกว่า 20 ราย และมีผู้ป่วยยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่มากกว่า 4,000 ราย (18 กรกฎาคม 2552) ตัวเลขผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจยืนยัน จะน้อยกว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อจริงอย่างมาก เพราะในขณะนี้มีเด็กและผู้ใหญ่ที่ป่วยเป็น Influenza like illness (ILI) เป็นจำนวนมากและไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัย โรคนี้จะยังคงแพร่ระบาดอยู่ต่อไป โดยเฉพาะในขณะนี้โรคเกิดขึ้นในเด็กนักเรียน (อายุ 7-20 ปี) ประมาณร้อยละ 80 ในอนาคตต้องคำนึงถึงการกระจายไปสู่โรงงาน สถานชุมชน เรือนจำ และคาดว่าจะการระบาดจะยังคงไม่หยุดได้ง่ายจะระบาดไปเป็นระยะยาวนาน จนหมดฤดูหนาวของประเทศไทย น่าจะมีผู้ป่วยนับล้านคนที่ติดเชื้อโรคดังกล่าว แต่เดิมเมื่อดูอัตราการเสียชีวิต

เมื่อเริ่มต้นในเม็กซิโกค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 6 ทำให้มีการตื่นตระหนกพอสมควร ต่อมาพบว่าอัตราการเสียชีวิต โดยรวมตามข้อมูลขององค์การอนามัยโลก น่าจะอยู่ที่ร้อยละ 0.4 แต่เมื่อเอาประเทศเม็กซิโกออก อัตราการเสียชีวิตน่าจะอยู่ที่ร้อยละ 0.1-0.2 เมื่อดูอาการแล้วไม่น่าจะแตกต่างจากไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมากนัก มีผู้พูดกันมากกว่าไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่กับไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลไม่น่าแตกต่างกัน ลักษณะอาการไม่สามารถแยกออกจากกันได้ อาการที่พบ เช่น ไข้ ปวดเมื่อยตามตัว เจ็บคอ หวัด ไอ มีน้ำมูก แต่ไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมีอาการที่เพิ่มขึ้นคือเกือบ 1 ใน 4 มีอาการท้องเสียและอาเจียนร่วมด้วยได้ จากการศึกษาในเวียดนามพบว่าอาการท้องเสียพบได้เพียง 1 ราย ในผู้ป่วย 44 ราย จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ใน Ferret (Science Express online 2 July) โดยทีม Erasmus University พบว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 มีการติดเชื้อได้ง่ายเช่นเดียวกับไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล H1N1 แต่เมื่อดูพยาธิสภาพแล้วพบว่าไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 มีการก่อโรคของทางเดินหายใจ (หลอดลม ผนังปอด) มากกว่าไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ส่วนบน (โพรงจมูก) เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมีโอกาสอักเสบในทางเดินหายใจส่วนล่างและอาการแทรกซ้อนมากกว่า และการติดต่อดูเหมือนว่าติดต่อทางฝอยละอองและอาจจะยากกว่าการติดเชื้อในไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล

ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ส่วนใหญ่จากการศึกษาของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มากกว่า 300 ราย จะเป็นกับเด็กในวัย 7-20 ปี หรือกล่าวได้ว่าในวัยไปโรงเรียนและติดกันที่โรงเรียน วัยนี้เป็นวัยที่แข็งแรงโดยพบมากในปลายเดือนมิถุนายน ต้นเดือนกรกฎาคม และมีการปฏิบัติอย่างเข้มข้นของกระทรวงสาธารณสุข มีการปิดโรงเรียน ปิดโรงเรียนกวดวิชา รวมทั้งการหยุดยวในวันหยุดทำให้การระบาดมีแนวโน้มลดลง และเข้าสู่วัยกลางคนเพิ่มขึ้น (อายุ 20-40 ปี) (รูปที่ 1) ในกลางเดือนกรกฎาคม และเป็นที่น่าสังเกตอย่างยิ่งจากที่มีการชุมนุมขนาดใหญ่ของนักเรียนที่จังหวัดปทุมธานี พบว่าโรคได้ระบาดไปอย่างรวดเร็วในต่างจังหวัด (จากการศึกษาที่ชุมแพ จังหวัดขอนแก่น) พบว่ามีการระบาดในนักเรียนที่มาร่วมชุมนุมและนักเรียนพยาบาลใน กทม. ที่มีการเข้าร่วมทำกิจกรรมดังกล่าว ได้มีการปิดโรงเรียนที่มีการระบาดที่อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ในเวลาต่อมาข้อมูลในสหรัฐอเมริกาผู้ที่มีโอกาสที่จะต้องนอนโรงพยาบาล จะอยู่ในอายุประมาณ 20 และผู้ที่เสียชีวิตส่วนใหญ่จะมีอายุเฉลี่ยประมาณ 40 ปี โรคนี้อุบัติการณ์ในผู้สูงอายุ และเด็กเล็กยังพบน้อยทั้งนี้เชื่อว่าผู้สูงอายุจะมีภูมิคุ้มกันแล้วจำนวนหนึ่ง (เพราะไวรัสนี้เคยอยู่ในหมูเมื่อกว่า 20 ปีที่ผ่านมาและผู้สูงอายุอาจจะเคยได้รับสัมผัสมาแล้ว) ดังนั้นกลุ่มเสี่ยงในปัจจุบันได้แก่เด็กเล็ก สตรีตั้งครรภ์ สูงอายุ อ้วนมาก พักผ่อนไม่เพียงพอ ทำงานหนัก มีโรคพื้นฐานอยู่ก่อน เช่น โรคปอดเรื้อรัง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคตับ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง จะเสี่ยงต่อการเกิดของโรคที่รุนแรง ในกลุ่มดังกล่าวถ้ามีอาการต้องสงสัย ควรพบแพทย์และให้การรักษาที่รวดเร็ว อย่างไรก็ตามโรคทุกโรคในผู้ที่ปกติแข็งแรงดีก็มีโอกาสเป็นรุนแรงได้เช่นกัน



รูปที่ 1 แสดงการกระจายของอายุผู้ป่วยในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่และไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล จนถึงต้นเดือนกรกฎาคม

วัคซีนไข้หวัดใหญ่ที่ใช้อยู่ทุกวันนี้ สามารถป้องกันไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลได้อย่างดีมาก เนื่องจากสายพันธุ์มีการเปลี่ยนทุกปี จึงจำเป็นต้องฉีดวัคซีนดังกล่าวทุกปี เพื่อป้องกันตามสายพันธุ์ที่จะระบาดของโรค องค์การอนามัยโลกจะประกาศสายพันธุ์ให้ผู้ผลิตดำเนินการมาโดยตลอด วัคซีนดังกล่าวไม่สามารถป้องกันไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ใหม่ได้ ทั้งนี้เพราะเมื่อคุณลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสในวัคซีนและไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ มีความเหมือนกันเพียงร้อยละ 75-80 เท่านั้น ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศที่มีการฉีดวัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่กันมาก ก็ยังพบการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่และเมื่อเร็วๆ นี้การระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในนักเรียนที่ประเทศญี่ปุ่น มีนักเรียนจำนวนมากได้รับวัคซีนไข้หวัดใหญ่ไปแล้ว แต่ก็ยังป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ แสดงให้เห็นว่าวัคซีนไข้หวัดใหญ่ไม่สามารถป้องกันไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่

เมื่อดูจากแนวโน้มการระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 มีแนวโน้มที่กว้างขวางมากและรวดเร็ว ไวรัสดังกล่าวน่าจะอยู่ในมนุษย์ และจะเปลี่ยนเป็นไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลในอนาคตอย่างแน่นอน ความรุนแรงโรคก็ไม่ได้น้อยกว่าไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลแล้ว องค์การอนามัยโลกและ US-CDC จึงให้ความสำคัญในการผลิตวัคซีนสำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 โดยมีแผนการผลิตให้มากเพียงพอและปัจจุบันวัคซีนดังกล่าวได้เริ่มมีการใช้โดยเฉพาะในประเทศตะวันตก เช่น สหรัฐอเมริกา ยุโรป

และออสเตรเลีย แต่อย่างไรก็ตามกำลังการผลิตวัคซีนดังกล่าวยังมีขีดจำกัด สำหรับประเทศไทยนั้น หลังจากที่มีการระบาดระลอกแรกไปแล้ว คงจะมีการระบาดเป็นระลอกเช่นเดียวกับการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล เมื่อคำนึงถึงการป้องกันนอกจากดูแลเรื่องสุขอนามัยแล้ว การให้วัคซีนป้องกันโรคจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แต่เนื่องจากวัคซีนมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ดังนั้นการกำหนดว่าบุคคลใดควรจะได้รับ นอกจากจะเป็นบุคคลที่เสี่ยงต่อโรคแล้ว การรู้ถึงข้อมูลของภูมิคุ้มกันที่พบจากการติดเชื้อตามธรรมชาติอยู่ก่อนแล้ว ก็จะเป็นการประยุกต์การให้วัคซีนที่จะมีการนำเข้ามาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำการศึกษาติดตามปริมาณของแอนติบอดีที่มีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่เปลี่ยนแปลงไป ระหว่างก่อนและหลังการได้รับเชื้อไวรัส โดยใช้เทคนิค Hemagglutination Inhibition (HI) Test
2. บันทึกประวัติการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 ของผู้ติดเชื้อในประเทศไทย
3. เพื่อทำการศึกษาความชุกของแอนติบอดีที่มีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในประชากรกลุ่มอายุต่างๆ และบุคลากรทางการแพทย์

ขอบเขตงานวิจัย

เป็นการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของไวรัส Influenza A จากประชากรกลุ่มเป้าหมายเป็นผู้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในประเทศไทยที่มีอาการในกลุ่มของ Influenza-like illness และมีการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 ในประชากรไทยที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการทางเดินหายใจที่โรงพยาบาลชุมชน อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น โดยจะใช้ specimen ของผู้ที่ได้รับการตรวจจากการบริการและตรวจพบเชื้อ และใช้ไวรัสจากการเพาะเลี้ยงที่อยู่ในห้องปฏิบัติการมาศึกษาปริมาณแอนติบอดีที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากก่อนและหลังการติดเชื้อ การศึกษาจะมุ่งทางห้องปฏิบัติการโดยใช้รหัสเป็นหลัก ไม่มีการกล่าวถึงตัวผู้ป่วย รวมถึงการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย คือบุคลากรทางการแพทย์ของโรงพยาบาลชุมแพ หลังการระบาดในแต่ละครั้ง และประชากรทั่วไป

ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

ถึงแม้ว่าโรคไข้หวัดใหญ่ในประเทศไทยไม่ใช่โรคที่ก่อปัญหารุนแรงต่อสุขภาพชีวิต สังคม และเศรษฐกิจ แต่การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ 2009 ทั่วโลกนั้น ทำให้มีการพัฒนาวัคซีนไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ จึงทำให้เกิดการศึกษาว่าประชากรกลุ่มช่วงอายุใดควรจะได้รับวัคซีนไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ นี้ โดยมีสมมติฐานว่าผู้สูงอายุจำนวนหนึ่ง โดยเฉพาะบุคคลที่มีอายุมากกว่า 60 ปี รวมถึงบุคลากรทางการแพทย์ที่เคยป่วยในระลอกแรก จะมีภูมิคุ้มกันต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่แล้ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การระบาดของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ยังคงจะมีการระบาดต่อไปอีกหลายปีและการนำเข้าวัคซีนมีปริมาณจำกัดมาก ดังนั้นการกำหนดลำดับความสำคัญที่ควรจะได้รับพิจารณาในการฉีดวัคซีนป้องกัน ของบุคลากรมีความจำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานทางด้านภูมิคุ้มกันประชากรเพื่อเป็นตัวอย่างในการวางแผน ดังนั้นโครงการนี้จะเป็นประโยชน์อ้างอิงในการ

1. ทราบข้อมูลพื้นฐานของภูมิคุ้มกันประชากรบุคลากรทางการแพทย์และประชากรทั่วไป
2. ข้อมูลจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อกระทรวงสาธารณสุข ในการวางแผนป้องกันโรค โดยเฉพาะการใช้วัคซีนในการป้องกันโรค

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ประชากร (Population)

- จะใช้ตัวอย่าง specimen ที่เป็น ซีรัมที่เหลือจากการตรวจทางคลินิกของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จากโรงพยาบาลชุมแพ อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น โดยจะเก็บซีรัมเป็นชนิดของซีรัมคู่ (paired serum) ซึ่งซีรัมในครั้งแรกจะเก็บในอาทิตย์แรกของการติดเชื้อไวรัส (acute serum) เป็นตัวแทนของซีรัมก่อนที่จะได้รับเชื้อ เนื่องจากร่างกายจะสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหลังจากติดเชื้อแล้ว 7 วัน และซีรัมในครั้งที่สอง (convalescence serum) จะเก็บในอาทิตย์ที่ 2-4 ของการติดเชื้อไวรัส โดยจะเก็บตัวอย่างในผู้ติดเชื้อจำนวน 50 ราย รวม 100 ตัวอย่าง

- บุคลากรทางการแพทย์

จะใช้ตัวอย่างที่ได้จากบุคลากรทางการแพทย์ จากโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น เป็นโรงพยาบาลขนาดกลาง ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถประยุกต์ใช้เป็นแบบอย่างของกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์ในภาพรวม เพื่อเป็นตัวแทนของประเทศได้ดีกว่าโรงพยาบาลขนาดใหญ่และ ขนาดเล็ก

- กลุ่มประชากรปกติ

เป็นกลุ่มตัวอย่างที่แสดงถึงประชากรปกติโดยทั่วไปในเขตอำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น

เกณฑ์การคัดเข้า

- อาสาสมัครที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการที่เป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรกระบบทางเดินหายใจในแผนกผู้ป่วยนอก/ใน ของโรงพยาบาลชุมแพ อำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่เดือนตุลาคม-ธันวาคม 2552
- มีลักษณะอาการในกลุ่มของ ILI (Influenza-like illness)

เกณฑ์การคัดออก

- เป็นผู้ป่วยที่มีประวัติเลือดออกง่าย
- ผู้ที่มีโรคเรื้อรัง และภูมิคุ้มกันบกพร่อง
- ไม่สมัครใจเข้าร่วมโครงการ

วิธีการศึกษา

1. จะใช้ ตัวอย่างและ/หรือไวรัสที่ได้มาจากการเพาะเชื้อ H1N1 2009 มาใช้เป็นแอนติเจน
2. ตัวอย่างที่เก็บจะได้รับการบรรจุในหลอดสะอาดและส่งมายังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก และไวรัสเชื้อเป็นจะถูกเก็บที่ห้องปฏิบัติการชีววินิจฉัย คณะแพทยศาสตร์ จะถูกเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส
3. การปฏิบัติงาน จะปฏิบัติตามกฎเกณฑ์สากลในการควบคุมโรค โดยใช้ห้องปฏิบัติการชีววินิจฉัย
4. ระดับ 2+ ขึ้นไป

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. วิธีการทดสอบ HI test
วิธีนี้เป็นวิธีการวัดแอนติบอดีต่อ HA และสามารถบ่งบอกสถานะการมีภูมิคุ้มกันได้
การใช้เทคนิค HI มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้
 - 1.1 การไตเตรท HA
เป็นการเจือจางไวรัสเพื่อควบคุมปริมาณไวรัสที่ทำการทดสอบ HI โดยปกติใช้การทำ HA โดยการทำให้ serial dilution ของไวรัส ดังนี้
 - เติมน้ำ PBS 50 μ l ในแถวของ 96 well-plate ทุกหลุม
 - เติมน้ำ 50 μ l ของไวรัสลงในหลุมแรก ทำ serial dilution
 - เติมน้ำเม็ดเลือดแดง 50 μ l ในทุกหลุม
 - ทิ้งไว้ 30 นาที

การแปลผล HA

ไวรัสจะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเกิด agglutination จากการทำให้ HA จะทำให้ทราบว่าไวรัสที่นำมาเป็น positive control antigen มีความเข้มข้นเป็นกี่ HA ทำการปรับความเข้มข้นให้เป็น 8 HA ที่เป็นค่ามาตรฐานในการทำ HI

1.2 การเตรียมซีรัมเพื่อนำมาทำ HI

- นำซีรัมที่ต้องการทดสอบมา treat ด้วย RDE (Receptor Destroying Enzyme) ซึ่งเป็นการกำจัดสารยับยั้งแบบไม่จำเพาะที่ทำปฏิกิริยาเลียนแบบแอนติบอดี ในอัตรา 1:3 serum:RDE
- Incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง
- Incubate ที่ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการทำงานของ RDE และทำลายระบบ complement
- ใส่ PBS เพื่อเจือจางเป็น 10X dilution

1.3 HI Test

ดำเนินการตามมาตรฐาน US CDC (สหรัฐอเมริกา)

- ใน 96 well-plate เติม PBS 25 μ l ทุกหลุม
- ในแต่ละหลุมเติม 10X antiserum ของกลุ่มตัวอย่าง
- ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009
- เติมไวรัสความเข้มข้น 8 HA ในแต่ละหลุม
- ทิ้งไว้ 30 นาที
- เติมเม็ดเลือดแดง (เม็ดเลือดแดงของไก่วง) 50 μ l

การแปรผล HI

แอนติบอดีที่มีในซีรัมจะไปจับกับโปรตีน HA บนผิวของอนุภาคไวรัส ทำให้ HA ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกิด agglutination ได้ การแปรผลใน HI test จะตรงข้ามกับ HA

ผลการวิจัย

ในการศึกษาการศึกษการเปลี่ยนแปลงปริมาณการตอบสนองทางแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในผู้ป่วยติดเชื้อในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค HI Test พบว่าในกลุ่มตัวอย่างประชากรที่ต้องการศึกษา มีผู้ที่มีอาการทางเดินหายใจที่เป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 จำนวน 22 ราย และมีผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 จำนวน 23 รายเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex real-time RT-PCR ดังนั้น ในกลุ่มประชากรศึกษา จึงแบ่งกลุ่มประชากรได้ 2 กลุ่ม ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

เมื่อทำการนำซีรัมที่เป็น acute serum และ convalescent serum ของผู้ป่วยแต่ละรายมาทำการทดสอบดูปริมาณของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการติดเชื้อ (rising antibody) พบว่า ในผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ส่วนใหญ่ (95.45%) มีปริมาณของแอนติบอดีจำเพาะในเลือดที่เก็บใน acute phase น้อยกว่า 10 HI Unit จนถึง 40 HI Unit ซึ่งถือว่ามีผลแอนติบอดีเป็นลบ โดยมีค่ามัธยฐาน (Median) เท่ากับ 20 HI Unit และพบปริมาณของ rising antibody ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าในซีรัมที่เก็บในช่วง convalescent phase (ปริมาณตั้งแต่ <10)

Table 1 Paired sera with real-time RT-PCR positive for human pandemic influenza (H1N1)

No.	Age (years)	Gender	Day after symptom onset	Days	HI against pandemic H1N1		HI against seasonal H1N1	
					Acute	Convalescent	Acute	Convalescent
1	18	F	3	16	320	640	40	40
2	11	F	2	16	40	40	80	20
3	65	F	2	16	10	40	20	10
4	9	F	3	16	20	40	40	40
5	38	M	3	16	20	320	20	10
6	15	F	5	16	20	320	160	20
7	12	F	4	16	40	640	40	40
8	12	F	5	16	10	320	80	10
9	10	F	5	14	20	320	20	10
10	10	M	4	14	20	320	20	20
11	10	F	4	14	20	20	40	20
12	4	M	2	14	20	640	40	40
13	10	M	2	14	20	320	80	80
14	16	F	3	14	20	320	160	80
15	14	F	3	14	20	1,280	80	20
16	8	F	8	14	20	320	160	20
17	15	M	5	14	10	160	20	40
18	5	M	4	16	20	80	80	10
19	6	M	2	16	10	1,280	20	10
20	10	F	3	16	20	320	80	10
21	14	M	3	16	10	80	40	20
22	7	M	2	16	<10	<10	20	<10

ไปจนถึง 1280 HI Unit และมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 320 HI Unit) และซีรัมที่เก็บในช่วง convalescent ส่วนใหญ่ (90.90%) มีปริมาณแอนติบอดีจำเพาะมากกว่า หรือเท่ากับ 40 HI Unit ซึ่งถือเป็นผลบวก ในการตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีในเลือด ดังตารางที่ 1

ในขณะที่เดียวกัน ซีรัมของผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจที่มีผลการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ เป็นลบ เมื่อตรวจสอบด้วย real-time RT-PCR ทั้งที่เก็บในช่วง acute และ convalescent phase ของการเกิดอาการ พบว่า ซีรัมทั้ง acute และ convalescent ส่วนใหญ่ (91.30%) มีปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ตั้งแต่ น้อยกว่า 10 ไปจนถึง 40 HI Unit และมีค่ามาตรฐานใน acute และ convalescent serum เป็น 10 และ 20 HI Unit ตามลำดับ และไม่พบ rising antibody

นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้ทำการตรวจสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลในกลุ่มประชากรทั้งสองกลุ่มพบว่า ซีรัมทั้ง acute และ convalescent ในผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 มีปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมีค่าตั้งแต่ 20-160 HI Unit และมีค่ามาตรฐานเท่ากับ 46.82 และ 40 ในซีรัมที่เก็บในช่วง acute และ convalescent phase ของการเกิดอาการตามลำดับ ซึ่งไม่พบว่าการแตกต่างของปริมาณแอนติบอดีทั้งสองค่านี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับซีรัมในกลุ่มประชากรผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจที่มีผลการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่เป็นลบ พบว่าประชากรส่วนใหญ่ (82.61%) มีปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลอยู่แล้ว ค่า HI titer ที่มีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลมีค่าตั้งแต่ <10 จนถึง 160 HI Unit ดังตารางที่ 2

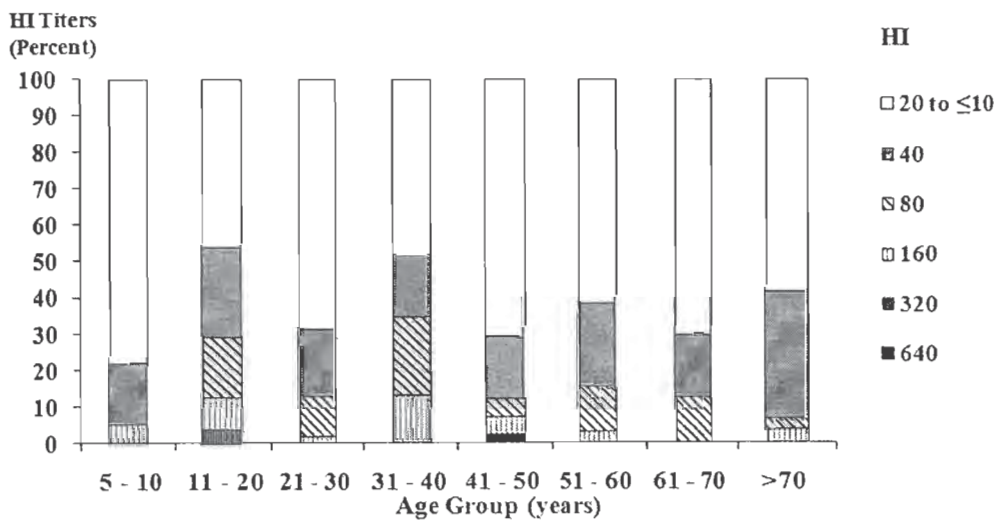
Table 2 Paired sera with real-time RT-PCR negative for human pandemic influenza (H1N1)

No.	Age (years)	Gender (MF)	Day after symptom onset	Days	HI against pandemic H1N1		HI against seasonal H1N1	
					Acute	Convalescent	Acute	Convalescent
23	5	M	2	16	<10	<10	40	20
24	15	F	3	16	<10	<10	160	40
25	5	M	3	16	40	40	20	20
26	13	M	2	16	<10	<10	80	20
27	24	F	4	14	320	320	80	20
28	1	F	5	14	20	20	80	80
29	4	F	4	14	40	20	80	80
30	46	F	8	14	<10	<10	<10	<10
31	11	M	2	14	10	10	20	20
32	34	F	5	34	<10	<10	80	80
33	13	F	4	15	<10	<10	40	40
34	9	M	1	13	40	20	80	40
35	57	F	18	12	1,280	1,280	40	40
36	5	F	4	12	10	10	40	40
37	10	M	1	15	10	10	80	20
38	8	M	6	12	10	<10	40	20
39	1	M	5	14	10	10	40	160
40	10	M	5	14	10	<10	20	40
41	10	M	5	14	10	<10	40	10
42	0.75	F	7	14	10	10	40	20
43	0.08	F	5	14	10	10	10	10
44	7	M	3	14	10	<10	80	80
45	15	F	5	14	20	10	80	80

กลุ่มประชากรทั่วไป

จากตัวอย่างทั้งหมด 307 ที่เก็บได้จากประชากรทั่วไปในอำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น ช่วง พ.ศ. 2551 โดยแบ่งตามช่วงอายุ 5-92 ปี ดังแสดงในรูปที่ 1 จากการศึกษาค้นพบว่ามีตัวอย่างทั้งหมด 36% (109/307) มีความชุกของแอนติบอดีต่อ pH1N1 (positive antibodies HI titers ≥ 40)

รูปที่ 2 Percentage of HI antibody titers against pandemic (H1N1) 2009 in relation to age among the general population in Chumphae district, Khon Kaen province, Thailand, 2009



บุคลากรทางการแพทย์

ตัวอย่างที่เก็บจากบุคลากรทางการแพทย์หลังการระบาดในช่วงสัปดาห์ที่สองของเดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 ตัวอย่างจากช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 และตัวอย่างที่เก็บจากเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553

ความชุกของแอนติบอดีต่อ pH1N1 หลังจาก wave ที่หนึ่ง

พบว่าตัวอย่างที่เก็บจากสัปดาห์ที่สองของเดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 มีจำนวนตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันต่อ pH1N1 ทั้งหมด 48 % (123/255) โดยมีค่าเฉลี่ย (mean) อายุ 34 ปี (จากช่วงอายุ 19-56 ปี)

ความชุกของ antibodies ต่อ pH1N1 หลังจาก wave ที่สอง

จากจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด จากซีรัมจำนวน 397 ตัวอย่าง มีบุคลากรทางการแพทย์ทั้งหมด 22.4% (89/397) มีแอนติบอดีต่อ pH1N1 โดยตัวอย่างที่เก็บได้มีค่าเฉลี่ยอายุ 47.6 ปี (จากตัวอย่างช่วงอายุ 14-87 ปี)

ความชุกของ antibodies ต่อ pH1N1 หลังจาก wave ที่สาม

จากจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด จากซีรัมจำนวน 366 ตัวอย่าง มีบุคลากรทางการแพทย์ทั้งหมด 25.7% (94/366) มีแอนติบอดีต่อ pH1N1 โดยตัวอย่างที่เก็บได้มีค่าเฉลี่ยอายุ 54.5 ปี (จากตัวอย่างช่วงอายุ 17-86 ปี)

ผลการทดลองของแอนติบอดีในแต่ละ wave ได้แสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Hemagglutination inhibition (HI) titers to pH1N1 among medical personnel in

Chumphae hospital, Khon Kaen province, Thailand, 2009-2010.

Health care personnel	Seroprotective HI titers	GMT
	No. (%)	(95% CI)
After the first wave (n = 255)	123 (48.2)	62.8 (42.9-76.3)
Age (no.)		
15-30 (115)	69 (60)	70.9 (49.1-92.8)
31-40 (76)	28 (36.8)	60.9 (39.2-82.7)
>40 (64)	26 (40.6)	46.9 (40.3-53.5)
After the second wave (n = 397)	89 (22.4)	117.2 (69.42-164.92)
Age (no.)		
15-30 (68)	24 (35.3)	89.8 (35.6-143.9)
31-40 (66)	8 (12.1)	61.7 (47.3-76.0)
>40 (263)	57 (21.7)	143.4 (74.8-212.0)

After the third wave (n = 366)	94 (25.7)	104.3 (69.1-139.6)
Age (no.)		
15-30 (29)	11 (37.9)	102.9 (42.0-163.9)
31-40 (33)	7 (21.2)	72.5 (32.6-112.3)
>40 (304)	76 (25.0)	108.1 (65.7-150.5)

วิจารณ์

จากผลการทดลองหาความชุกของแอนติบอดีในประชากรทั่วไป แสดงให้เห็นว่าประชากรในช่วงอายุ 11-20 ปี เป็นกลุ่มอายุที่มีความชุกของแอนติบอดีต่อ pH1N1 มากที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากในช่วงแรกของการระบาดของ pH1N1 นั้น ใช้หวัดใหญ่ชนิดนี้ได้ระบาดในกลุ่มคนที่มีอายุน้อย ส่วนในกลุ่มของบุคลากรทางการแพทย์ที่มีความเสี่ยงต่อการติดโรคมกกว่าประชากรธรรมดาทั่วไปนั้น พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของ positive antibody สูงกว่าประชากรทั่วไป ในการระบาดระลอกแรก และแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์ของ positive antibody บุคลากรทางการแพทย์แม้จะสูงใน wave แรก แต่ลดลงใน wave ถัดมานั้นอาจอธิบายได้จากแอนติบอดี titers สามารถลดลง สองถึงสิบเท่าจาก peak titers หลังจากเวลาผ่านไป 6 เดือน และสามารถอธิบายได้ว่าในช่วงแรกที่ไวรัสใช้หวัดใหญ่ชนิดนี้ระบาดและประชากรส่วนมากยังไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดนี้ จึงทำให้มีการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกันและส่งผลให้ค่าความชุกของแอนติบอดีมีค่าสูงกว่าระลอกถัดมา การศึกษาหาความชุกของไวรัสและแอนติบอดีที่มีต่อ pH1N1 สามารถใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ป้องกันการระบาด และใช้เป็นมาตรการควบคุม และการบริหารจัดการวัคซีนต่อ pH1N1 ในประเทศไทย

สรุป

การศึกษานาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ครั้งนี้ในตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยที่มีอาการในกลุ่มของ Influenza-like illness และมีการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 พบว่าตัวอย่าง acute กับ convalescent serum ที่เก็บจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex real-time RT-PCR นั้นมี HI titers ที่สูงขึ้น เห็นเป็น rising antibody อย่างชัดเจน แต่เมื่อทำ HI โดยใช้ไวรัสไข้หวัดใหญ่ประจำฤดูกาล H1N1 นั้น พบว่าไม่มี positive titers ขึ้น แสดงว่าแอนติบอดีต่อไวรัสต่างชนิดนั้นไม่ cross-react กัน ส่วนการศึกษานาแอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 ในกลุ่มประชากรทั่วไป และกลุ่มบุคลากรทางการแพทย์นั้น พบว่ากลุ่มบุคลากรทางการแพทย์ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อมากกว่าประชากรทั่วไปมีเปอร์เซ็นต์ของแอนติบอดีที่ positive สูงกว่าประชากรทั่วไป และในช่วงอายุของกลุ่มประชากรทั่วไปที่มีเปอร์เซ็นต์ positive มากที่สุดคือช่วงอายุ 11-20 ปี ซึ่งเป็นช่วงเด็กและวัยรุ่น นั้นตรงกับกรรายงานว่าในช่วงแรกของไวรัสชนิดนี้มักจะระบาดในกลุ่มของเด็กและวัยรุ่นมากกว่าในวัยผู้ใหญ่ การศึกษานาความชุกของไวรัสและแอนติบอดีที่มีต่อ pH1N1 ครั้งนี้อาจสามารถใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ป้องกันการระบาด และใช้เป็นมาตรการควบคุม และการบริหารจัดการวัคซีนต่อ pH1N1 ในประเทศไทย

บรรณานุกรม

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) Influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 196-201.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 197-201.

Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009; 459: 1122-5.

Rowe T, Abernathy RA, Hu-primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(4): 937-43

Thaweesak Chieochansina, Jarika Makkocha, Kamol Suwannakarna, Sunchai Payungpornb, Yong Poovorawana. Novel H1N1 2009 influenza virus infection in Bangkok, Thailand: effects of school closures *Asian Biomedicine* Vol. 3 No. 5 October 2009; 469-475

Reichelderfer PS, Kendal AP, Shortridge KF, Hampson A. Influenza surveillance in the pacific basin. *Current topics in medical virology* 1988:412-38

ภาคผนวก

Serological Analysis of Human Pandemic Influenza (H1N1) in Thailand

Slinporn Prachayangprecha¹, Jarika Makkoch¹, Sunchai Payungporn²,
Thaweesak Chieochansin¹, Chanpim Vuthitanachot³, Viboonsuk Vuthitanachot³,
Apiradee Theamboonlers¹, and Yong Poovorawan¹

¹Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics and ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, and ³Chumphae Hospital, Chumphae District, Khon Kaen Province, Thailand

ABSTRACT

The study was aimed at determining the prevalence of pandemic influenza (H1N1) 2009 among patients with respiratory tract diseases during July-December 2009 using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Haemagglutination inhibition (HI) assay was performed to detect antibody titres against pandemic influenza in 255 medical personnel, 307 members of the general population during the second week of December 2009 in Khon Kaen province, Thailand, and in 100 stored sera collected from people of different age-groups during 2008. The results showed that the pandemic (H1N1) 2009 had occurred during July-December 2009. The results of the HI test after the wave of this outbreak showed that 123 (48%) of the 255 sera collected from the medical personnel, 109 (36%) of the 307 sera obtained from the general population, and only two of the 100 stored sera from 2008 contained antibodies (HI titres ≥ 40) against pandemic influenza. Antibody against the pandemic (H1N1) 2009 was found in at least one-third of the population. In conclusion, the prevalence of virus and serological data obtained from the study can be used as the serological background level of the Thai population after the July-December pandemic. Finally, the serological data might be useful for outbreak-prevention and control strategies and for the management of vaccination for the pandemic (H1N1) 2009 in Thailand.

Key words: H1N1; Influenza; Serodiagnosis; Surveillance; Thailand

INTRODUCTION

The pandemic influenza (H1N1) 2009 has emerged from North America since mid-March 2009 and rapidly became responsible for the spread of respiratory illness around the world. Since then, it has spread to over 208 countries, and the total number of laboratory-confirmed cases of the pandemic (H1N1) 2009 has exceeded 414,000, with at least 18,114 deaths worldwide (28 May 2010) (1). Research has revealed that the strain of virus is a triple re-assortant among human, avian and swine influenza viruses (2).

Further evidence has also supported that the haemagglutinin protein of this pandemic strain was derived from swine (3). An H1N1 virus was first identified from samples obtained from humans in 1918 when there was an outbreak of pandemic influenza A virus (H1N1) which spread rapidly across the world and caused millions of deaths worldwide. This worldwide outbreak occurred in several waves with increasing virulence (4).

Transmission patterns of influenza are different according to weather conditions, such as temperature and humidity (5). As an example, in the Northern hemisphere, infections mostly occur from November through March whereas infections occur in the Southern hemisphere from July to December, and infections in the tropics tend to be spread throughout the year (6-8). In Thailand, like other tropical countries, the rate of infection due to influenza is normally sporadic throughout the year. It also tends to follow a biphasic seasonal pattern with an increase in the infection rate from June to August and from January to March (9).

The first confirmed cases of pandemic (H1N1) 2009 in Thailand were declared by the Bureau of Emerging Infectious diseases, Department of Disease Control

Correspondence and reprint requests should be addressed to:

Prof. Yong Poovorawan
Center of Excellence in Clinical Virology
Department of Pediatrics
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Bangkok 10330
Thailand
Email: Yong.P@chula.ac.th
Fax: +662-256-4929

trol, Ministry of Public Health, on 12 May 2009 (10). The pandemic spread through overcrowded public areas, such as Pattaya and schools in Bangkok, and the virus was probably transmitted from person to person by droplet transmission (11). The frequency of pandemic (H1N1) 2009 infection was generally higher among children and young adults compared to seasonal influenza (12). Antigenic and genetic characterization of the pandemic (H1N1) 2009 virus has shown differences between pandemic (H1N1) 2009 and seasonal H1N1 influenza virus. Hence, the vaccine against human seasonal influenza virus (H1N1) is unlikely to provide cross-reactive immune response against the novel pandemic (H1N1) 2009 virus (13).

To determine the host's immune response, various laboratory methods can be applied, such as haemagglutination inhibition (HI) test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and microneutralization (MN) test. The HI test is a widely-used technique for measuring specific antibody against influenza as it presents a relatively simple and inexpensive method which has been extensively used in epidemiological studies of influenza virus infection.

In this study, we have investigated pandemic H1N1 influenza by performing real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) for the detection of virus in throat or nasopharyngeal swab specimens obtained from randomly-selected patients with respiratory tract diseases. Using the HI test, we have serologically screened medical personnel and the general population in Chumphae district, Khon Kaen province, Thailand, for specific antibodies against the pandemic (H1N1) 2009 virus. Thus, the evaluation of antibody response to the pandemic (H1N1) 2009 among the population might be useful for the management of vaccine. Data will help prioritize certain groups within the population and could also assist in the recommendation for vaccine and management of vaccine strategies.

MATERIALS AND METHODS

Sources of specimens

Chumphae in Khon Kaen province was selected as the site for epidemiological studies and surveillance on the pandemic (H1N1) 2009. Chumphae district, with a population of approximately 650,000, was selected for representing a suburban area of Thailand. The district is located in the northeast of Thailand, approximately 449 km from Bangkok (Fig. 1)

Specimens and sera collected from the participants were sent to the Center of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn Uni-

Fig. 1. Map of Thailand showing location of Chumphae district



versity, within 48 hours. The sera were kept at -20°C until tested.

Nasopharyngeal/throat swab specimens

We collected nasopharyngeal or throat swab samples from 20 patients (15 outpatients and 5 inpatients) with symptoms of acute respiratory tract infection, such as fever, sore throat, cough, rhinorrhoea, nasal congestion. Samples were collected each week during July 2009–December 2009. The specimens were collected in 2 mL of viral transport medium containing antibiotics (penicillin G (2×10^6 U/L) and streptomycin 200 mg/L) kept on ice and sent to the Center of Excellence in Clinical Virology within 48 hours for the diagnosis of influenza infection. All the samples were screened for the pandemic (H1N1) 2009, human seasonal influenza A (H1N1 and H3N2), and influenza B virus by rRT-PCR (14).

Population for testing of HI antibody

In total, 562 cross-sectional serum specimens were collected from 7 to 15 December 2009 after the July-August wave of the pandemic (H1N1) 2009. People diagnosed with immunodeficiency, bleeding disorder, and any chronic respiratory diseases, such as bronchial asthma, bronchiectasis, or not willing to participate in the study, were excluded. The population to be studied was divided into the following two groups:

General population

Three hundred and seven cross-sectional serum

specimens were collected from healthy volunteers, devoid of respiratory symptoms, residing in Chumphae district by invitation for screening of antibody against the pandemic (H1N1) 2009. They comprised 185 males and 122 females, with a median age of 30 (range 5-92) years. These serum samples were included in the study protocol to represent the baseline for HI seropositivity in the general population and then used for comparison with healthcare personnel.

Healthcare personnel

Two hundred and fifty-five sera were collected by notification from healthcare workers at the Chumphae Hospital, Khon Kaen province, for screening the pandemic (H1N1) 2009. Their median age was 32 (range 19-56) years. Sera were divided into three groups based on their areas of work.

High-risk group: Specimens were collected from healthcare personnel who had close contact with patients with respiratory tract disease or collected specimens from patients with clinical respiratory tract infection during the outbreak of the pandemic influenza (H1N1) 2009 or had contact with a person with laboratory-confirmed pandemic (H1N1) 2009.

Intermediate risk group: Specimens were collected from healthcare personnel who worked in a high-risk area but were not directly exposed to patients with respiratory tract disease or collected specimens from patients with clinical respiratory tract infection

Low-risk group: Specimens were collected from healthcare personnel who work in the hospital but were directly exposed to patients, such as office workers, electricians, secretaries, and accountants.

Control baseline group

One hundred serum specimens were collected from individuals aged 11-86 years from Chum Saeng district of Nakhon Sawan province (Fig. 1) in March 2008 before the pandemic (H1N1) 2009. Stored serum samples were selected from anonymous specimens with only the age range known. These specimens were collected for a study project on antibody to avian influenza (H5N1).

Laboratory methods

Detection of influenza viruses by real-time RT-PCR

RNA was extracted from 200 µL of each nasopharyngeal swab using the Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience Co, Taiwan) according to the protocol of the manufacturer. The extracted

RNA was used as a template for the detection of infection due to influenza virus. Primers, specific Taq-Man probes, and thermal profiles for the detection were as previously described (12, 14, 15). rRT-PCR was performed using the SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR system (Invitrogen, Foster city, CA) in a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, New South Wales, Australia).

Propagation of influenza virus

The pandemic (H1N1) 2009 virus used in the study was A/Thailand/CU-H88/09 (accession numbers: HM446345 and HM446344). The influenza virus was propagated by inoculation of virus stock into the allantoic cavity of 10-day old embryonated chicken eggs. The inoculated eggs were placed in an egg incubator at 37 °C for 48 hours. The allantoic fluid was harvested and subjected to centrifugation at 3,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was tested for viral titres by haemagglutination assay (HA). Virus-propagation procedures were carried out in a biosafety level 2+ (BSL2+) laboratory.

Haemagglutination inhibition assay

To abolish non-specific HIs in serum samples, sera were treated with RDE (receptor destroying enzyme) produced by *Vibrio cholerae* Ogawa type 558 (Denka Seiken, Co. Ltd., Tokyo, Japan) following the specifications of the manufacturer. Briefly, serum and RDE were mixed in a ratio of 1:3 and incubated at 37 °C for 18 hours. Subsequently, the mixture was incubated at 56 °C for 30 minutes to inactivate the RDE and complement system, followed by 10-fold dilution with phosphate-buffered saline (PBS). Two-fold serial dilutions of RDE-treated sera (25 µL) were incubated with eight HA units of pandemic influenza virus (25 µL) per well in a V-shaped 96-well plate (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria) for 30 minutes, followed by addition of 50 µL of 0.5% turkey red blood cells and incubation at room temperature for 30 minutes (16). HI titres of $\geq 1/40$ were considered positive antibody response.

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS software for windows (version 17). Chi-square test was used for comparing the different groups.

Ethics

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, approved the protocol of the immunological study. Permission for pandemic influenza H1N1 surveillance was granted by the director of Chumphae Hospital, Khon Kaen, to

facilitate outbreak control and establish preventive measures. All participants were informed about the objectives of the study, and their written consents were obtained before collection of specimens.

RESULTS

Detection of influenza viruses by real-time RT-PCR

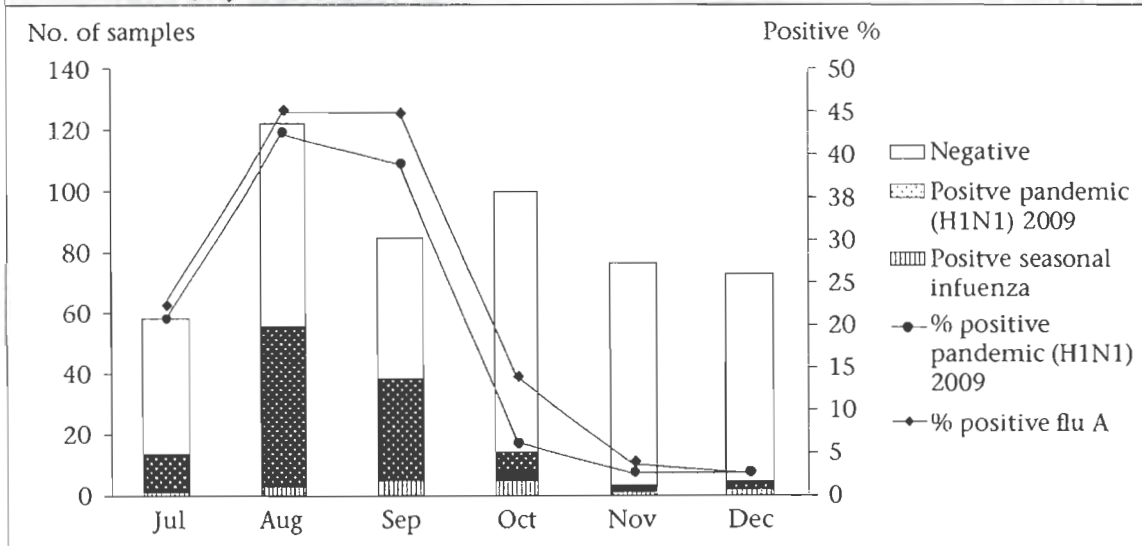
Five hundred and fourteen specimens were collected from children (233 patients) and adults (281 patients), aged 25 days-86 years. The number of samples and percentage positive for the pandemic (H1N1) 2009 are depicted in Figure 2. From July, the numbers of positive samples increased and reached the highest peak by the end of August 2009 and started to decline from September to

comparison between antibody-positive risk groups showed a significant ($p < 0.05$) difference between the high-risk group and the intermediate risk group (Table)

HI antibodies against pandemic (H1N1) 2009 in the general population

The results of the HI test performed on 307 members of the general population, aged 5-92 years (age: 5-10 years: $n=18$; 11-20 years: $n=24$; 21-30 years: $n=11$, 31-40 years: $n=23$; 41-50 years: $n=41$, 51-60 years: $n=31$, 61-70 years: $n=30$ and over 70 years: $n=26$) in Chumphae district showed that 109 samples (36%) displayed specific antibodies (HI titres ≥ 40) against the pandemic (H1N1) 2009. Details of the positive HI antibody response (HI titres ≥ 40) among different age-groups are shown in Figure 3.

Fig. 2. Positive percentage of nasopharyngeal or throat swab samples for pandemic (H1N1) 2009 and human seasonal influenza viruses from Chumphae Hospital, Khon Kaen province, Thailand, between July and December 2009



December 2009. In contrast, the seasonal influenza strains (H3N2 and influenza B) circulated in a low level throughout the year.

HI antibodies against pandemic (H1N1) 2009 in healthcare personnel

Based on the HI test performed on 255 healthcare personnel at the Chumphae Hospital, 123 samples (48%) contained specific antibodies (HI titres ≥ 40) against the pandemic (H1N1) 2009. A comparison between groups of medical personnel showed that the percentage of samples displaying specific antibodies against the pandemic (H1N1) 2009 was 58% (70/120) in the high-risk group, 35% (29/82) in the intermediate risk group, and 45% (24/53) in the low-risk group. Data are summarized in the table. A

HI antibodies against pandemic (H1N1) 2009 in 2008 control group

The results of the HI test showed that two (2%) of 100 anonymous control sera collected during 2008 had HI titres of ≥ 40 against the pandemic (H1N1) 2009. The positive specimens were derived from two individuals aged over 50 years.

DISCUSSION

In this study, we have performed the HI assay for determining the antibody levels against the pandemic (H1N1) 2009 to better understand the infection rate and estimated immunity in the population. High numbers of patients diagnosed with the pandemic (H1N1) 2009 were observed during

Table. HI antibody titres against pandemic (H1N1) 2009 among healthcare personnel in Chumphae Hospital, Khon Kaen province, Thailand, 2009

HI titre	High-risk group (n=120) (47%)		Intermediate risk group (n=82) (33%)		Low-risk group (n=53) (21%)	
	No.	%	No.	%	No.	%
20-≤10	50	42	53	65	29	55
40	38	32	15	18	12	23
80	23	19	10	12	9	17
160	8	6	-	-	3	5
320	1	1	3	4	-	-
640	-	-	1	1	-	-

Antibody response between high-risk group and intermediate risk group was significant ($p<0.05$); HI titres of ≥ 40 were used as positive; HI=Haemagglutination inhibition

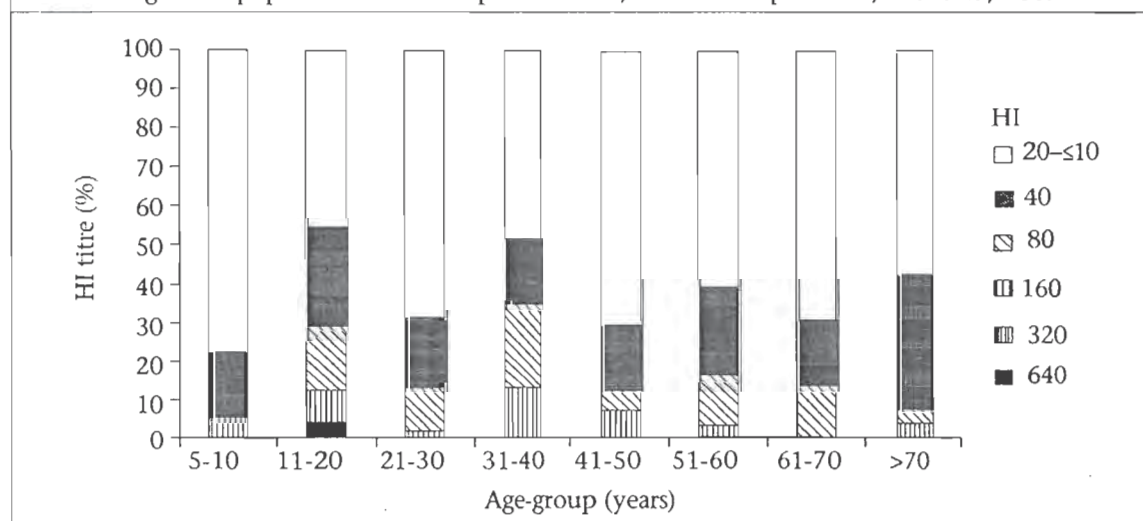
July–September 2009 and then decreased towards the end of the year (Fig. 2). The serum samples collected for HI test in December showed high seropositivity against the human pandemic (H1N1) 2009, implying that approximately one-third of the Chumphae population developed antibodies against the pandemic (H1N1) 2009 at that point in time.

According to a previous study, the HI test in paired serum samples of patients with influenza-like illness (ILI) diagnosed with the pandemic (H1N1) 2009 showed a significant four-fold increase in antibody titres upon comparison between acute and convalescent sera (17). To determine cross-reactivity between seasonal influenza and pandemic (H1N1) 2009, the HI test was performed on acute and convalescent sera of patients with ILI and healthy young adults collected before the outbreak. The results showed that there were no cross-reactivity

between antibody against the seasonal and pandemic (H1N1) 2009.

The HI test performed on sera of the medical personnel demonstrated a high percentage (48%) of samples with a positive HI titre against the pandemic (H1N1) 2009. In all probability, these individuals were at a higher risk for infection than the general population due to exposure to clinical specimens of respiratory tract disease and close contact with infected patients.

A comparison between the individual groups of the medical personnel showed that the high-risk group exhibited the highest percentage (58%) of antibody titres whereas the intermediate risk group and the low-risk group presented a lower percentage of antibody titres at 35% and 45% respectively. In the intermediate risk group, the positive HI percentages were lower than those found in the low-risk group.

Fig. 3. Percentage of HI antibody titres against pandemic (H1N1) 2009 in relation to age among the general population in Chumphae district, Khon Kaen province, Thailand, 2009

The lower HI titres in the intermediate group might be due to the level of exposure and personal awareness, including knowledge of appropriate protection, such as gloves, respiratory mask, and protective clothing while the low-risk group limited their protection to washing their hands. However, the antibody response in the intermediate risk group did not show a significant difference from that in the low-risk group.

The HI titres among the general population showed that 36% of the Chumphae residents already had developed immune response against the pandemic (H1N1) 2009 virus. Yet, other studies have shown a lower rate of seropositivity (11% and 13% in studies of China and Singapore respectively) (18,19), which might have been due to the differences in geographic location since various factors, such as overcrowding, climate, and personal hygiene, can affect the transmission efficiency of virus. Hence, the number of people infected with the pandemic (H1N1) 2009 may be different in some areas studied.

The elevated seroprevalence of the pandemic (H1N1) 2009 in the 11-20-year age-group (54%) may be explained by schools serving as gathering places for children and young adults in class-rooms and group activity which create ideal conditions for the transmission of the pandemic (H1N1) 2009 virus, such as lack of or improper handwashing and good personal hygiene (20). The 31-40-year age-group exhibited 52% seroprevalence. These individuals tend to work in air-conditioned offices, use public transport, and attend meetings and other social functions, all of which favour transmission of the virus (21). The elderly have possibly acquired partial immunity since around 1977 when the H1N1 strain with a similar epitope was re-introduced into humans (22). In this study, 42% of the elderly aged over 70 years displayed antibodies against the pandemic (H1N1) 2009, which may have been elicited by previous exposure to a virus containing a similar epitope. Thus, the elderly had acquired some level of immunity against the pandemic influenza A (H1N1) strain. This could explain the lower rate of infection among the elderly people when compared with seasonal influenza and, likewise, why the new pandemic strain tended to affect the younger age-group (12).

In this study, a comparison of the stored serum samples collected in 2008 showed that the HI titre was positive in only two specimens derived from individuals in the age range of 51-60 years and over 70 years. A previous study conducted in the United States established that one-third of people born

before 1950 had antibody against the pandemic (H1N1) 2009 (22). However, our baseline data from 2008 revealed a very low prevalence of antibody when compared with the results from sera collected in 2009. This finding was similar to the findings from Japan and China obtained from sera collected before the outbreak (3,18).

The results of the HI test showed that the population in Chumphae area had developed immunity against the pandemic (H1N1) 2009. This level of immunity among the population can probably lower the infection rate during the next wave due to an effect called 'herd immunity' ($\text{herd immunity} = 1 - 1/R_0$) (23). Herd immunity can protect non-immunized individuals from infection. The estimated basic reproduction number (R_0) of the pandemic (H1N1) 2009 was 1.4-2.1 (24-26). Once the herd immunity reaches 30-50% of the population, it will be sufficient to lower and control the infection rate of the pandemic (H1N1) 2009. As with previous patterns of pandemic, the virus can still cause sporadic infection in non-immunized individuals, although there is no severe outbreak and, at some point, the virus will become a common strain that continually circulates in the human population.

The HI assay was conducted in this study for determining the antibody levels against human pandemic influenza instead of the microneutralization assay. This would provide suitable data on neutralizing antibodies in sera but requires sophisticated laboratories for cell culture. The HI test represents a simpler screening assay and is a less-expensive process, providing acceptable serological data which would be feasible and attractive for large-scale analysis (27).

Conclusions

Based on the percentage of the pandemic (H1N1) 2009 cases diagnosed and the antibody levels against the pandemic (H1N1) 2009 virus measured, this study has shown that the Chumphae population had gained some level of immunity to the pandemic (H1N1) 2009 during the outbreak between July and December. Thus, the next pandemic (H1N1) 2009 wave may not impact Thailand as severely as suspected, and the disease will become seasonal influenza in the near future. This serological study has provided useful serological data that could help prioritize population groups for vaccination against the pandemic (H1N1) 2009 virus. Moreover, ongoing serological analysis would be essential for the recommendation of vaccine and for the development of strategies to prevent future epidemics or pandemics.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the Commission on Higher Education, Ministry of Education, the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University, CU Centenary Academic Development Project, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Graduate School of Biomedical Science, Chulalongkorn University, the RGJ PhD Program of the Thailand Research Fund, Ratchadaphiseksomphot Fund, Chulalongkorn University, and MK Restaurant Company Limited for their generous support. This work was also funded in part with federal funds from the NIAID, NIH, Department of Health and Human Services, under Contract No. HHSN266200700007C. They thank Dr. Praveena Kittikhun and Ms Aunyaratana Thontiravong for laboratory assistance. They also thank the staff and nurses of the Chumphae Hospital, Khon Kaen province, Thailand, for their collection of clinical data and specimens. Finally, the authors thank Ms Petra Hirsch for reviewing the earlier version of the manuscript.

REFERENCES

- World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009—update 102. Geneva: World Health Organization, 2010. (http://www.who.int/csr/don/2010_05_21/en/index.html, accessed on 28 May 2010).
- Trifonov V, Khiabani H, Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med* 2009;361:115-9.
- Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M *et al.* In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009;460:1021-5.
- Miller MA, Viboud C, Balinska M, Simonsen L. The signature features of influenza pandemics—implications for policy. *N Engl J Med* 2009;360:2595-8.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 2007;3:1470-6.
- Reichelderfer PS, Kendal AP, Shortridge KF, Hanipson A. Influenza surveillance in the Pacific basin; seasonality of virus occurrence: a preliminary report. In: Chan YC, Doraisingham S, Ling AE, editors. *Current topics in medical virology*. Singapore: World Scientific; 1989:412-44.
- Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V *et al.* The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science* 2008;320:340-6.
- Viboud C, Alonso WJ, Simonsen L. Influenza in tropical regions. *PLoS Med* 2006;3:e89.
- Simmerman JM, Chittaganpitch M, Levy J, Chantira S, Maloney S, Uyeki T *et al.* Incidence, seasonality and mortality associated with influenza pneumonia in Thailand: 2005-2008. *PLoS One* 2009;4:e7776.
- Thailand. Ministry of Public Health. Department of Disease Control. The method of investigation and control of influenza A (H1N1) 2009 at the beginning of outbreak at the school and institution. [Thai]. (http://203.157.15.4/Flu/doc/Influenza_Investigation_Manual_June2009.pdf, accessed on 15 June 2009).
- Fabian P, McDevitt JJ, DeHaan WH, Fung RO, Cowling BJ, Chan KH *et al.* Influenza virus in human exhaled breath: an observational study. *PLoS One* 2008;3:e2691.
- Chieochansin T, Makkoch J, Suwannakarn K, Payungporn S, Poovorawan Y. Novel H1N1 2009 influenza virus infection in Bangkok, Thailand: effects of school closures. *Asian Biomed* 2009;3:469-75.
- Centers for Disease Control and Prevention. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:521-4.
- World Health Organization. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A (H1N1). Geneva: World Health Organization, 2009. 7 p.
- Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, Samransamruajkit R, Amonsin A, Songserm T *et al.* Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *J Virol Methods* 2008;152:25-31.
- Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Hemagglutination inhibition. In: Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, editors. *Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 1982:B17-35 p.
- Makkoch J, Payungporn S, Prachayangprecha S, Tantilertcharoen R, Poovorawan Y. Determination of antibody response to the human pandemic influenza H1N1 2009 among patients with influenza-like illness and high risk groups. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2010;28:67-75.
- Chen H, Wang Y, Liu W, Zhang J, Dong B, Fan X *et al.* Serological survey of pandemic (H1N1) 2009 virus, Guangxi province, China (letter). *Emerg Infect Dis* 2009;15:1849-50.
- Chen MI, Lee VJ, Lim WY, Barr IG, Lin RT, Koh GC *et al.* 2009 influenza A (H1N1) seroconversion rates and risk factors among distinct adult cohorts in Singapore. *JAMA* 2010;303:1383-91.
- Cowling BJ, Chan KH, Fang VJ, Cheng CK, Fung RO, Wai W *et al.* Facemasks and hand hygiene to prevent influenza transmission in households: a cluster ran-

- omized trial. *Ann Intern Med* 2009;151:437-46.
21. Mossong J, Hens N, Jit M, Beutels P, Auranen K, Mikolajczyk R *et al.* Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. *PLoS Med* 2008;5:e74.
 22. 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;361:1945-52.
 23. Anderson MR. Analytical theory of epidemics. *In:* Krause RM, editor. Biomedical research reports: emerging infections. 2nd ed. California, CA: Academic Press, 2000:23-50.
 24. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD *et al.* Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 2009;324:1557-61.
 25. Nishiura H, Wilson N, Baker MG. Estimating the reproduction number of the novel influenza A virus (H1N1) in a southern Hemisphere setting: preliminary estimate in New Zealand. *N Z Med J* 2009;122:73-7.
 26. Nishiura H, Castillo-Chavez C, Safan M, Chowell G. Transmission potential of the new influenza A (H1N1) virus and its age-specificity in Japan. *Eurosurveillance* 2009;14:1-4.
 27. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W *et al.* Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:937-43.

Determination of Antibody Response to the Human Pandemic Influenza H1N1 2009 among Patients with Influenza-like Illness and High Risk Groups

Jarika Makkoch¹, Sunchai Payungporn², Slinporn Prachayangprecha¹, Rachod Tantilertcharoen³ and Yong Poovorawan¹

SUMMARY The global population has been exposed to the novel pandemic H1N1 influenza virus since mid March 2009, causing the expansion of respiratory illness around the world, including Thailand. To evaluate the antibody titers against human pandemic influenza (H1N1) in Thai people with influenza-like illness (ILI), 45 paired serum samples (acute and convalescent) were subjected to hemagglutination inhibition (HI) test and real-time RT-PCR. Most serum samples of ILI patients positive by real-time RT-PCR displayed an at least four-fold antibody increase of HI titers against pandemic influenza (H1N1). In addition, to determine cross-reactivity with human seasonal H1N1 influenza, viral antigen from the seasonal H1N1 was used to detect antibody against seasonal H1N1 influenza and all sera showed negative results. We also studied the single sera samples from the high risk medical personals collected before and after the pandemic influenza (H1N1) outbreaks for antibodies against seasonal H3 influenza virus infection. The results showed lack of cross-reactivity to the human pandemic H1N1 influenza virus. HI antibody testing to pandemic influenza (H1N1) can be used for the diagnosis, preventive and control measures of potential outbreaks.

Since mid March 2009, the human pandemic influenza A virus (H1N1) has emerged continuously, causing mild to severe respiratory illness. From Mexico, the outbreak has spread to the United States and Canada and then expanded throughout the world. This novel pandemic virus was first discovered by the Centers of Disease Control and Prevention, United States (US-CDC), who declared the first case of pandemic influenza infection in the United States in southern California on April 21, 2009.¹ This pandemic virus strain expresses genetic reassortment among variable subtypes of influenza virus, including human seasonal influenza virus, avian influenza virus, Eurasian and North American (classical) lineages of swine influenza virus.^{2,3} Furthermore, the

accumulated evidence supports the theory that its hemagglutinin, one of its antigenic surface proteins, has originated from classical swine influenza, first appearing in swine populations in 1918 and that this triple-reassortant's antigenic epitope is similar to the influenza virus having circulated sporadically among humans for many decades.³⁻⁵ Until now, there have been over 227,607 laboratory-confirmed cases of human pandemic influenza virus H1N1 infection

From the ¹Centre of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, ³Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Correspondence: Yong Poovorawan
E-mail: Yong.P@chula.ac.th

with at least 12,220 deaths worldwide.⁶

As for the outbreak situation in Thailand, the Bureau of Emerging Infectious diseases, Department of Disease Control, Thai Ministry of Public Health documented the first two cases of infection on May 12, 2009.⁷ However, both patients could recover and return home within a few days after infection. The first wave of outbreak occurred in several schools in the Bangkok Metropolitan area and some areas of the city of Pattaya. Both areas are overcrowded and due to close contact between people, the virus can be transmitted from person to person via droplet transmission.⁸ Based on previous research, we have ascertained that the outbreak pattern of human pandemic influenza is established between mid June to late July of the previous year. The highest peak of the first outbreak in Thailand is reached in early July. In addition, this novel pandemic virus usually attacks children and adolescents between seven to twenty years old. This pattern of infection is different from that of seasonal influenza which covers all age groups.⁹

The second wave of the human pandemic influenza outbreak is supposed to be definite. Many health organizations of the entire world provided many strategies to prepare themselves for the second wave of pandemic. Vaccination is one of the effective strategies for preventing influenza virus infection. Initially, molecular characterization of the human pandemic virus has shown that the vaccine for human seasonal influenza virus (H1N1) cannot boost the specific antibody against the new strain of virus due to the distinct antigenic differences between the human pandemic influenza (H1N1) and human seasonal influenza (H1N1) while the hemagglutinin antigenic property of the human pandemic influenza is quite similar to the virus isolated from New York in 1976.^{10,11} We may assume that some people have pre-existing antibody acquired by infection during the first wave of outbreak or due to circulation of influenza viruses with a similar epitope during the past decades. A study has suggested that people above the age of 60 years could have the antibody titer required to combat the novel pandemic strain. Hence, evaluating the antibody response to human pandemic influenza (H1N1) among Thai people will be essential for vaccine management which would be more effective once the vaccine against the human pandemic

influenza (H1N1) is finally available in the next few months.

Various candidate assays can be used for detecting specific antibody titers in response to virus, such as microneutralization (MN) assay, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). One of these techniques is hemagglutination inhibition test (HI test). Among those techniques, microneutralization assay is the most laborious and requires expertise for infection of virus into cell culture and interpretation of the cytopathic effect (CPE), whereas ELISA is easier to process but more expensive and is occasionally prone to misinterpretation. HI test can be used for detection of specific antibody blocking the unique properties of HA to agglutinate the red blood cells. HI test represents a simple and inexpensive method which would be feasible and attractive for large-scale analysis.

In this study, we have aimed at evaluating the antibody titer specific to human pandemic influenza (H1N1) in high risk medical staffs and patients with influenza-like illness (ILI) during both acute and convalescent infection in Thailand confirmed by real-time RT-PCR to determine if antibody is produced from acute and convalescent infection in paired serum samples. Furthermore, we used single serum samples to assess cross reactivity between human pandemic and seasonal influenza virus (H1N1) in various groups of people. The data and strategies obtained from this study may be applied for determination of antibody response to human pandemic influenza H1N1 prior to and post vaccination with new vaccine which will be necessary for vaccine management and evaluation of vaccine efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Informed consent and ethical consideration

The project proposal had been approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Patients were informed about the study objective and their written consent was obtained prior to specimen collection. Laboratory workers at the Center of Excellence in Clinical Virology also granted permission for their sera routinely stored in 2008 to be used in this project.

Population study

One hundred and sixty-two serum samples were divided into 5 groups, including:

Group I: Paired sera of ILI patients PCR positive and negative for human pandemic influenza (H1N1) infection

Forty-five sera (acute and convalescent paired samples) were available from patients diagnosed with acute respiratory tract illness with ILI (Influenza-like illness), which is defined by CDC as fever (100°F or 37.8°C) with sore throat or cough without other known causes,¹² attending the Out Patient Department, Chumpare Hospital, Khon Kaen province, Thailand. The acute sera were collected within the first 7 days after the onset of symptoms. The convalescent sera were collected at least 14 days after the onset of disease. In addition, nasopharyngeal swabs were collected from all 45 patients and screened for the human pandemic influenza (H1N1) by real-time RT-PCR.

Group II: Single sera of high risk medical staffs before outbreak of human pandemic influenza virus (H1N1)

Twenty single sera had been obtained from medical staffs at the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University in the year 2008, before the pandemic influenza H1N1 2009 outbreak. All had been vaccinated against seasonal influenza virus for at least 2 years.

Group III: Single sera of healthy young adults before the outbreak of human pandemic influenza virus

Thirty-one stored sera were obtained from healthy young adults (18-20 years old) in the year 2008, before the outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009. None of them had ever received the seasonal influenza virus vaccine.

Group IV: Single sera of high risk medical staffs after the outbreak of human pandemic influenza (H1N1)

Forty-two single serum specimens were obtained from laboratory workers at the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn Uni-

versity in early December of 2009, after the first wave of pandemic influenza (H1N1) 2009 outbreak.

Group V: Single sera PCR positive for H3 human seasonal influenza virus

Five acute and one convalescent sera were obtained from 6 patients who attended the Out Patient Department, Chumpare Hospital, Khon Kaen province, Thailand. The nasopharyngeal swabs obtained from them were confirmed to be infected with H3 influenza A virus by real-time RT-PCR. The acute serum samples were collected within 7 days after the onset of symptoms. The convalescent serum sample was obtained on the 24th day after the onset of symptoms.

These single sera in groups II, III, IV and V were used as control sera to test the cross-reactive antibody response between seasonal H1N1 and pandemic influenza H1N1 2009 virus infection. All samples were kept at -70°C until tested.

Detection of human pandemic influenza (H1N1) by real-time RT-PCR

The nasopharyngeal or throat swab samples of patients with ILI were collected in 2 ml of viral transport medium and transported in a biohazard ice box. The specimens were sent within 48 hours to the Center of Excellence in Clinical Virology for diagnosis of the human pandemic influenza (H1N1). Then, 200 µl of nasopharyngeal swab medium was used for RNA extraction using the Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience Co, Taiwan) following the manufacturer's recommendation. RNA obtained from each sample was used as a template for detection of the human pandemic influenza virus (H1N1) by real-time RT-PCR with primers and probes as previously described.¹³ Real-time RT-PCR was carried out using the SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR system (Invitrogen, California, USA) and performed on Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, New South Wales, Australia) applying conditions described previously.⁹

Virus propagation

The human pandemic influenza (H1N1) and the human seasonal influenza (H1N1) used as virus antigen in this study are A/Thailand/CU-H88/09 (CU-H88) and A/Thailand/CU-41/06 (CU-41), re-

spectively. The viruses were successfully isolated from the previous outbreaks of influenza virus in Thailand.^{9,14} Then virus propagation for use as viral antigen was performed by inoculation of the virus stocks into the allantoic cavity of 10-day-old chick embryonated eggs. After 48 hours of incubation, the allantoic fluid was harvested and clarified by centrifugation at 1,200 × *g* for 10 minutes. The allantoic supernatants were used for determination of the viral titers by hemagglutination assay (HA) as previously described.¹⁵ All virus propagation procedures were conducted in a bio-safety level 2+ (BSL2+) laboratory.

Hemagglutination inhibition assay

Serum samples were treated with receptor-destroying enzyme (RDE) produced by *Vibrio cholerae* Ogawa type 558 (Denka Seiken, Co. Ltd., Tokyo, Japan) in 1:3 ratios of serum:RDE. The se-

rum/ RDE mixtures were incubated at 37°C for 16 hours. Subsequently, they were heat inactivated at 56°C for 30 minutes followed by addition of 0.85% vol physiological saline to arrive at a final serum dilution of 1/10. The HI assays were performed with 0.5% turkey erythrocytes in V-shaped 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria), as previously described.^{15,16}

Data analysis

Data analysis of the real-time PCR assay was performed using the Rotor-Gene data analysis software, Version 6.0 (Corbett research supporting program). All results obtained from HI test were photographed immediately after the end of the process and then analyzed without bias by the same investigator. Statistical data were analyzed using SPSS for Windows version 17.0 software package.

Table 1 Paired sera with real-time RT-PCR positive for human pandemic influenza (H1N1)

No.	Age (years)	Gender	Day after symptom onset	Days	HI against pandemic H1N1		HI against seasonal H1N1	
					Acute	Convalescent	Acute	Convalescent
1	18	F	3	16	320	640	40	40
2	11	F	2	16	40	40	80	20
3	65	F	2	16	10	40	20	10
4	9	F	3	16	20	40	40	40
5	38	M	3	16	20	320	20	10
6	15	F	5	16	20	320	160	20
7	12	F	4	16	40	640	40	40
8	12	F	5	16	10	320	80	10
9	10	F	5	14	20	320	20	10
10	10	M	4	14	20	320	20	20
11	10	F	4	14	20	20	40	20
12	4	M	2	14	20	640	40	40
13	10	M	2	14	20	320	80	80
14	16	F	3	14	20	320	160	80
15	14	F	3	14	20	1,280	80	20
16	8	F	8	14	20	320	160	20
17	15	M	5	14	10	160	20	40
18	5	M	4	16	20	80	80	10
19	6	M	2	16	10	1,280	20	10
20	10	F	3	16	20	320	80	10
21	14	M	3	16	10	80	40	20
22	7	M	2	16	<10	<10	20	<10

RESULTS

Comparison of HI titer against human pandemic influenza (H1N1) and seasonal influenza (H1N1) in ILI patients with paired sera

Detection of human pandemic influenza (H1N1) from ILI patients

Based on the real-time RT-PCR diagnosis performed on nasopharyngeal or throat swab samples from 45 patients with influenza-like illness, 22 samples were positive for the human pandemic influenza (H1N1) whereas another 23 individuals yielded negative results. Based on these results, patients with ILI were divided into 2 groups, i.e., those positive and negative for human pandemic influenza (H1N1).

HI titers in ILI patients positive for the human pandemic influenza (H1N1)

Of 45 ILI patients with paired sera, 22 individuals were positive for the human pandemic influenza infection. In this group, almost all of the antibody titers against the human pandemic influenza virus in acute sera (21 in 22 individuals; 95.45%) ranged from <10 to 40. The geometric mean titer in this group amounted to 16.82 with a median at 20 while the antibody titer of convalescent sera ranged from <10 to 1,280. The median was 340. Most convalescent sera (20 in 22 samples; 90.90%) exhibited HI titers ≥ 40 and were considered as evidence of antibody response to the human pandemic influenza (H1N1). Seventeen patients had significant sero-conversion or increase in antibody titers (≥ 4 fold)

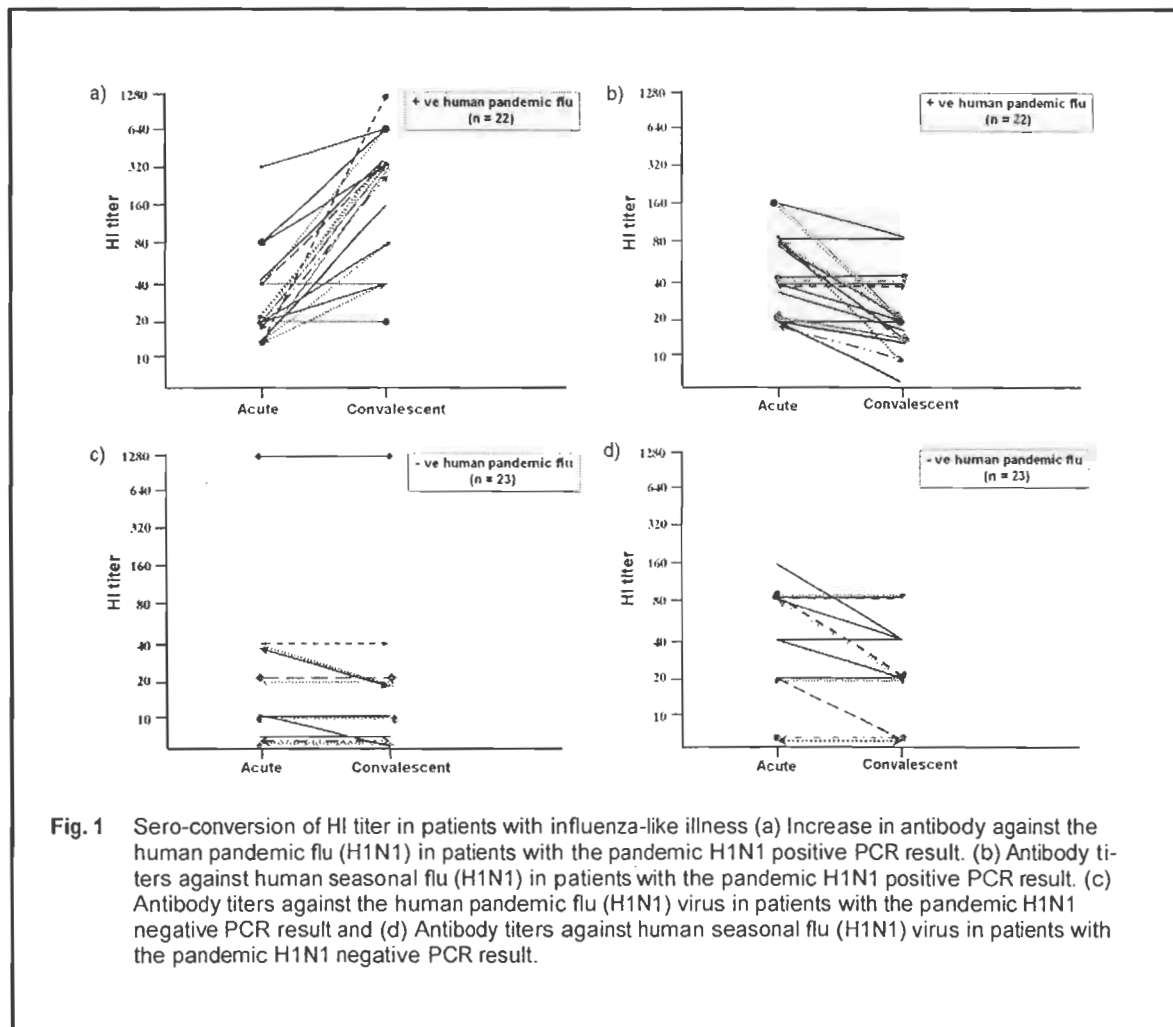


Fig. 1 Sero-conversion of HI titer in patients with influenza-like illness (a) Increase in antibody against the human pandemic flu (H1N1) in patients with the pandemic H1N1 positive PCR result. (b) Antibody titers against human seasonal flu (H1N1) in patients with the pandemic H1N1 positive PCR result. (c) Antibody titers against the human pandemic flu (H1N1) virus in patients with the pandemic H1N1 negative PCR result and (d) Antibody titers against human seasonal flu (H1N1) virus in patients with the pandemic H1N1 negative PCR result.

while 5 patients had 2-fold or stable HI titers. The results are summarized in Table 1 and the increase in antibody titers against human pandemic H1N1 in this group is illustrated in Fig. 1a.

As for the HI titer against seasonal H1N1 influenza virus in ILI patients positive for the human pandemic influenza (H1N1) by real-time RT-PCR, the HI titer of acute serum samples ranged from 20 to 160 with median values of 46.82 and 40, respectively while the HI titer of convalescent serum samples ranged from < 10 to 80 with of 21.36 and 20, respectively. The results are summarized in Table 1 and the antibody titers against human seasonal influenza H1N1 in this group are illustrated in Fig. 1b.

HI titers in ILI patients negative for the human pandemic influenza (H1N1)

From 45 ILI patients with paired sera, 23

samples were negative for the human pandemic influenza infection. Most of the antibody titers against the human pandemic influenza virus in both acute and convalescent sera (21 in 23 patients; 91.30%) ranged from < 10 to 40 with median values of 10 and 20, respectively. The sero-conversion against human pandemic influenza H1N1 2009 virus infection in this group showed no significant differences in HI titers (< 4 fold) between acute and convalescent sera, which signified negative HI titers. The antibody titers against human pandemic influenza (H1N1) in this group are shown in Table 2 and Fig. 1c.

As for the HI titer against seasonal H1N1 influenza virus in ILI patients negative for the human pandemic influenza (H1N1) strain, almost every patient in this group (19 in 23 patients; 82.61%) already had antibody response to seasonal H1N1 influenza virus. The HI titers against seasonal H1N1

Table 2 Paired sera with real-time RT-PCR negative for human pandemic influenza (H1N1)

No.	Age (years)	Gender (MF)	Day after symptom onset	Days	HI against pandemic H1N1		HI against seasonal H1N1	
					Acute	Convalescent	Acute	Convalescent
23	5	M	2	16	<10	<10	40	20
24	15	F	3	16	<10	<10	160	40
25	5	M	3	16	40	40	20	20
26	13	M	2	16	<10	<10	80	20
27	24	F	4	14	320	320	80	20
28	1	F	5	14	20	20	80	80
29	4	F	4	14	40	20	80	80
30	46	F	8	14	<10	<10	<10	<10
31	11	M	2	14	10	10	20	20
32	34	F	5	34	<10	<10	80	80
33	13	F	4	15	<10	<10	40	40
34	9	M	1	13	40	20	80	40
35	57	F	18	12	1,280	1,280	40	40
36	5	F	4	12	10	10	40	40
37	10	M	1	15	10	10	80	20
38	8	M	6	12	10	<10	40	20
39	1	M	5	14	10	10	40	160
40	10	M	5	14	10	<10	20	40
41	10	M	5	14	10	<10	40	10
42	0.75	F	7	14	10	10	40	20
43	0.08	F	5	14	10	10	10	10
44	7	M	3	14	10	<10	80	80
45	15	F	5	14	20	10	80	80

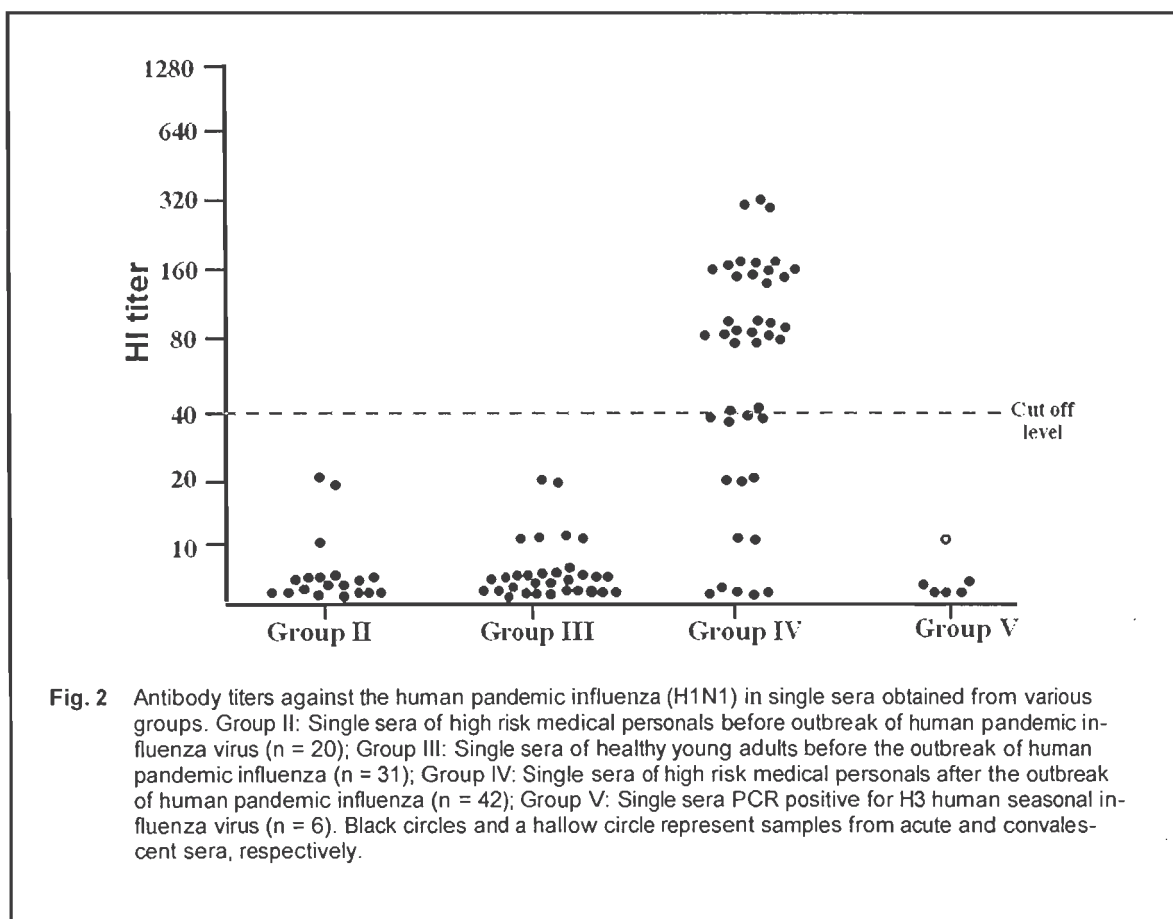
ranged from <10 to 160 both in acute and convalescent sera with median values for both at 40. The antibody titers against human pandemic influenza H1N1 2009 in this group are shown in Table 2 and Fig. 1d.

Comparison of HI titers against human pandemic influenza (H1N1) among single sera and antigenic cross reactivity to human H1N1 influenza virus

In order to test for cross reactive antibodies between the human pandemic influenza (H1N1) and seasonal influenza (H1N1), 78 single cross sectional sera were collected and divided into 4 groups (groups II-IV as described above).

The HI test results for human pandemic influenza (H1N1) revealed that all samples from high risk medical staffs (group II, n = 20) and healthy young adults (group III, n = 31) collected before the outbreak of human pandemic influenza (H1N1) had

antibody titers below 40 (ranging from < 10 to 20). Comparison of the HI titers against seasonal influenza between group II with all individuals vaccinated against seasonal influenza virus for at least 2 years and group III with no-one ever vaccinated against seasonal influenza, showed the geometric mean titers of these 2 groups at 94.17 and 34.82, respectively (data not shown). Most samples (32 in 42 individuals; 76.20%) from high risk medical staffs collected after the outbreaks of human pandemic influenza (H1N1) showed positive HI titers (≥ 40) against the H1N1 human pandemic influenza (Fig. 2). Likewise, none of six serum samples with their respective nasopharyngeal swabs positive for H3, displayed any HI titers (HI titer < 10; Fig. 2) against either human pandemic influenza or seasonal influenza (H1N1). Based on the HI assays, we concluded that there is no cross reactivity between human pandemic influenza virus (H1N1) and seasonal H1N1 or H3N2 influenza viruses.



DISCUSSION

In this study, we performed the HI test in paired serum samples of ILI patients to detect the different titers against human pandemic H1N1 influenza virus. All paired serum samples were separated into 2 groups according to real-time RT-PCR results, i.e., sera positive and sera negative for human pandemic influenza H1N1 2009 virus infection. Based on HI assays for pandemic influenza (A/Thailand/CU-H88/2009), most serum samples positive for pandemic human influenza H1N1 2009 displayed significant (≥ 4 -fold) sero-conversion. Most HI titers in acute sera were defined as negative (< 40) whereas the convalescent sera produced positive HI titers (≥ 40). In contrast, all serum samples negative for human pandemic influenza H1N1 2009 by real-time RT-PCR demonstrated stationary or decreased HI titers against human pandemic influenza H1N12009 virus. The HI titers against seasonal H1N1 virus (A/Thailand/CU-41/2006) in 2 groups of serum were not significantly different and presented low titers. These results allowed for the conclusion that the HI test, which is the standard test and recommended by WHO, is reliable for serological diagnosis in people infected with human pandemic influenza virus (H1N1) and HI titers in acute and convalescent sera would show at least a 4-fold increase.

There were 2 cases in the ILI group negative for human pandemic influenza H1N1 2009 by real-time RT-PCR which should be considered. These cases showed high but stationary HI titers in paired serum samples (320-320 and 1280-1280). The 2 patients were supposed to be infected with the human pandemic H1N1 influenza virus prior to serum sampling and the influenza-like illness was caused by infections with other viruses, such as parainfluenza virus, adenovirus etc. On the other hand, this patient, who was a teenager, may have been admitted and the nasopharyngeal swab for real-time RT-PCR detection and serum for HI test may have been obtained after he had already been infected for several days. Applying real-time RT-PCR, viral load can be detected within 15 days after onset of symptoms¹⁷, or within 5-6 days if the patient was treated with the antiviral drug Oseltamivir¹⁸ while the antibody titer would normally rise between 14-28 days after infection.¹⁹ The finding also found in perinatal infection with the antibody rising in the third to fourth week.²⁰

To ensure the HI test's specificity for human pandemic influenza H1N1 2009, we tested for cross-reactivity against pandemic influenza. The single sera collected before the outbreak, were subjected to HI test for either human pandemic influenza (H1N1) or seasonal influenza (H1N1). The results shown in Fig. 2 suggest that there was no cross-reactivity between the two virus strains. As for high risk healthcare staff, there were 10 pairs of sera collected from the same individuals in 2008 and 2009. According to the HI test, the HI titers increased significantly between 2008 and 2009. Many of the sera collected in 2009 already had the antibody against human pandemic influenza which may have been caused by close contact with patients. These members of the medical staff may also have applied various strategies protecting themselves from symptomatic virus infection. Due to lack of cross-reactivity against pandemic H1N1, the seasonal influenza vaccine could not protect anyone from the human pandemic H1N1.

In conclusion, our results have shown lack of cross reactivity in antibody titers obtained from HI test between the human pandemic influenza (H1N1) and seasonal influenza (H1N1). Moreover, comparison of the HI results between acute and convalescent sera have shown a significant increase in the specific antibody titers against human pandemic influenza (H1N1). Therefore, the strategies applied in this study may be used to determine the antibody response to human pandemic influenza H1N1 prior to and post vaccination with new vaccine which will be necessary for vaccine management and evaluation of vaccine efficiency.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to the Commission on Higher Education, Ministry of Education, and the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University, Chula Dusadee Pipat Fund, MK Restaurant Company Limited, CU Centenary Academic Development Project and King Chulalongkorn Memorial Hospital for their generous support. We would like to thank Dr. Praveena Kit-tikhun (D.V.M.) and Aunyaratana Thontiravong (M.V.Sc.) for laboratory assistance. We also thank the staffs and nurses of Chumpare Hospital, Khon-Kan, Thailand for their collection of the clinical data

and specimens. Finally we would like to thank Assoc Prof. Chintana Chirathaworn and Ms. Petra Hirsch for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Centers for Disease Control and Prevention. Swine influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 400-2.
- Garten RJ, Davis CT, Russell CA, *et al.* Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) Influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325: 196-201.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, *et al.* Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; 459: 1122-5.
- Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J, *et al.* Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection. *Wisconsin. Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1470-2.
- Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, *et al.* Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 2009; 360: 2616-25.
- World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009 - update 81. Available from: http://www.who.int/csr/don/2009_12_30/en/index.html. (accessed on 2010 January 2).
- Department of Disease Control, Thailand Ministry of Public Health. Influenza A (H1N1) situation update in Thailand. Available from: http://203.157.15.4/flu/situation/y52/flu_200909161413.pdf (accessed on 2009 December 12).
- Naffakh N, Van der Werf S. An outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus with evidence for human-to-human transmission. *Microbes Infect* 2009; 11:725-8.
- Cheiochansin T, Makkoch J, Suwannakam K, Payungporn S, Poovorawan Y. Novel H1N1 2009 influenza virus infection in Bangkok, Thailand: effects of school closures. *Asian Biomedicine* 2009; 3: 469-75.
- Dowdle WR. Pandemic influenza: confronting a re-emergent threat: the 1976 experience. *J Infect Dis* 2007; 176: Suppl 1: S69-S72.
- Nelson MI, Viboud C, Simonsen L, *et al.* Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000012.
- Centers for Disease Control and Prevention. Flu activity and surveillance. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/fluactivity.htm> (accessed on 2009 Jul 21).
- World Health Organization. CDC protocol of realtime RT-PCR for influenza A (H1N1). Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf (accessed on 2009 April 30).
- Chutinimitkul S, Cheiochansin T, Payungporn S, Poovorawan Y. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. *Virus Res* 2008; 132: 122-31.
- Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia; 1982.
- Rowe T, Abernathy RA, Hu-primmer J *et al.* Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 937-43.
- Percivalle E, Rovida F, Piralla A, *et al.* Rapid typing, subtyping and RNA quantification of influenza virus type A strains in respiratory secretions. *New Microbiol* 2008; 31: 319-27.
- Van Doorn R. Influenza Pandemic (H1N1) 2009: Viet Nam, patient data update. Available from: http://promedmail.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1001:3432696999771703:::F2400_P1001_BACK_PAGE,F2400_P1001_ARCHIVE_NU_MBER,F2400_P1001_USE_ARCHIVE:1001,20090809.2819,Y. (accessed on 2009 December 31).
- Kyoung-Jin Y, Janke BH, Swalla RW, Erickson G. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immuno-sorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 197-201.
- Dulyachai W, Makkoch J, Rianthavorn P, *et al.* Perinatal pandemic (H1N1) 2009 infection, Thailand [letter]. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 343-4.