

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

รายงานการวิจัย

การศึกษาบทบาทของ subset T cells และ T follicular helper cells (TFH) ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในคนไทย

The role of subset T cells and T follicular helper cells (TFH) of CD4+ T cells and CD8+ T cells in dengue-infected Thai patients

โดย

ศ.นพ. เกียรติ รัชชรุ่งธรรม

ดร.สุปราณี บุรณประดิษฐ์กุล

ภาควิชาอายุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ.ดร.ชุตินร เกตุลอย

ภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายเอกชัย พรหมเพชร

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือน ธันวาคม ปี พ.ศ. 2556

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่เข้าร่วมการศึกษา แพทย์ทุกท่านที่ส่งผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย แผนก  
กุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลสมุทรปราการ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการส่งผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการ ศูนย์เครื่องมือ Chula-  
MRC คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย และ  
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2553 ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย

**ชื่อโครงการวิจัย** การศึกษาบทบาทของ subset T cells และ T follicular helper cells (TFH) ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในคนไทย

**ชื่อผู้วิจัย** สุปรานี บุรณประดิษฐ์กุล, เอกชัย พรหมเพชร, ชุตติธร เกตุลอย, เกียรติ รัชชรุ่งธรรม

**เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ** 27 ธันวาคม 2556

**บทนำ:** การศึกษาบทบาทของ subset T cells (naive, Central memory (CM), Effector memory (EM) และ Late effector (LE)) และ T follicular helper cells (TFH) ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในคนไทย ยังไม่ชัดเจน

**วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาปริมาณและคุณสมบัติของ subset T cells (naive, CM, EM และ LE) และ T follicular helper cells (TFH) ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของเดงกีไวรัส ได้แก่ NS3 peptides และ Env peptides ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในคนไทยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

**วิธีการ:** ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวน 48 ราย ในระยะ acute นำมาทำการตรวจหาสายพันธุ์ ด้วยวิธี semi-nested multiplex PCR และ จำนวน 10 ราย ในระยะ acute (A), convalescent (C) และ follow-up (F) มาทำการตรวจหาคุณลักษณะและปริมาณของ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells (CXCR5+/ICOS+) และ subset T cells (naive; CCR7+/CD45RA+, CM; CCR7+/CD45RA-, EM; CCR7-/CD45RA- และ LE; CCR7-/CD45RA+) และความสามารถในการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17 และ IL-21 โดยนำ PBMC มากระตุ้นด้วย dengue serotype 2 antigen (overlapping peptides) ชนิด NS3 และ Env และทำการย้อมด้วยวิธี intracellular cytokine staining (ICS) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry

**ผลการทดลอง:**

ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวน 48 ราย พบว่าติดเชื้อ DENV2 มากที่สุดคือร้อยละ 38 (18/48) รองลงมาคือ DENV1 ร้อยละ 35 (17/48) DENV3 ร้อยละ 23 (11/48) และ DENV4 ร้อยละ 4 (2/48) ผลการศึกษาในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวน 10 ราย ที่สามารถติดตามครบ 3 ครั้ง พบว่าในระยะ acute มีปริมาณคิดเป็นร้อยละของ TFH CD4+ T cells ที่ตอบสนองจำเพาะต่อ NS3 และ Env peptides (30.8% และ 44.6% ตามลำดับ) สูงกว่าระยะ convalescent (11.9% และ 14.4% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และ มีปริมาณคิดเป็นร้อยละของ TFH CD8+ T cells ที่ตอบสนองจำเพาะต่อ Env peptides (36.1%) สูงกว่าระยะ convalescent (24.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่น่าสนใจคือ พบว่าในระยะ acute มีปริมาณคิดเป็นร้อยละของ central memory (CM) TFH cells ชนิด CD4+ T cells ที่ตอบสนองจำเพาะต่อ NS3 peptides ที่สร้าง IL-21 (4.3%) สูงกว่าระยะ convalescent (2.2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**สรุปผลการทดลอง**

ชนิดของเชื้อที่พบบ่อยในงานวิจัยนี้คือ DENV2 กับ DENV1 และพบว่าในระยะ acute มีการเพิ่มของ dengue specific TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าชนิดของ subset เป็น central memory TFH cells ที่สร้าง IL-21 อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาบทบาทของเซลล์เหล่านี้ต่อความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกเพิ่มเติมต่อไป

**Project Title** The role of subset T cells and T follicular helper cells (TFH) of CD4+ T cells and CD8 + T cells in dengue-infected Thai patients

**Name of Investigators** S. Buranapraditkun, E. Prompetchara, C. Kelloy, K.Ruxrungtham

**Year** 27 December 2013

**Background:** The role of naive, central memory (CM), effector memory (EM), late effector (LE)) and T follicular helper cells (TFH) of CD4+ T cells and CD8 + T cells in dengue-infected Thai patients is still limited.

**Objective:** To study the responses of the subset T cells (naive, CM, EM and LE) and T follicular helper cells (TFH) of CD4 + T cells and CD8 + T cells to dengue antigens include NS3 peptides and Env peptides in various phase of dengue-infected Thai patients.

**Methods:** Forty-eight dengue infected patients in acute phase were determined serotype by using semi-nested multiplex PCR. Blood samples from 10 patients at acute (A), convalescent (C) and follow-up (F) phase were tested and characterized the number of CD4 + T cells, CD8 + T cells, TFH cells (CXCR5+/ICOS+) and subset T cells (naive;CCR7+/CD45RA+, CM; CCR7+/CD45RA-, EM; CCR7-/CD45RA- and LE; CCR7-/CD45RA+) and determined cytokine secretion such as IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-21. PBMC were stimulated with dengue serotype2 antigen (overlapping peptides); NS3 and Env peptides by intracellular cytokine staining (ICS) assay and analyzed by flow cytometry.

**Results:**

Of 48 patients, 38%, 35%, 23% and 4% were infected with DENV2, DENV1, DENV3 and DENV4 serotype respectively. In acute phase, 30.8% and 44.6% versus in convalescent phase 11.9% and 14.4% of the 10 patients TFH CD4+ T cells respond specifically to dengue NS3 and Env peptides, respectively (median %,  $p < 0.05$ ). The median % of dengue Env peptides-specific TFH CD8+ T cells response was 31.6% in acute versus 24.6% in convalescent phase ( $p < 0.05$ ). Patients in acute phase had median % of NS3-specific IL-21 secreted CM TFH CD4+ T cells 4.3% versus 2.2% in their convalescent phase ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:**

The majority of patients infected with DENV2 and DENV1 serotype. Dengue-specific TFH CD4+ T cells and TFH CD8+ T cells increased significantly in acute phase and declined in the convalescent phase ( $p < 0.05$ ). Further study the role of these cells in disease severity is warranted.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
- กิตติกรรมประกาศ	
1. บทคัดย่อภาษาไทย	iii
2. บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
3. สารบัญตาราง	vi
4. สารบัญภาพ	vii
5. คำย่อ	ix
6. บทนำ	1
7. วัตถุประสงค์	6
8. ระเบียบวิธีการวิจัย	6
9. วิธีการทดลอง	6
- กลุ่มตัวอย่าง	6
- การออกแบบและการสร้าง overlapping peptide (OLP)	7
- Overlapping peptide design and synthesis ที่ใช้ในการศึกษา	7
- การตรวจหาการตอบสนองของ dengue specific T cells ด้วยวิธีการย้อม Intracellular Cytokine Staining (ICS)	10
10. ผลการทดลอง	11
11. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
12. บรรณานุกรม	34
13. ประวัตินักวิจัยและคณะ	37

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การจำแนก T cell subset โดยการใช้ CCR7 และ CD45RA	5
ตารางที่ 2	Non-structural protein 3 (NS3) Peptide Sequences	7
ตารางที่ 3	Envelope protein (E) Peptide Sequences	9
ตารางที่ 4	แสดงคุณลักษณะของอาสาสมัครจำนวน 48 ราย	11
ตารางที่ 5	แสดงคุณลักษณะของอาสาสมัครจำนวน 10 รายใน follow-up phase	12
ตารางที่ 6	ปริมาณของ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells และ subset T cells (naive, CM, EM และ LE)	13
ตารางที่ 7	ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides และ Env peptides ของ serotype 2	16

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อไข้เลือดออก	2
รูปที่ 2 Effector cells ที่เกิดจากการ differentiate naïve CD4+ T cells	3
รูปที่ 3 ปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides	13
รูปที่ 4 ปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด Env peptides	14
รูปที่ 5 ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD4+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides ของ serotype 2	15
รูปที่ 6 ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides ของ serotype 2	17
รูปที่ 7 ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD4+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides ของ serotype 2	18
รูปที่ 8 ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides ของ serotype 2	19
รูปที่ 9 ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides ของ serotype 2	20
รูปที่ 10 ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides ของ serotype 2	21
รูปที่ 11 ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก naïve T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides	22
รูปที่ 12 ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก naïve T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides	23
รูปที่ 13 ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก central memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides	25
รูปที่ 14 ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก central memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides	26

รูปที่ 15 ปริมาณไซโตไคน์หลังจาก effector memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides	27
รูปที่ 16 ปริมาณไซโตไคน์หลังจาก effector memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides	28
รูปที่ 17 ปริมาณไซโตไคน์หลังจาก late effector T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides	29
รูปที่ 18 ปริมาณไซโตไคน์หลังจาก late effector T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides	30



## คำย่อ

Ab	antibody
ACD	Acid citrate dextrose
Ag	antigen
BFA	Brefeldin A
C	Capsid
CM	Central memory
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CXCR5	CXC-chemokine receptor 5
DENV	dengue virus
DF	Dengue fever
DHF	Dengue Hemorrhagic Fever
DSS	Dengue Shock Syndrome
EM	Effector memory
Env	Envelope
FBS	Fetal bovine serum
FoxP3	Forkhead box P3
ICOS	Inducible co-stimulator
ICS	Intracellular Cytokine Staining
IFN- $\gamma$	interferon gamma
Ig	Immunoglobulin
IL-2	Interleukin-2
LE	Late effector
LT- $\alpha$	lymphotoxin- $\alpha$
Nab	neutralizing antibody
NS	non structural
OLP	overlapping peptide
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
prM	Pre-membrane
SEB	staphylococcal enterotoxin B
TCR	T cell receptor
TFH	T follicular helper cells
Th1	T helper 1 cells

Th2	T helper 2 cells
Th17	T helper 17 cells
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
Treg	T regulatory cells

## บทนำ

โรคไข้เลือดออกเกิดจากยุงลายซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเดงกีมาติดต่อสู่คน โดยองค์การอนามัยโลกพบว่าทั่วโลกมีการติดเชื้อประมาณ 50-100 ล้านคนต่อปี โดยโรคไข้เลือดออกสามารถพบได้ในประเทศเขตร้อนชื้น และประเทศกึ่งร้อนชื้น ได้แก่ ทวีปอเมริกากลาง-ใต้ บางส่วนของประเทศออสเตรเลีย ทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชีย และ รวมทั้งประเทศไทย โดยโรคไข้เลือดออกจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ปัจจุบันพบผู้ติดเชื้อเดงกีเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่นในปี พ.ศ. 2554 มีการรายงานผู้ติดเชื้อประมาณ 70,000 รายมายังกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข อย่างไรก็ตามอัตราผู้ป่วยยังไม่มีความโน้มถ่วงลงแม้จะมีการรณรงค์เกี่ยวกับการควบคุมยุงลายที่เป็นพาหะของโรคอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า มีอัตราการพบผู้ป่วยเพิ่มขึ้นในบริเวณที่มีการเจริญของเมืองอย่างรวดเร็วและประชากรหนาแน่น และพบการระบาดได้ตลอดปีแต่จะสูงสุดในช่วงฤดูฝนซึ่งมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการแพร่พันธุ์ของยุงลาย แม้บุคลากรทางการแพทย์ของประเทศไทยจะมีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย แต่ก็ยังพบผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อไข้เลือดออก โดยมีอัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 0.1-0.2 ของผู้ป่วยทั้งหมด<sup>(1-4)</sup>

โรคไข้เลือดออก เกิดจากยุงลายชนิด *Aedes* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคติดเชื้อไวรัสเดงกี จัดอยู่ใน *Family Flavivirus* โดยจะทำให้เกิดอาการทางคลินิกคือ มีไข้สูง มีภาวะเลือดออก และอาจเกิดภาวะช็อคได้ จนถึงแก่ชีวิต เชื้อเดงกีเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก โดยเชื้อเดงกีมีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว ขนาด 10.3 กิโลเบส มีรูปร่างเป็นแบบ spherical particles มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40-60 นาโนเมตร ประกอบด้วยส่วนของ structural gene ได้แก่ Capsid (C), Pre-membrane (prM) and Envelope (Env) และส่วนของ Non-structural genes ได้แก่ NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 เชื้อไวรัสเดงกีมี 4 สายพันธุ์ หรือเรียกอีกอย่างว่า "ซีโรทัยป์" ได้แก่ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4<sup>(5)</sup>

Envelop (Env) protein เป็น viral fusion protein ซึ่งใช้จับกับ receptor ของ host เพื่อเข้าสู่ cell membrane ของ host เป็น hemagglutinates ที่จำเพาะกับเม็ดเลือดแดงและเหนียวทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งด้าน humoral and cellular Env protein เป็น monomer ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 495 ตัว ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในขบวนการ glycosylation ของไวรัสเดงกี ซึ่งขบวนการ glycosylation จะเกี่ยวข้องกับ conformational change ที่จำเป็นต่อไวรัสในการเกิด fusion การสูญเสียขบวนการ glycosylation ของไวรัสเดงกี ในซีโรทัยป์ 2 จะทำให้เกิด tolerance ในขณะที่การสูญเสียขบวนการ glycosylation ของไวรัสเดงกี ในซีโรทัยป์ 3 จะทำให้เกิดการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ส่วน Env ของไวรัสยังเป็นบริเวณที่จะกระตุ้นให้ host สร้าง neutralizing antibody (NAb) โดย NAb จะจับกับไวรัสทำให้ไม่สามารถ infect เข้าสู่ host cells ได้<sup>(6)</sup>

Non-structural 3 (NS3) protein เป็น serine protease คล้ายๆกับ RNA helicase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์และการเพิ่มจำนวนของไวรัส NS3 protein เป็น monomer ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 615 ตัวและเป็นองค์ประกอบใน viral protease, RNA replication cofactor, NTPase และ putative helicase การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง motif ของ NS3 ทำให้เกิดการยกเลิกการทำงานของ ATPase และ helicase ได้ นอกจากนี้มีรายงานพบว่า กรดอะมิโนใน NS3 สามารถกระตุ้นให้ cytotoxic T lymphocytes และ helper T lymphocytes หลั่ง cytokines และ immune mediators ต่างๆได้ ซึ่งอาจส่งผลต่ออาการทางคลินิกของผู้ติดเชื้อ<sup>(7-8)</sup>

## อาการทางคลินิก<sup>(9)</sup>

การติดเชื้อไวรัสเดงกีส่วนใหญ่จะไม่มีอาการ ซึ่งพบร้อยละ 90 ส่วนผู้ติดเชื้อที่มีอาการ จะมีการดำเนินโรคเป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะไข้ (Dengue fever, DF) ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงนาน 4-7 วัน ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร อาเจียน ปวดกล้ามเนื้อ มีอาการปวดท้องบริเวณลิ้นปี่หรือใต้ชายโครงด้านขวา ตับโตและกดเจ็บ บางรายอาจมีจุดเลือดออกที่ผิวหนังหรือมีอาการเลือดออกในอวัยวะอื่น การทดสอบทูนิเกตต์ ให้ผลบวกร้อยละ 80

2. ระยะวิกฤต ไข้มักจะลดลงอย่างรวดเร็ว หากมีการรั่วของพลาสมา (Dengue Hemorrhagic Fever, DHF) จำนวนมาก อาจเกิดภาวะช็อก (Dengue Shock Syndrome, DSS) ได้ ผู้ป่วยจะมีอาการกระสับกระส่าย มือเท้าเย็น ชีพจรเต้นเร็วและเบาลง มีความดันโลหิตต่ำ ในระยะนี้พบอาการเลือดออกได้

ความรุนแรงของโรค แบ่งเป็น 4 ระดับ โดยอาศัยอาการเลือดออกและภาวะช็อก

เกรด 1 หมายถึง ไม่พบอาการเลือดออก การทดสอบทูนิเกตให้ผลบวก

เกรด 2 หมายถึง มีอาการเลือดออก

เกรด 3 หมายถึง มีชีพจรเบาเร็ว ความดันโลหิตต่ำ

เกรด 4 หมายถึง วัดความดันโลหิตไม่ได้ หรือคลำชีพจรไม่ได้

หมายเหตุ เกรด 1 คือ DF เกรด 2 คือ DHF เกรด 3 และ 4 คือ DSS

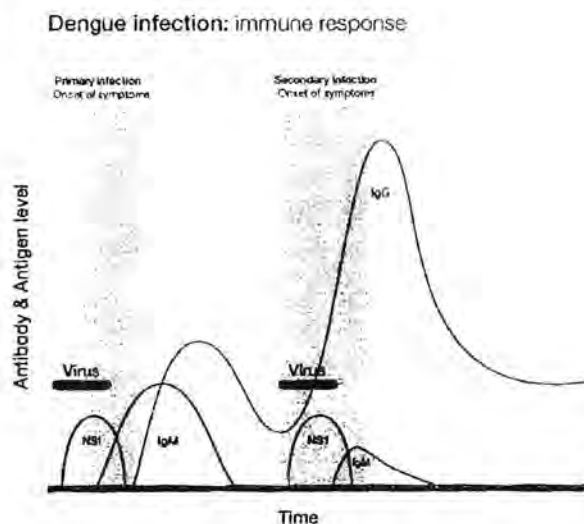
3. ระยะพักฟื้น (convalescent stage) เป็นระยะที่มีการดูดกลับของพลาสมาเข้าสู่กระแสโลหิต ผู้ป่วยจะมีอาการดีขึ้น เริ่มอยากอาหาร บัสดาวะเพิ่ม อัตราการเต้นของหัวใจลดลง

### การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อไข้เลือดออก

หลังจากการติดเชื้อไวรัสเดงก็จะสามารถตรวจพบระดับของไวรัสในกระแสเลือดสูง ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนอง ทั้งในส่วนที่เป็น Cellular immunity และ Humoral immunity โดยจะทำงานสัมพันธ์กันในการที่จะควบคุมการติดเชื้อเดงก็ในร่างกาย โดยทางด้าน Humoral immunity จะมี B cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG โดยการติดเชื้อในระยะแรก จะพบระดับ IgM และเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงก็สายพันธุ์เดิมซ้ำ จะพบระดับ IgG ที่เพิ่มมากขึ้น โดยที่จะไม่พบระดับของ IgM เนื่องจาก memory B cell สามารถตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว<sup>(10)</sup> (รูปที่ 1)

### รูปที่ 1: การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อไข้เลือดออก

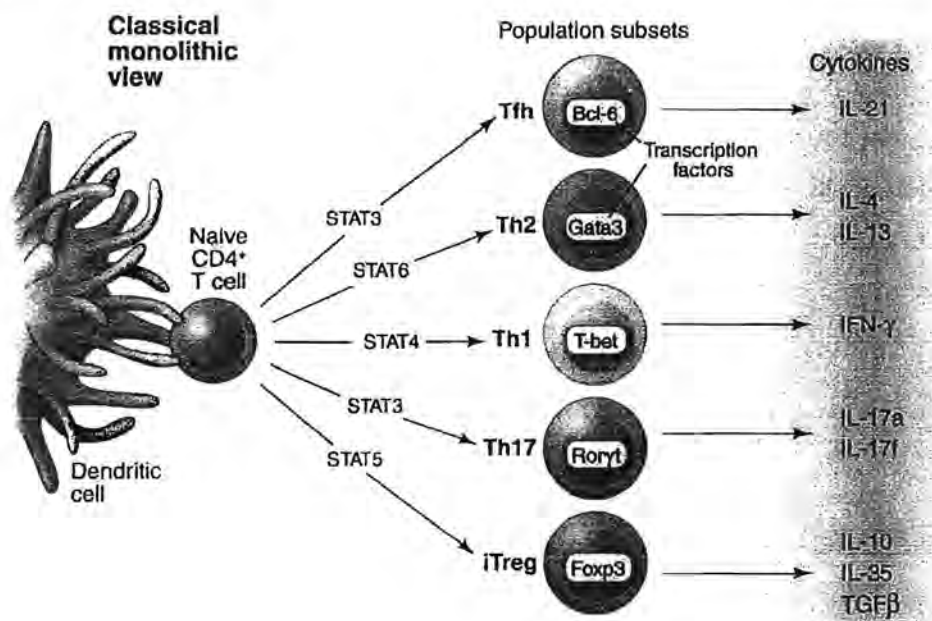
(ที่มา <http://www.retroscope.eu/wordpress/dengue-virus>)



แต่ถ้ามีการติดเชื้อไวรัสเดงก็ครั้งที่ 2 เป็นคนละสายพันธุ์ มักจะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรง อันเนื่องมาจากร่างกายสร้าง antibody (Ab) ที่จำเพาะกับซีโรทัยป์ที่ติดเชื้ครั้งแรก Ab นี้จะยังจับกับซีโรทัยป์ที่ติดครั้งที่สองได้แต่มีความสามารถในการ

neutralize ต่ำ จากนั้น virus-Ab complex นี้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน Fc receptors ทำให้มีปริมาณไวรัสในร่างกายสูงขึ้น และมีอาการรุนแรงมากขึ้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "antibody-dependent enhancement of infection" ทางด้าน Cellular immunity จะมี T cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการรับรู้แอนติเจน ส่งสัญญาณและฆ่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส โดยไวรัสเองก็สามารถกระตุ้น naïve CD4+ T cells ซึ่ง naïve CD4+ T cells สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ effector cell ชนิดต่างๆ ได้ เช่น T helper 1 cells (Th1), T helper 2 cells (Th2), T helper 17 cells (Th17), T regulatory cells (Treg) และ T follicular helper cells (TFH) และสามารถกระตุ้น naïve CD8+ T cells ให้กลายเป็น cytotoxic T lymphocyte (CTL) หรือ cytotoxic T effector cells โดย T cells แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและหน้าที่แตกต่างกันออกไป เพื่อช่วยในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสเองที่ (11-13) (รูปที่ 2)

**รูปที่ 2** Effector cells ที่เกิดจากการ differentiate naïve CD4+ T cells (ที่มา O'Shea and Paul. 2010. Science)



**T helper 1 cells (Th1) (12)**

Naïve CD4+ T cells ที่มี signal transcription factor เป็น T-bet จะทำให้เกิดรูปแบบของ effector cell ไปเป็น T helper 1 cells (Th1) เมื่อถูกกระตุ้นจะหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด interferon gamma (IFN-γ) เป็นหลัก, interleukin-2 (IL-2) โดย IFN-γ จะช่วยกระตุ้นการทำงานของ macrophage ในการทำลายเซลล์ที่มีติดเชื้อไวรัส

**T helper 2 cells (Th2) (12)**

Naïve CD4+ T cells ที่มี signal transcription factor เป็น GATA-3 จะทำให้เกิดรูปแบบของ effector cell ไปเป็น T helper 2 cells (Th2) เมื่อถูกกระตุ้นจะหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) และ interleukin-3 (IL-3) ซึ่งจะช่วยกระตุ้น mast cell และ eosinophil ให้มีการหลั่ง mucus มากขึ้น และช่วยกระตุ้นให้ plasma cell สร้าง IgE เกี่ยวข้องกับโรคภูมิแพ้และหอบหืด

### T helper 17 cells (Th17)<sup>(13)</sup>

Naïve CD4+ T cells ที่มี signal transcription factor เป็น ROR $\gamma$  จะทำให้เกิดรูปแบบของ effector cell ไปเป็น T helper 17 cells (Th17) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสร้างไซโตไคน์ชนิด interleukin-17 (IL-17) ได้แก่ IL-17A, IL-17F และ IL-12 โดยไซโตไคน์เหล่านี้จะช่วยให้ neutrophil และ monocyte เข้าไปทำลายเชื้อแบคทีเรียบริเวณที่มีการอักเสบ หรือเชื้อราที่อยู่ภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ ยังเกี่ยวข้องกับ inflammation และ autoimmune โดย TGF- $\beta$  และ IL-6 เป็นตัวช่วยกระตุ้นให้ naïve T cell หลังการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-17 ส่วน TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  จะทำให้ IL-17 มีการแสดงออกมากขึ้น

### T regulatory cells (Treg)<sup>(13)</sup>

Naïve CD4+ T cells ที่มี signal transcription factor เป็น Forkhead box P3 (FoxP3) จะทำให้เกิดรูปแบบของ effector cell ไปเป็น T regulatory cells (Treg) เกี่ยวข้องกับ immune suppression โดยจะทำการสร้างไซโตไคน์ชนิด interleukin-10 (IL-10) และ TGF- $\beta$  ซึ่งเป็น immunosuppressive cytokine ของ T cell activation และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง FoxP3 นอกจากนี้ IL-6 ยังเป็นไซโตไคน์ที่สามารถยับยั้งการสร้าง FoxP3 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำผ่านทาง TGF- $\beta$  ได้

### T follicular helper cells (TFH)<sup>(14-16)</sup>

Naïve CD4+ T cells ที่มี signal transcription factor เป็น Bcl-6 เป็น T cells ที่อยู่ใน lymph node ทำหน้าที่ช่วย B cells เรียกว่า T follicular helper cells (TFH) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสร้างไซโตไคน์ชนิด interleukin-21 (IL-21) โดย Naïve CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกีใน T cell zone จะกลายเป็น activated CD4+ T cells สามารถหลั่งสาร interleukin-21 (IL-21) และมีการแสดงออกของโมเลกุล inducible co-stimulator (ICOS) โดยการแสดงออกของโมเลกุลต่างๆ จะยังคงอยู่โดยการกระตุ้นผ่านทาง T cell receptor (TCR), ICOS และ IL-21 receptor ซึ่งอยู่ในบริเวณ T cell – B cell border โดยจะทำให้เกิดการแสดงออกของโมเลกุล CXC-chemokine receptor 5 (CXCR5) เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของโมเลกุล CC-chemokine receptor 7 (CCR7) ลดลง ซึ่งเป็นตัวควบคุมในการช่วยพา activated CD4+ T cells ผ่านเข้าไปในบริเวณ B cell zone เราจะเรียก activated CD4+ T cells นี้ว่า T follicular helper cells (TFH) เมื่อ TFH ผ่านเข้าไปอยู่ในบริเวณ B cell zone จะมีบทบาทในการนำเสนอแอนติเจนให้กับ B cells เพื่อให้ B cell กลายเป็น plasma cells ซึ่งอยู่ใน germinal center ทำหน้าที่สร้าง Antibody นอกจากนี้ TFH ยังสามารถสร้างสารไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  และ IL-4 แต่มีปริมาณน้อยกว่าที่สร้างจาก Th1 และ Th2

### Cytotoxic T lymphocyte (CTL)

Naïve CD8+ T cells ที่มี signal transcription factor เป็น Blimp-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน Naïve CD8+ T cells จะเปลี่ยนสภาพไปเป็น cytotoxic T lymphocyte (CTL) หรือ cytotoxic T effector cells ซึ่งจะช่วยในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส โดยการใช้ TCR ในการจับกับ peptide ที่อยู่ใน groove ของโมเลกุล HLA class I และ CTL จะหลั่งสาร perforin, granzymes และ granulysin ออกมาเพื่อฆ่า target cells นอกจากนี้ CTL ยังสามารถสร้างสารไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ซึ่งจะช่วย

ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) จะช่วยให้ target cells ตายแบบ apoptosis

นอกจากนี้ การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CCR7 และ CD45RA ช่วยแบ่ง T cell subset ออกเป็นชนิดต่างๆ ได้แก่ Naïve T cells จะมีการแสดงออกของโมเลกุลเป็นแบบ CCR7+ CD45RA+; Central memory (CM) T cells จะมีการแสดงออกของโมเลกุลเป็นแบบ CCR7+ CD45RA-; Effector memory (EM) T cells จะมีการแสดงออกของโมเลกุลเป็นแบบ CCR7- CD45RA- และ Late effector (LE) T cells จะมีการแสดงออกของโมเลกุลเป็นแบบ CCR7- CD45RA+ <sup>(15-18)</sup> (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1:** การจำแนก T cell subset โดยการใช้ CCR7 และ CD45RA

	CCR7	CD45RA
Naïve T cells	+	+
Central memory (CM) T cells	+	-
Effector memory (EM) T cells	-	-
Late effector (LE) T cells	-	+

Naïve T cells (CCR7+ CD45RA+) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน จะเปลี่ยนจาก CD45RA ไปเป็น memory cell ซึ่งมีการแสดงออกของโมเลกุล CD45RO และ CCR7 ซึ่งเป็น chemokine receptor จะช่วยแบ่งแยก memory T cells ออกเป็นชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) Central memory (CM) T cells (CCR7+ CD45RA-) ซึ่งเป็นตัวควบคุมในการช่วยพา activated CD4+ T cells ผ่านเข้าไปในบริเวณ lymph node และมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนสูง (2) Effector memory (EM) T cells (CCR7- CD45RA-) ซึ่งเป็น effector cells ที่พบอยู่ใน peripheral tissue และในสภาวะที่มี Ag ปริมาณมาก (3) Late effector T cells (CCR7- CD45RA+) ซึ่งเป็นเซลล์ terminal differentiated effector cells มักพบใน memory CD8+ T cells ซึ่งช่วยในขบวนการ Ag clearance CCR7- memory T cells จะมีการแสดงออกของ  $\beta 1$  และ  $\beta 2$  integrins ในระดับสูง ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการนำเซลล์ไปที่ inflamed tissues นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการกระตุ้นด้วย tetanus toxoid ทำให้ naïve T cells, CM T cells และ EM T cells สามารถหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ในขณะที่ EM T cells และ LE T cells สามารถหลั่งไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  <sup>(19-22)</sup>

เนื่องจากผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในระยะ acute phase พบว่ามีปริมาณ CD4+ T-cells, CD8+ T-cells และ natural killer ลดลง ซึ่งทำให้การตอบสนองทางด้าน B cells ไม่ดีจึงทำให้เกิดการสร้าง antibody ไม่เพียงพอต่อการต่อต้านเชื้อไวรัส อีกทั้งการศึกษา TFH และ subset T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกีก็ยังมีปริมาณน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำงานวิจัยนี้ โดยมุ่งเน้นในการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกีสายสั้นๆ ที่เรียกว่า peptide ว่ามีคุณสมบัติแตกต่างกันอย่างไรในแต่ละระยะเวลาของการติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย (acute, convalescent และ follow-up phase) โดยจะทำการศึกษาคูณลักษณะของเซลล์ชนิด TFH ที่มีการแสดงออกของ CXCR5+ICOS+ ทั้งในแง่ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells โดยดูการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17 และ IL-21 นอกจากนี้ยังทำการศึกษ subset T cells ว่ามีลักษณะเป็น naïve T cells, CM T cells, EM T cells และ LE T cells แตกต่างกันอย่างไร โดยการวิจัย

ดังกล่าวจะช่วยเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคไข้เลือดออกต่อไปในอนาคต

### วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อศึกษาคุณลักษณะและปริมาณของ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells และ subset T cells (naive, CM, EM และ LE) ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อเดงกีในคนไทย
- (2) เพื่อศึกษาบทบาทของ TFH cells ทั้ง CD4+ T cells และ CD8+ T cells และ subset T cells (naive, CM, EM และ LE) หลังจากกระตุ้นด้วย NS3 peptides และ Env peptides ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อเดงกีในคนไทย

### ระเบียบวิธีการวิจัย

เริ่มจากอาสาสมัครติดเชื้อไวรัสเดงกีที่มีอาการในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก เป็นแบบ DF, DSS และ DHF ทำการเจาะเลือดและเก็บ serum เพื่อส่งตรวจ serotype เลือดที่เหลือจะนำมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เพื่อทำการตรวจหาคุณลักษณะและปริมาณของ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells และ subset T cells (naive, CM, EM และ LE) และดูความสามารถในการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17 และ IL-21 โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC ที่แยกได้จากกระแสเลือดมาทำการกระตุ้นด้วย dengue antigen (peptides) ชนิด NS3 และ Env และทำการย้อมสี fluorescence ด้วยวิธี intracellular cytokine staining (ICS) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry (LSRII) โปรแกรม FACS Diva หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาหาความสัมพันธ์กับระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย

### วิธีการทดลอง

#### กลุ่มตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้รับความร่วมมือจากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลสมุทพรปราการ ในการประสานงานจัดเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเด็กที่ป่วยเป็นโรคไข้เลือดออก ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้ทั้งในช่วงที่เป็น acute phase และ convalescent phase โดยเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมดจำนวน 48 ราย และแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความรุนแรงของโรค ได้แก่ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออกแบบ Dengue fever (DF) จำนวน 19 ราย กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออกแบบ Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) จำนวน 26 ราย และกลุ่มที่ 3 กลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออกแบบ Dengue Shock Syndrome (DSS) จำนวน 3 ราย นอกจากนี้ยังได้เจาะเก็บตัวอย่างเลือดซ้ำในผู้ป่วยรายเดิมหลังจากติดเชื้อประมาณ 3 เดือน (Follow-up phase) ได้อีกจำนวน 10 ราย เป็นเด็ก 9 รายและผู้ใหญ่ 1 ราย มาทำการศึกษา recall memory ของ T cells หลังจากกระตุ้นด้วย dengue antigen (peptides) ชนิด NS3 และ Env protein ทำการเก็บตัวอย่าง PBMC ที่เก็บได้ในแต่ละครั้งไว้ในถัง Liquid nitrogen (-196 °C)

ตัวอย่างคนไข้ทั้งหมดที่เก็บได้ในช่วง acute phase ได้ถูกนำมาทำการตรวจหา serotype ของไวรัสเดงกีในกระแสเลือด โดยการตรวจหา genome ของไวรัส ด้วยวิธี semi-nested multiplex PCR ซึ่งอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะของ viral genome กับ serotype-specific primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา



### การแยก Peripheral blood Mononuclear Cells (PBMCs) จากเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด Acid citrate dextrose (ACD) นำตัวอย่างเลือดมาแยก PBMC ด้วยวิธี Density gradient centrifugation นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จะได้ของเหลวออกมาเป็น 4 ชั้น คือ plasma; PBMC (ลักษณะเป็นวงแหวนสีขาวขุ่น); Ficoll-Hypaque และ red blood cell จากบนลงล่าง เก็บส่วนที่เป็น PBMC นำไปปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI1640 ที่ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด R10 (RPMI1640 ที่มี fetal bovine serum [FBS] 10%) นำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำไปเก็บไว้ในถัง Liquid nitrogen จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบพร้อมกัน

### การออกแบบ และการสร้าง Overlapping peptide (OLP)

หา sequence ของโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ Dengue virus ในผู้ติดเชื้อคนไทยที่มีการรายงานใน GenBank database ได้แก่ Non-structural protein 3 (NS3) จำนวน 10 รายและ Envelop (Env) จำนวน 124 ราย นำ consensus sequence ทั้งหมดที่ได้เลือกไว้มาเปรียบเทียบกับ amino acids alignment ของเชื้อใน serotype 2 เพื่อให้ได้ส่วนของ peptide ที่ครอบคลุมและเป็นตัวแทนที่ดีของเชื้อที่กำลังระบาดอยู่ในขณะนั้น เข้าโปรแกรม PeptGen ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับการออกแบบ overlapping peptides (OLP) โดยจะเลือก peptide ที่มีขนาด 18-20 amino acids และ overlap กัน 10 amino acids โดยสังเคราะห์ทั้ง whole protein ของ NS3 และ Env protein ของเชื้อไวรัสเดงกี serotype 2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดมากที่สุดในประเทศไทย หลังจากนั้นส่งข้อมูล sequence ทั้งหมดให้กับบริษัทเพื่อทำการสังเคราะห์ peptide นำ peptide ที่สังเคราะห์ได้มาทำการเตรียมเป็น pool peptide เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

### Overlapping peptide design and synthesis ที่ใช้ในการศึกษา

ทำการออกแบบสร้าง OLPs ของเชื้อไวรัสเดงกี serotype 2 ทั้งหมด 110 เส้น ได้แก่ ในส่วนของ NS3 จำนวน 61 เส้น และ Env peptides จำนวน 49 เส้น โดยแต่ละเส้นประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัวและจะมีการ overlap กันด้วยกรดอะมิโนจำนวน 10 ตัว โดยแสดงรายละเอียด peptide แต่ละเส้นไว้ในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2: Non-structural protein 3 (NS3) Peptide Sequences

No.	Protein	Serotype	Peptide Sequence
1	NS3	2	AGVLWDVPSPPPMGKAELED
2	NS3	2	PPMGKAELEDGAYRIKQKGI
3	NS3	2	GAYRIKQKGI LGYSQIGAGV
4	NS3	2	LGYSQIGAGVYKEGTFHTMW
5	NS3	2	YKEGTFHTMWHVTRGAVLMH
6	NS3	2	HVTRGAVLMHKGKRIEPSWA
7	NS3	2	KGKRIEPSWADVKKDLISYG
8	NS3	2	DVKKDLISYGGGWKLEGEWK
9	NS3	2	GGWKLEGEWKEGEEVQVLAL
10	NS3	2	EGEEVQVLALPEGKNPRAVQ
11	NS3	2	EPGKNPRAVQTKPGLFKTNT
12	NS3	2	TKPGLFKTNTGTIGAVSLDF

No.	Protein	Serotype	Peptide Sequence
13	NS3	2	GTIGAVSLDFSPGTSGSPII
14	NS3	2	SPGTSGSPIIDKKGKWGLY
15	NS3	2	DKKGKWGLYGNWVTRSGA
16	NS3	2	GNGWVTRSGAYVSAIAQTEK
17	NS3	2	YVSAIAQTEKSIEDNPEIED
18	NS3	2	SIEDNPEIEDDIFRKRRLTI
19	NS3	2	DIFRKRRLTIMDLHPGAGKT
20	NS3	2	MDLHPGAGKTKRYLPAIVRE
21	NS3	2	KRYLPAIVREAIKRGLRTLTI
22	NS3	2	AIKRGLRTLILAPTRVAAE
23	NS3	2	LAPTRVAAEMEEALRGLPI
24	NS3	2	MEEALRGLPIRYQTPAIRAE
25	NS3	2	RYQTPAIRAEHTGREIVDLM
25	NS3	2	RYQTPAIRAEHTGREIVDLM
26	NS3	2	HTGREIVDLMCHATFTMRLI
27	NS3	2	CHATFTMRLISPVRVPNYNL
28	NS3	2	SPVRVPNYNLIIMDEAHFTD
29	NS3	2	IIMDEAHFTDPASIAARGYI
30	NS3	2	PASIAARGYISTRVEMGEAA
31	NS3	2	STRVEMGEAAGIFMTATPPG
32	NS3	2	GIFMTATPPGSRDPFPQSNA
33	NS3	2	SRDPFPQSNAPIIDEEREIP
34	NS3	2	PIIDEEREIPERSWNSGHEW
35	NS3	2	ERSWNSGHEWVDFKGGKTWW
36	NS3	2	VDFKGGKTWWFVPSIKAGND
37	NS3	2	FVPSIKAGNDIAACLKNGK
38	NS3	2	IAACLKNGKVKIQLSRKTF
39	NS3	2	KVIQLSRKTFDSEYVKTRTN
40	NS3	2	DSEYVKTRTNDWDFVTTDI
41	NS3	2	DWDFVTTDISEMGANFKAE
42	NS3	2	SEMGANFKAERVIDPRRCMK
43	NS3	2	RVIDPRRCMKPVILTDGEER
44	NS3	2	PVILTDGEERVILAGPMPVT
45	NS3	2	VILAGPMPVTHSSAAQRRGR
46	NS3	2	HSSAAQRRGRIGRNPKNEND
47	NS3	2	IGRNPKNENDQYIYMGEPL
48	NS3	2	QYIYMGEPLENDEDCAHWKE
49	NS3	2	NDEDCAHWKEAKMLLDNINT

No.	Protein	Serotype	Peptide Sequence
50	NS3	2	AKMLLDNINTPEGIIPSMFE
51	NS3	2	PEGIIPSMFEPERЕКVDAID
52	NS3	2	PERЕКVDAIDGEYRLRGEAR
53	NS3	2	GEYRLRGEARKTFVDLMRRG
54	NS3	2	KTFVDLMRRGDLPWLAYKY
55	NS3	2	DLPWLAYKVAAEGINYADR
56	NS3	2	AAEGINYADRRWCDFGIKNN
57	NS3	2	RWCDFGIKNNQILEENVEVE
58	NS3	2	QILEENVEVEIWTKEGERKK
59	NS3	2	IWTKEGERKKLKPRWLDARI
60	NS3	2	LKPRWLDARIYSDPLALKEF
61	NS3	2	YSDPLALKEFKEFAAGRK

**ตารางที่ 3:** Envelope protein (E) Peptide Sequences

No.	Protein	Serotype	Peptide Sequence
1	E	2	MTMRCIGISNRDFVEGVSGG
2	E	2	RDFVEGVSGGSWVDIVLEHG
3	E	2	SWVDIVLEHGSCVTTMAKNK
4	E	2	SCVTTMAKNKPTLDFELIKT
5	E	2	PTLDFELIKTEAKQPATLRK
6	E	2	EAKQPATLRKYCIEAKLTNT
7	E	2	YCIEAKLTNTTRESRCPTQG
8	E	2	TRESRCPTQGEPSLKEEQDK
9	E	2	EPSLKEEQDKRFVCKHSMVD
10	E	2	RFVCKHSMVDRGWGNGCGLF
11	E	2	RGWGNGCGLFGKGGIVTCAM
12	E	2	GKGGIVTCAMFTCKKNMEGK
13	E	2	FTCKKNMEGKIVQPENLEYT
14	E	2	IVQPENLEYTIVTPHSGEE
15	E	2	IVTPHSGEEHAVGNDTGKH
16	E	2	HAVGNDTGKHGKEIKVTPQS
17	E	2	GKEIKVTPQSSITEAELTGY
18	E	2	SITEAELTGYGTVTMECSPR
19	E	2	GTVTMECSPRTGLDFNEMVL
20	E	2	TGLDFNEMVLLQMENKAWLV
21	E	2	LQMENKAWLVHRQWFLDLPL
22	E	2	HRQWFLDLPLPWLPGADKQE
23	E	2	PWLPGADKQESNWIQKETLV

No.	Protein	Serotype	Peptide Sequence
24	E	2	SNWIKETLVTFKNPHAKKQ
25	E	2	TFKNPHAKKQDVVWLGSEQE
26	E	2	DVVWLGSEQEGAMHTALTGAT
27	E	2	AMHTALTGATEIQMSSGNLL
28	E	2	EIQMSSGNLLFTGHLKCRRLR
29	E	2	FTGHLKCRRLRMDKLQKGM
30	E	2	MDKLQKGMSSMCTGKFKV
31	E	2	YSMCTGKFKVKEIAETQHG
32	E	2	VKEIAETQHGTIVIRVQYEG
33	E	2	TIVIRVQYEGDGSPCKIPFE
34	E	2	DGSPCKIPFEIMDLEKRYVL
35	E	2	IMDLEKRYVLGRLITVNP
36	E	2	GRLITVNPVTEKDSPVNI
37	E	2	TEKDSPVNIEAEPFGDSYI
38	E	2	AEPFGDSYIIIGVEPGQLK
39	E	2	IIGVEPGQLKLNWFKKGSSI
40	E	2	LNWFKKGSSIGQMFETMRG
41	E	2	GQMFETMRGAKRMAILGDT
42	E	2	AKRMAILGDTAWDFGSLGGV
43	E	2	AWDFGSLGGVFTSIGKALHQ
44	E	2	FTSIGKALHQVFGAIYGA
45	E	2	VFGAIYGAAFSGVSWTMKIL
46	E	2	SGVSWTMKILIGVIITWIGM
47	E	2	IGVIITWIGMNSRSTLSVS
48	E	2	NSRSTLSVSLVLVGI
49	E	2	LVLVGI

**การตรวจหาการตอบสนองของ dengue specific T cells ด้วยวิธีการย้อม Intracellular cytokine staining (ICS)**

นำ PBMCs มากระตุ้นด้วย Pool peptides ของ NS3 และ ENV ใน serotype 2 และกระตุ้นด้วย SEB (staphylococcal enterotoxin B) และ PMA/ionomycin เป็น positive control และไม่กระตุ้น เป็น negative control เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการยับยั้งการหลั่งสารไซโตไคน์ด้วย Brefeldin A (BFA) จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมาทำการ fix ด้วย 4% paraformaldehyde และเจาะรูเซลล์ด้วย 1X FACS Permeabilizing หลังจากนั้นย้อมด้วยสี fluorescence ชนิด IFN- $\gamma$ -FITC/IL-17A-PE/ICOS-PE-Cy7/IL21-AlexaF647/CXCR5-PerCP/CCR7-AlexaF700/CD45RA-APC-Cy7/CD4-PETx หรือ CD8-PETx และทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง flow cytometry (LSRII) โปรแกรม FACS Diva

## ผลการทดลอง

### Demographic data

ผู้ป่วยเด็กที่ป่วยเป็นโรคไข้เลือดออกจากแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลสมุทรปราการ จำนวน 48 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความรุนแรงของโรค ได้แก่ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออกแบบ Dengue fever (DF) จำนวน 20 ราย กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออกแบบ Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) จำนวน 25 ราย และกลุ่มที่ 3 กลุ่มที่มีอาการไข้เลือดออกแบบ Dengue Shock Syndrome (DSS) จำนวน 3 ราย มีอายุระหว่าง 7 – 14 ปี (เฉลี่ย 11 ปี) เป็นชาย 22 ราย และหญิง 26 ราย ตัวอย่างเลือดในช่วง acute phase ได้ถูกนำมาจำแนก serotype ของไวรัส ด้วยวิธี semi-nested multiplex PCR พบว่าคนไข้ติดเชื้อไวรัส serotype 1 จำนวน 17 รายคิดเป็นร้อยละ 35, serotype 2 จำนวน 18 รายคิดเป็นร้อยละ 38, serotype 3 จำนวน 11 รายคิดเป็นร้อยละ 23 และ serotype 4 จำนวน 2 รายคิดเป็นร้อยละ 4 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4: แสดงคุณลักษณะของอาสาสมัครจำนวน 48 ราย

Serotype	N	Male	Female	mean Age (range) (years)	DF	DHF grade1	DSS
All	48	22	26	11 (7-14)	19	26	3
DENV1	17 (35%)	6	11	11 (8-14)	8	8	1
DENV2	18 (38%)	10	8	11 (7-14)	6	10	2
DENV3	11 (23%)	4	7	11 (7-14)	5	6	0
DENV4	2 (4%)	2	0	12 (10-13)	0	2	0

\*ผู้ใหญ่ 1 รายเป็นเพศหญิง อายุ 54 ปี ติดเชื้อ dengue serotype 2

นอกจากนี้ สามารถเก็บตัวอย่างเลือดซ้ำในผู้ป่วยรายเดิมหลังการติดเชื้อประมาณ 3 เดือน ตามระยะเวลาของการติดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง คือ (1) acute phase คือหลังมีไข้ 3-7 วัน (2) convalescent phase คือหลังมีไข้ 14 วัน และ (3) follow-up phase คือหลังมีไข้ 3 เดือน จำนวน 10 ราย เป็นเด็ก 9 รายและผู้ใหญ่ 1 ราย รวมทั้งหมด 30 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบการตอบสนองของ dengue specific T cells นอกจากนี้ผู้ติดเชื้อจำนวน 10 ราย พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส serotype 1 จำนวน 3 รายคิดเป็นร้อยละ 30, serotype 2 จำนวน 4 รายคิดเป็นร้อยละ 40 และ serotype 3 จำนวน 3 รายคิดเป็นร้อยละ 30 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5: แสดงคุณลักษณะของอาสาสมัครจำนวน 10 รายใน follow-up phase

No.	Patient's code	Age (yr)	Sex	Serotype	Symptom classification
1	APS 018	14	Female	Den1	DF
2	APS 026	14	Female	Den1	DHF grade 1
3	APS 029	12	Female	Den1	DF
4	APS025	13	Female	Den2	DF
5	APS 034	13	Female	Den2	DHF grade 1
6	APS 037	9	Male	Den2	DSS
7	APS 054	54	Female	Den2	DF
8	APS 001	9	Female	Den3	DF
9	APS 071	13	Female	Den3	DHF grade 1
10	APS 047	11	Female	Den3	DF

**ปริมาณของ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells และ subset T cells (naive, CM, EM และ LE) ในระยะต่างๆ ของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย**

ทำการตรวจวัด ปริมาณของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ในระยะเวลาต่างๆกัน พบว่า ค่ามัธยฐานของ CD4+ T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 10.5%, 17.4% และ 18.2% ตามลำดับ และ ค่ามัธยฐานของ CD8+ T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 27.9%, 33.6% และ 30.4% ตามลำดับ และปริมาณของ TFH CD4+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD4+) ในระยะเวลาต่างๆกัน พบว่า ค่ามัธยฐานของ TFH CD4+ T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 29.7%, 9.7% และ 17% ตามลำดับ และปริมาณของ TFH CD8+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD8+) ในระยะเวลาต่างๆกัน พบว่า ค่ามัธยฐานของ TFH CD8+ T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 27.9%, 19.5% และ 23% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังทำการตรวจหา subset T cells (Naive, CM, EM และ LE) ทั้งชนิด CD4+ และ CD8+ T cells ในระยะเวลาต่างๆกัน พบว่า ค่ามัธยฐานของ naive CD4+ T cells คือ 38.8%, 40.9% และ 32.8% CM CD4+ T cells คือ 35.2%, 26.6% และ 20.2% EM CD4+ T cells คือ 20.6%, 19.5% และ 33.6% LE CD4+ T cells คือ 5.7%, 8.8% และ 9.1% และค่ามัธยฐานของ naive CD8+ T cells คือ 40.6%, 32.7% และ 28.7% CM CD4+ T cells คือ 20.5%, 17.7% และ 12% EM CD4+ T cells คือ 15.9%, 28.8% และ 22.4% LE CD4+ T cells คือ 20.4%, 19.6% และ 31.2% ตามลำดับ

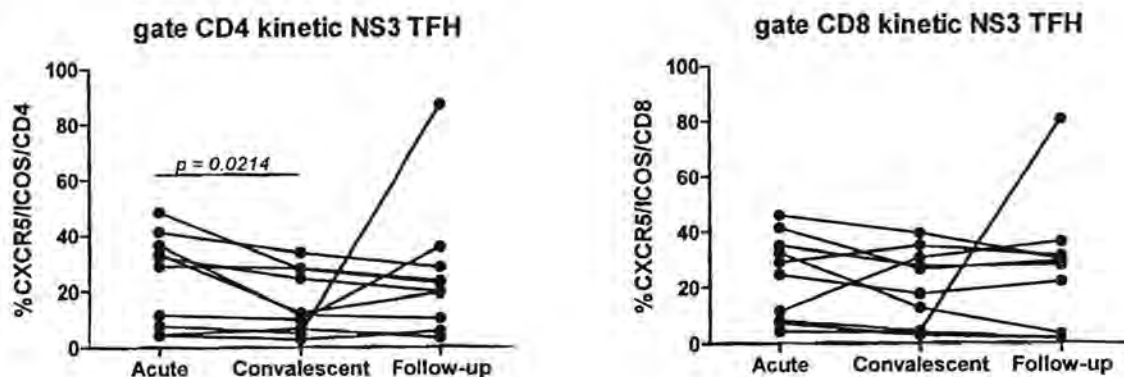
ตารางที่ 6: ปริมาณของ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells และ subset T cells (naive, CM, EM และ LE)

	Median (range)		
	Acute Phase	Convalescent Phase	Follow-up Phase
CD4+ T cells	10.5% (6% - 32.9%)	17.4% (7.6% - 26.2%)	18.2% (7.2% - 31.5%)
CD8+ T cells	27.9% (23.2% - 38.4%)	33.6% (15.2% - 44.7%)	30.4% (18.8% - 50%)
TFH CD4+ T cells	29.7% (3.1% - 41.1%)	9.7% (3.3% - 40%)	17% (2.4% - 31%)
TFH CD8+ T cells	27.9% (2.1% - 40%)	19.5% (2.5% - 44%)	23% (1.5% - 36%)
Naive CD4+ T cells	38.8% (18.7% - 45.6%)	40.9% (15.5% - 61.9%)	32.8% (15.1% - 55.6%)
Central memory CD4+ T cells	35.2% (23% - 48.5%)	26.6% (17.5% - 36.7%)	20.2% (11.5% - 33.4%)
Effector memory CD4+ T cells	20.6% (6.1% - 51.5%)	19.5% (3.8% - 53.6%)	33.6% (17.6% - 47.4%)
Late effector CD4+ T cells	5.7% (3.8% - 11.4%)	8.8% (4.7% - 23.9%)	9.1% (4.1% - 26.3%)
Naive CD8+ T cells	40.6% (21.7% - 61.1%)	32.7% (10.7% - 57.6%)	28.7% (12.9% - 44.9%)
Central memory CD8+ T cells	20.5% (8.4% - 32.2%)	17.7% (7% - 32.8%)	12% (2.8% - 15.8%)
Effector memory CD8+ T cells	15.9% (2.9% - 38.1%)	28.8% (7.7% - 52.2%)	22.4% (13.2% - 49.7%)
Late effector CD8+ T cells	20.4% (3.8% - 37.2%)	19.6% (5.3% - 35.9%)	31.2% (18.9% - 51.6%)

ปริมาณของ TFH cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides และ Env peptides ของ serotype 2 ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย

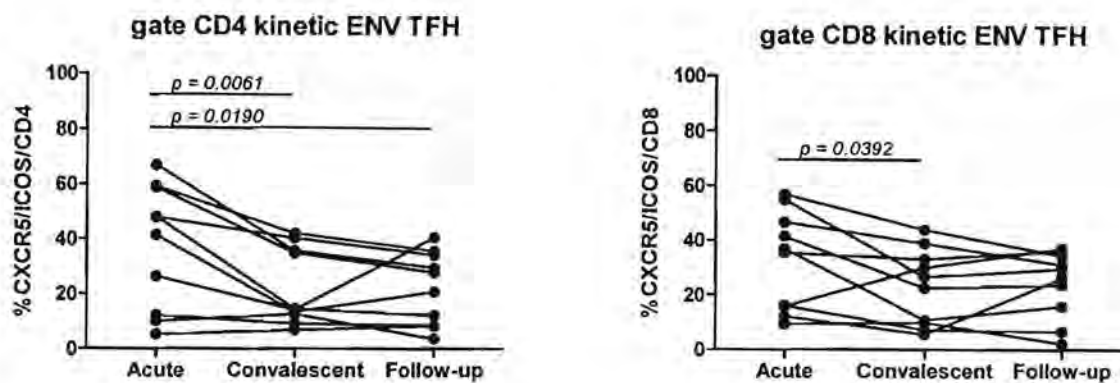
ทำการตรวจวัดปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides จำนวน 61 เส้น พบว่า ค่ามัธยฐานของ TFH CD4+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD4+) ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 30.8%, 11.9% และ 21.3% ตามลำดับ และค่ามัธยฐานของ TFH CD8+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD8+) ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 26.8%, 22.1% และ 28.9% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณ TFH CD4+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD4+) ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0214$ ) (รูปที่ 3)

รูปที่ 3: ปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides



และถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด Env peptides จำนวน 49 เส้น พบว่า ค่ามัธยฐานของ TFH CD4+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD4+) acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 44.6%, 14.4% และ 24.2% ตามลำดับ และค่ามัธยฐานของ TFH CD8+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD8+) ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 36.1%, 24.6% และ 27.9% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่า ปริมาณ TFH CD4+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD4+) ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0061$ ) และ acute phase มีปริมาณมากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0190$ ) และปริมาณ TFH CD8+ T cell (CXCR5+/ICOS+/CD8+) ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0392$ ) (รูปที่ 4)

**รูปที่ 4:** ปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด Env peptides



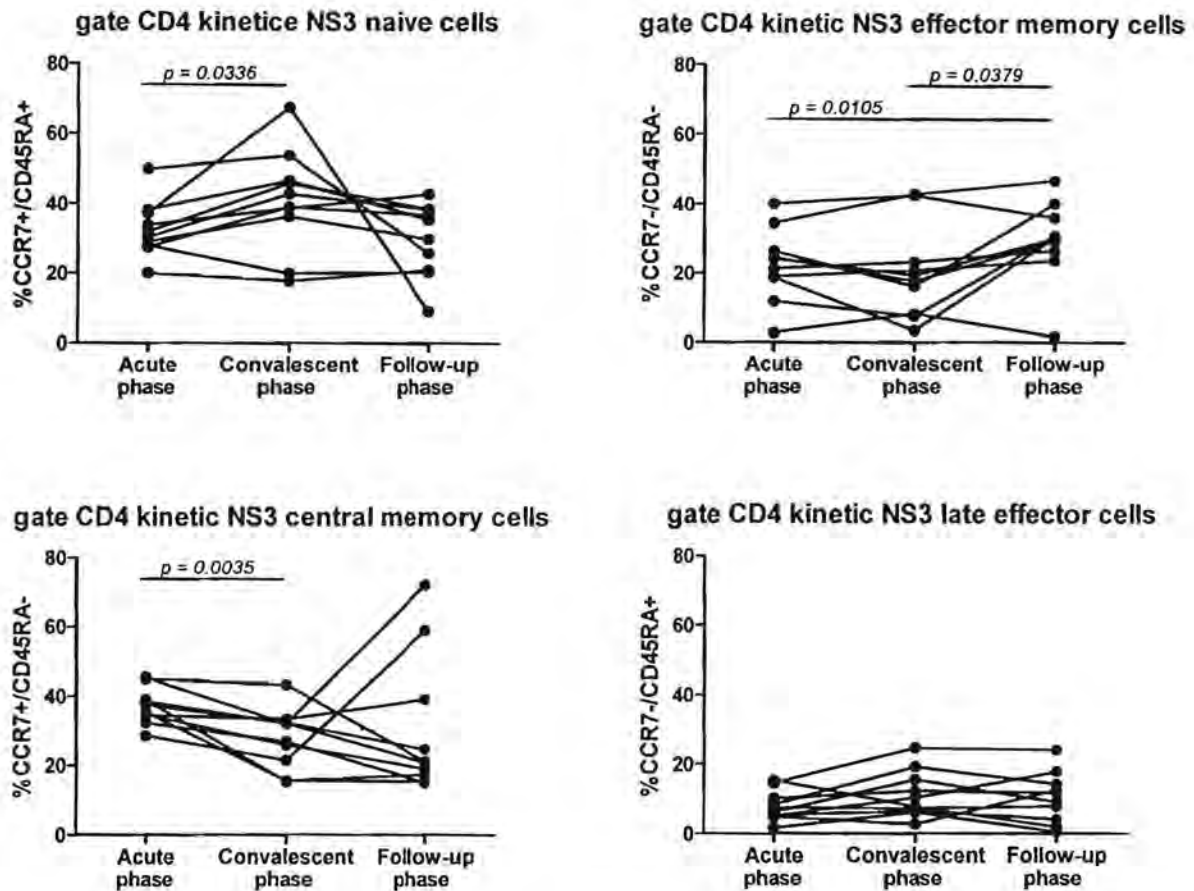
ปริมาณของ subset T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides และ Env peptides ของ serotype 2 ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย

ทำการตรวจวัดปริมาณ subset T cells ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells โดยดูจากการแสดงออกของ CCR7 และ CD45RA โดยแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ naive T cells (CCR7+ CD45RA+); central memory (CM) T cells (CCR7+ CD45RA-); effector memory (EM) T cells (CCR7- CD45RA+) และ late effector (LE) T cells (CCR7- CD45RA+) ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides จำนวน 61 เส้น พบว่า กลุ่มเซลล์ CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของ naive T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 31.2%, 40.9% และ 32.6% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ EM T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 22.8%, 18.5% และ 30.1% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ CM T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 36.5%, 29.5% และ 21.1% ตามลำดับ และ ค่ามัธยฐานของ LE T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 6.9%, 9.0% และ 10.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 7) เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณ naive T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0326$ ) ปริมาณ EM T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0105$ ) และ convalescent phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0379$ ) ปริมาณ



CM T cells ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0035$ ) และปริมาณ LE T cells ของแต่ละphase ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 5)

รูปที่ 5: ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD4+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides ของ serotype 2



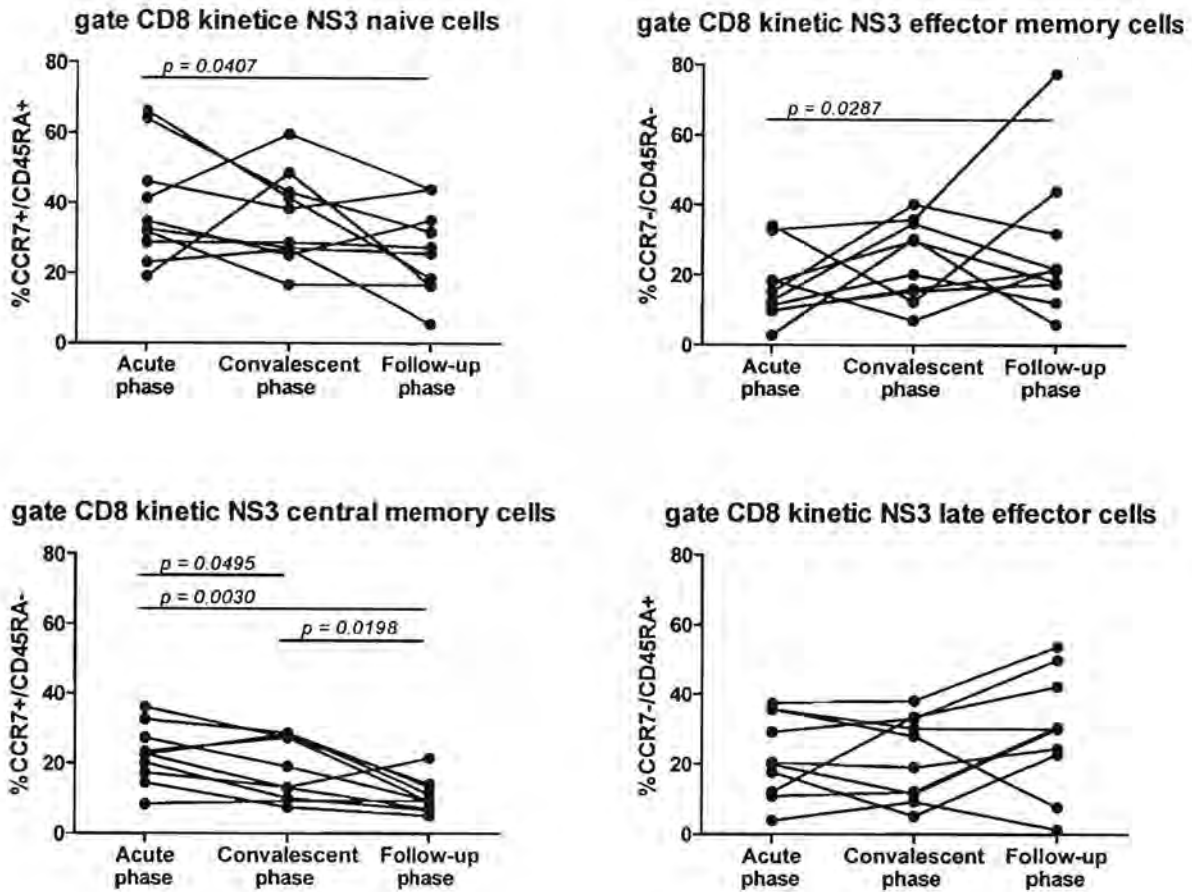
เมื่อกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides จำนวน 61 เส้น พบว่า กลุ่มเซลล์ CD8+ T cell มีค่ามัธยฐานของ naive T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 33.7%, 33.5% และ 26.4% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ EM T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 13.9%, 25% และ 21.5% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ CM T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 22.6%, 16% และ 10.3% ตามลำดับ และ ค่ามัธยฐานของ LE T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 20.2%, 23.6% และ 30.1% ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7: ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides และ Env peptides ของ serotype 2

	Median (range)		
	Acute Phase	Convalescent Phase	Follow-up Phase
<b>NS3 activated CD4+ T cells</b>			
- naïve cells	31.2% (20.1% - 50%)	40.9% (17.7% - 67.4%)	32.6% (9% - 42.8%)
- Central memory cells	36.5% (28.6% - 45.4%)	29.5% (15.4% - 43.2%)	21.1% (15.1% - 72.2%)
- Effector memory cells	22.8% (2.8% - 40.1%)	18.5% (3.4% - 42.9%)	30.1% (1.6% - 46.8%)
- Late effector	6.9% (1.7% - 15.4%)	9.0% (2.7% - 24.7%)	10.4% (0.5% - 24%)
<b>Env activated CD4+ T cells</b>			
- naïve cells	23.8% (18.5% - 51.2%)	33.1% (18.9% - 56.1%)	31.1% (11.1% - 49.8%)
- Central memory cells	51.3% (34.2% - 67%)	36.5% (25.1% - 47.5%)	23.8% (20.4% - 49.4%)
- Effector memory cells	15.2% (2.5% - 27.6%)	17.6% (3% - 32.9%)	25.2% (17.6% - 61.4%)
- Late effector	4.5% (1.8% - 11.4%)	9.8% (2.7% - 24.2%)	10.4% (3.8% - 25%)
<b>NS3 activated CD8+ T cells</b>			
- naïve cells	33.7% (19% - 66.1%)	33.5% (16.6% - 59.5%)	26.4% (5.4% - 43.9%)
- Central memory cells	22.6% (8.4% - 36.1%)	16% (7.4% - 28.7%)	10.3% (5% - 74.3%)
- Effector memory cells	13.9% (2.8% - 34.1%)	25% (7% - 40.3%)	21.5% (5.9% - 77.6%)
- Late effector	20.2% (3.9% - 37.4%)	23.6% (5.2% - 38.2%)	30.1% (1.3% - 53.8%)
<b>Env activated CD8+ T cells</b>			
- naïve cells	26.7% (17.2% - 58.1%)	30.5% (18.4% - 50.9%)	25.1% (14% - 43.2%)
- Central memory cells	37.3% (14% - 57%)	22.7% (11.2% - 36.5%)	15.4% (6.5% - 27.2%)
- Effector memory cells	11.5% (2.1% - 37.1%)	23.3% (6.6% - 34.9%)	20.1% (12.5% - 50.2%)
- Late effector	16.4% (3.3% - 34.9%)	22.9% (6% - 43.7%)	30.7% (9.3% - 50.2%)

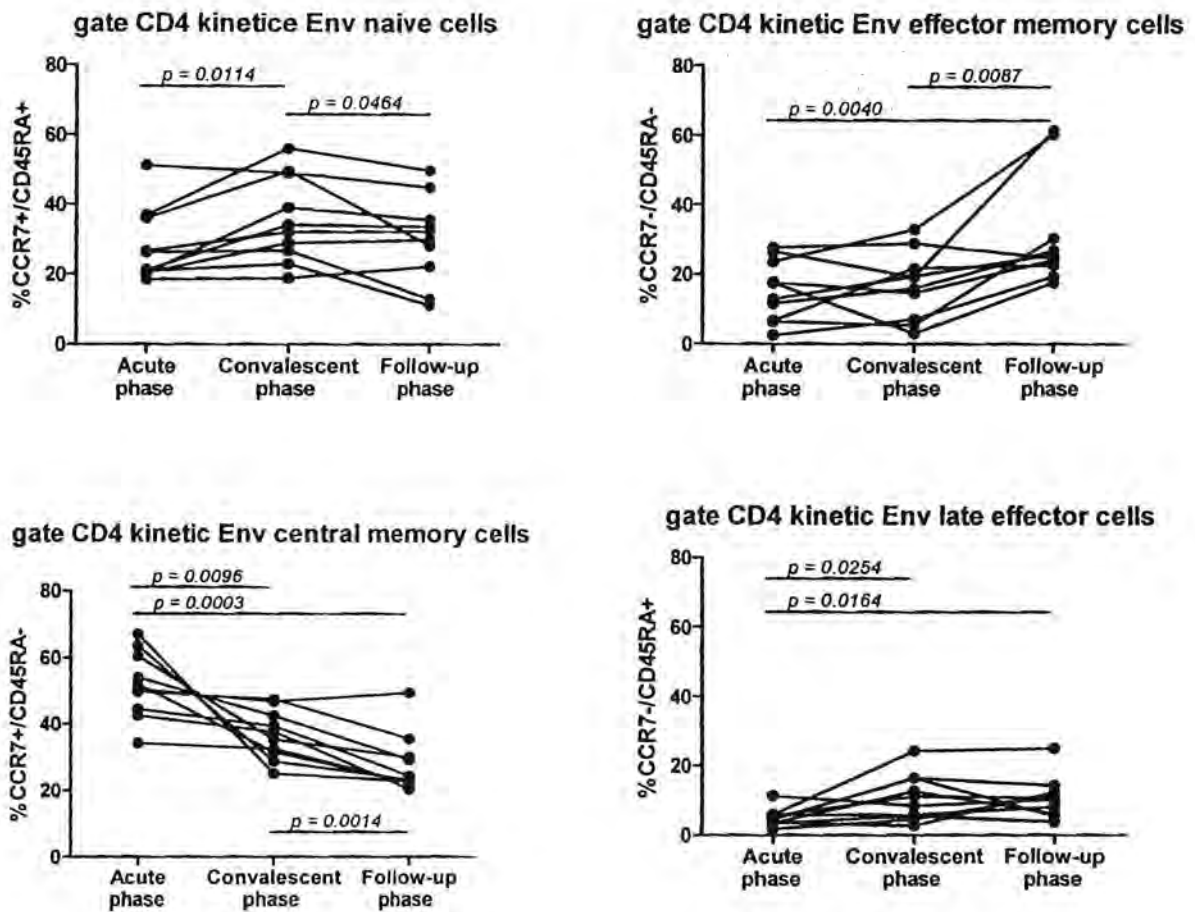
เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณ naïve cells ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0407$ ) ปริมาณ EM T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0105$ ) และ convalescent phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0287$ ) ปริมาณ CM T cells ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0495$ ,  $p = 0.0030$  ตามลำดับ) และ convalescent phase มีปริมาณมากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0198$ ) และปริมาณ LE T cells ของแต่ละ phase ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 6)

รูปที่ 6: ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides ของ serotype 2



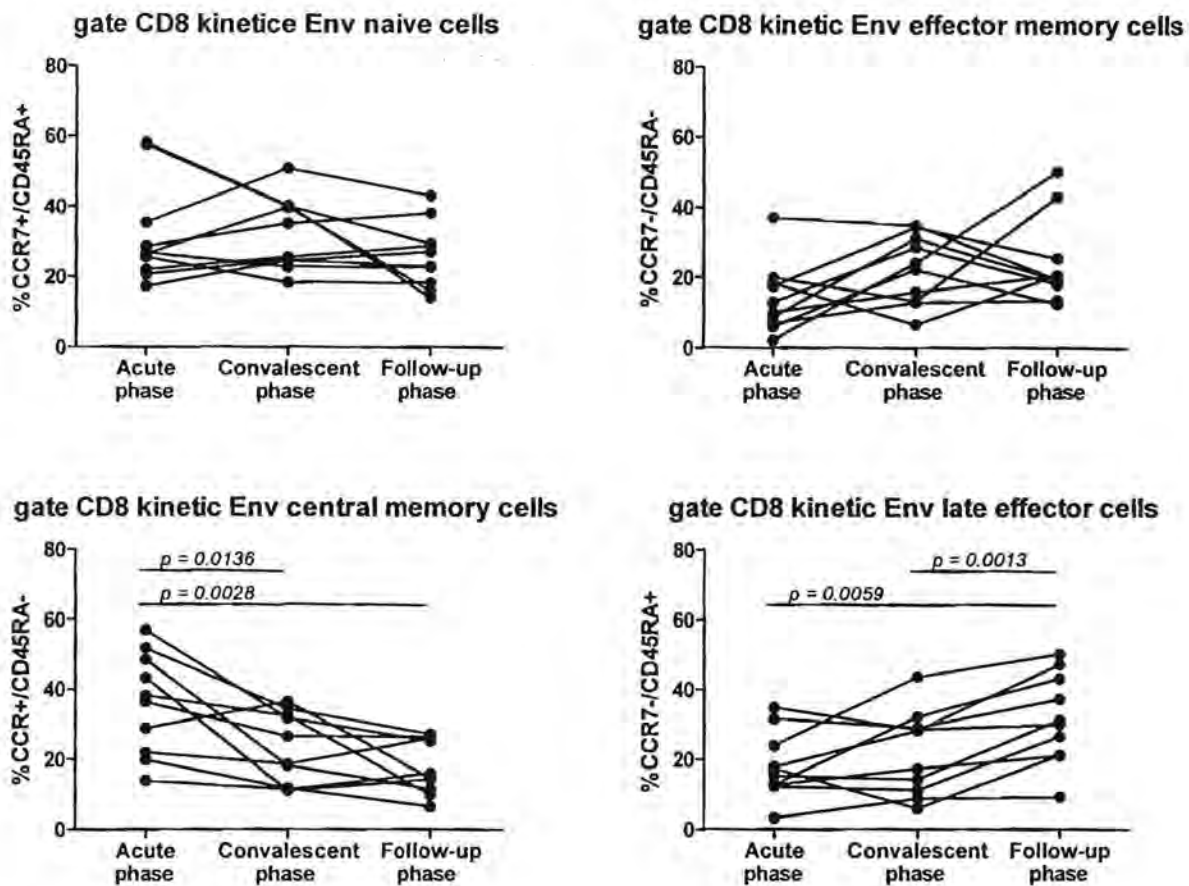
เมื่อกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด Env peptides จำนวน 49 เส้น พบว่า กลุ่มเซลล์ CD4+ T cell มีค่ามัธยฐานของ naive T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 23.8%, 33.1% และ 31.1% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ EM T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 15.2%, 17.6% และ 25.2% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ CM T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 51.3%, 36.5% และ 23.8% ตามลำดับ และ ค่ามัธยฐานของ LE T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 4.5%, 9.8% และ 10.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 7) เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณ naive T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0114$ ) และ convalescent phase มีปริมาณมากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0464$ ) ปริมาณ EM T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0040$ ) และ convalescent phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0087$ ) ปริมาณ CM T cells ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0096$  และ  $p = 0.0003$  ตามลำดับ) และ convalescent phase มีปริมาณมากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0014$ ) และปริมาณ LE T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0254$  และ  $p = 0.0164$  ตามลำดับ) (รูปที่ 7)

รูปที่ 7: ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD4+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides ของ serotype 2



เมื่อกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด Env peptides จำนวน 49 เส้น พบว่า กลุ่มเซลล์ CD8+ T cell มีค่ามัธยฐานของ naive T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 26.7%, 30.5% และ 25.1% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ Effector memory T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 11.5%, 23.3% และ 20.1% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของ central memory T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 37.3%, 22.7% และ 15.4% ตามลำดับ และ ค่ามัธยฐานของ LE T cells ของ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 16.4%, 22.9% และ 30.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 7) เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณ naive T cells และ EM T cells ของแต่ละ phase ไม่มีความแตกต่างกัน ปริมาณ CM T cells ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0136$  และ  $p = 0.0028$  ตามลำดับ) และปริมาณ LE T cells ของ acute phase มีปริมาณน้อยกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0059$ ) และ convalescent phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0013$ ) (รูปที่ 8)

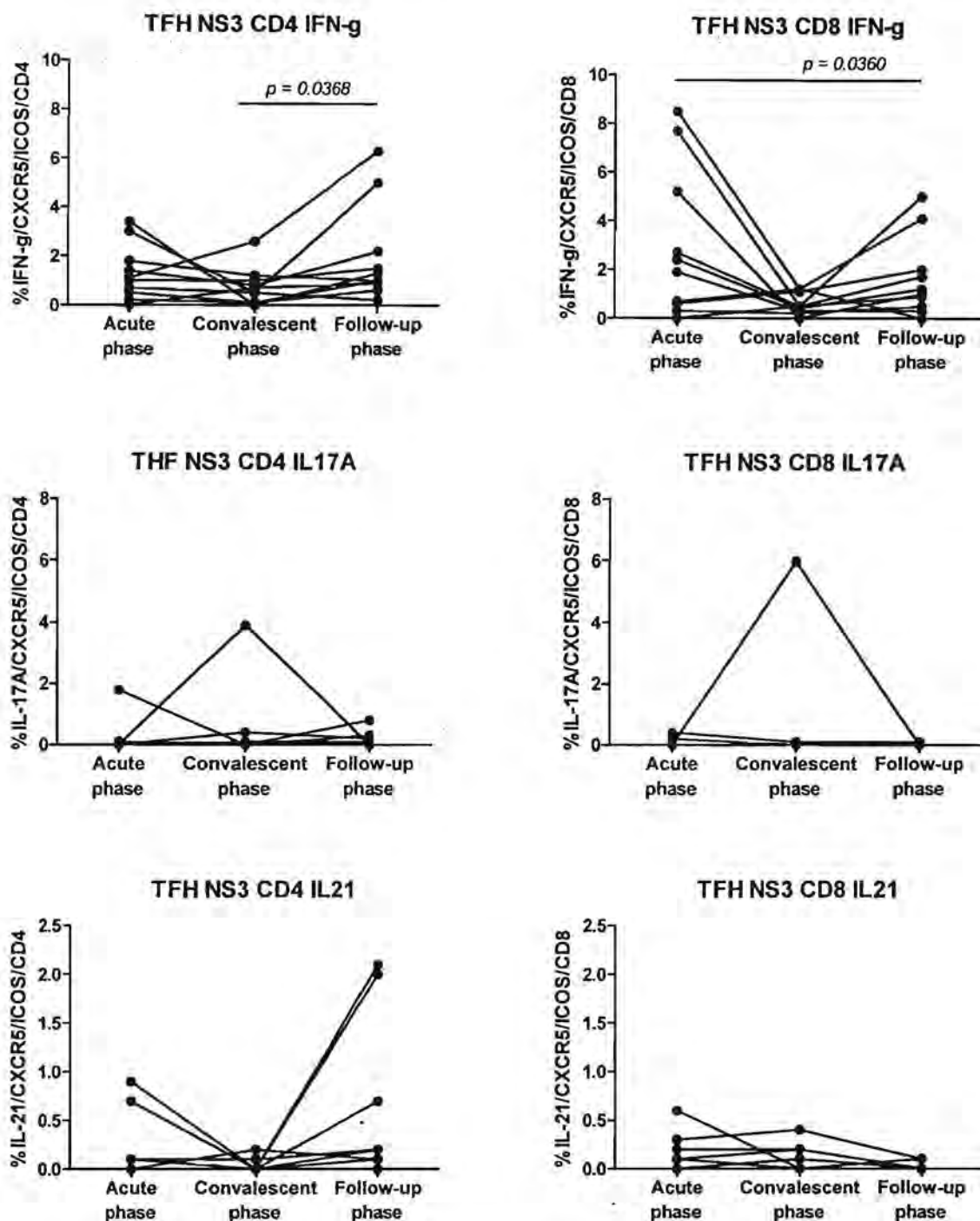
รูปที่ 8: ปริมาณของ subset T cells ชนิด CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides ของ serotype 2



ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก TFH cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides และ Env peptides ของ serotype 2 ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย

ทำการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17A และ IL-21 ที่หลังจาก TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides จำนวน 61 เส้น พบว่า มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase ของกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD4+ T cell คือ 1.1%, 0.6% และ 1.2% ตามลำดับ และกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD8+ T cell คือ 2.2%, 0.5% และ 1.1% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IL-17A ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase ของกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD4+ T cell คือ 0%, 0% และ 0.1% ตามลำดับ และกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD8+ T cell คือ 0% ทั้ง 3 ระยะ และค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IL-21 ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase ของกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD4+ T cell คือ 0.1%, 0% และ 0.2% ตามลำดับ และกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD8+ T cell คือ 0.1%, 0% และ 0% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase ของกลุ่ม TFH ชนิด CD4+ T cells พบว่าปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ convalescent phase มีปริมาณน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0368$ ) ส่วนปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A และ IL-21 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 9) ในกลุ่ม TFH ชนิด CD8+ T cells พบว่าปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0360$ ) ส่วนปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A และ IL-21 มีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 9)

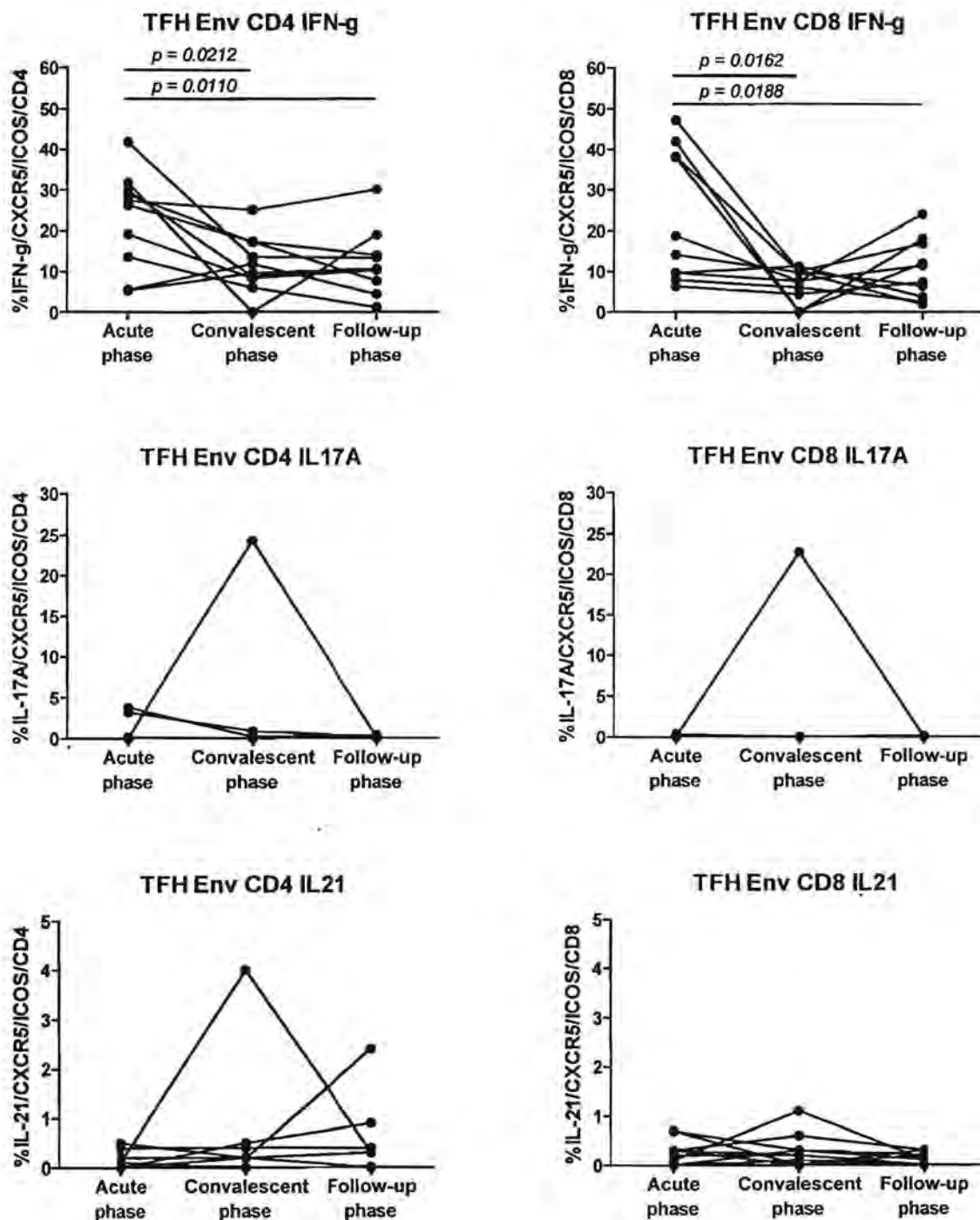
รูปที่ 9: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides ของ serotype 2



เมื่อกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด Env peptides จำนวน 49 เส้น พบว่า มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase ของกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD4+ T cell คือ 26.8%, 10.7% และ 10.6% ตามลำดับ และกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD8+ T cell คือ 16.5%, 7.7% และ 9.4% ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IL-17A ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase ของกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD4+ T cell คือ 0.1%, 0% และ 0% ตามลำดับ และกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD8+ T cell คือ 0% ทั้ง 3 ระยะ และค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IL-21 ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase ของกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD4+ T cell คือ 0.1%, 0.2% และ 0.2% ตามลำดับ และกลุ่มเซลล์ TFH ชนิด CD8+ T cell คือ 0.3%, 0.2% และ 0.1%

ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase ของกลุ่ม TFH ชนิด CD4+ T cells พบว่าปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0212$  และ  $p = 0.0110$  ตามลำดับ) ส่วนปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A มีแนวโน้มลดลง และ IL-21 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 10) ในกลุ่ม TFH ชนิด CD8+ T cells พบปริมาณค่าไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0162$  และ  $p = 0.0188$  ตามลำดับ) ส่วนปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A และ IL-21 มีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 10)

**รูปที่ 10:** ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วย แอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides ของ serotype 2



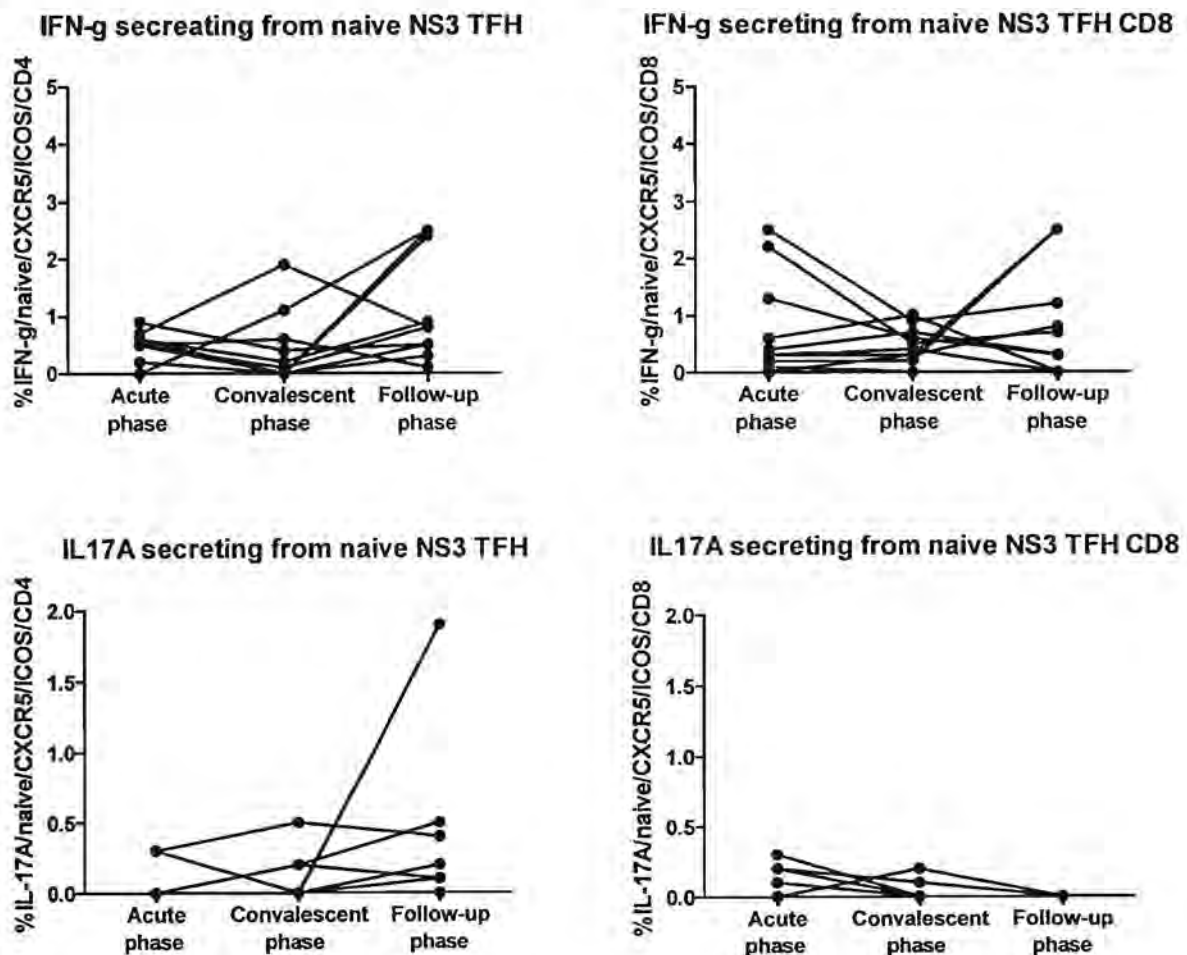
ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก subset T cells ของ TFH หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides และ Env peptides ของ serotype 2 ในระยะต่างๆของโรคไข้เลือดออก ในผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนไทย

ทำการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17A และ IL-21 ที่หลังจาก subset T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี serotype 2 ชนิด NS3 peptides จำนวน 61 เส้น และ Env peptides จำนวน 49 เส้น

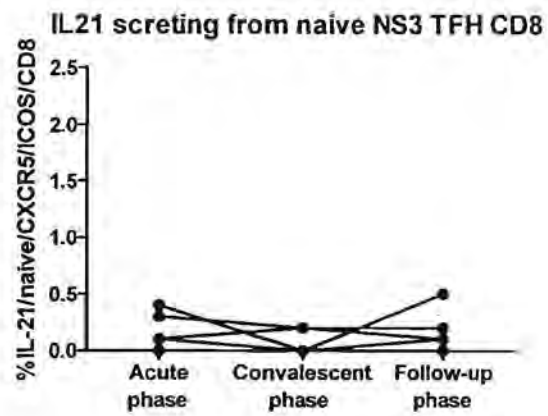
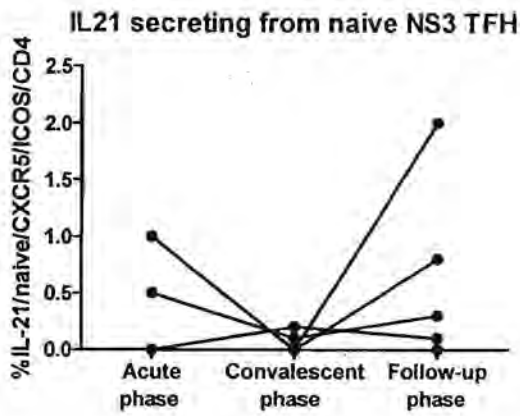
Naïve T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 peptides

Naïve T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0.5%, 0.2% และ 0.8% ตามลำดับ และ Naïve T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0.4%, 0.5% และ 0.5% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17A และ IL-21 ในแต่ละ phase มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 11)

รูปที่ 11: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก naïve T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides



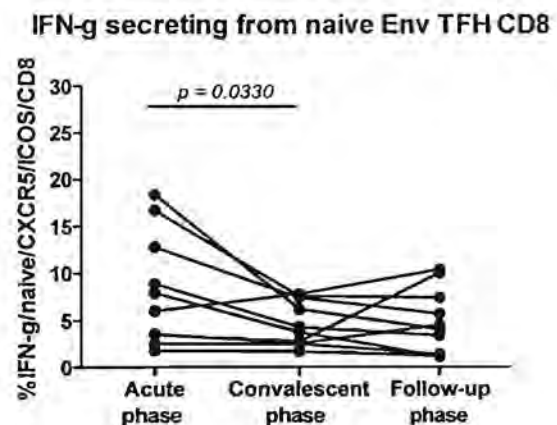
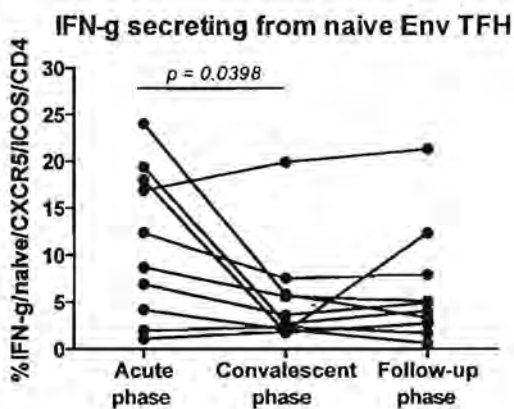


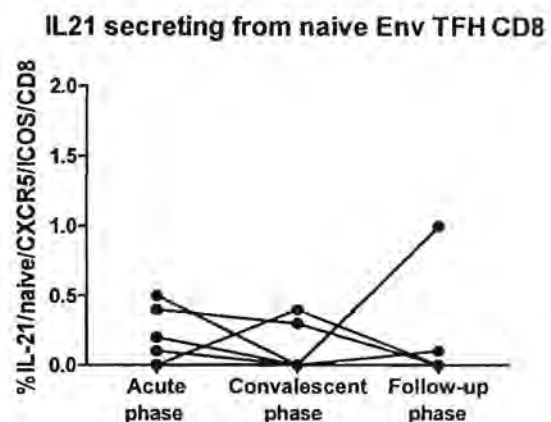
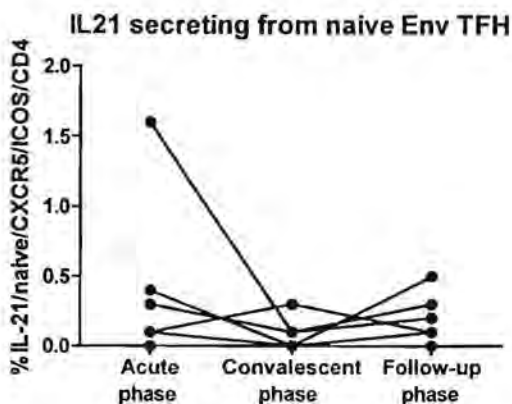
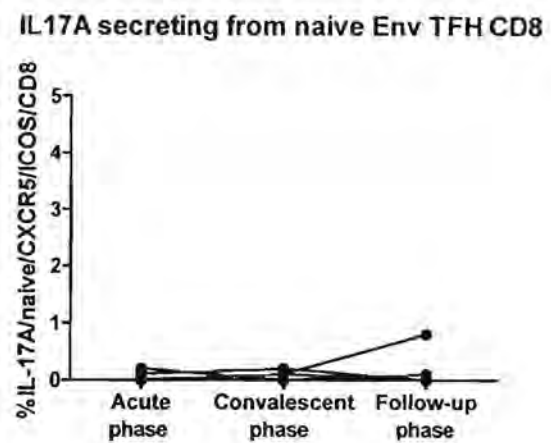
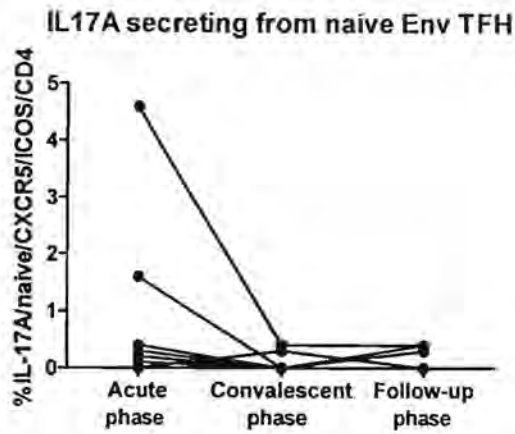


Naïve T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env peptides

Naïve T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 10.6%, 3.2% และ 4.5% ตามลำดับ และ Naïve T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 7.0%, 4.1% และ 4.3% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่า naïve T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มากกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0398$  และ  $p = 0.0330$  ตามลำดับ) ไซโตไคน์ชนิด IL-17A และ IL-21 ในแต่ละ phase มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 12)

รูปที่ 12: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก naïve T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides

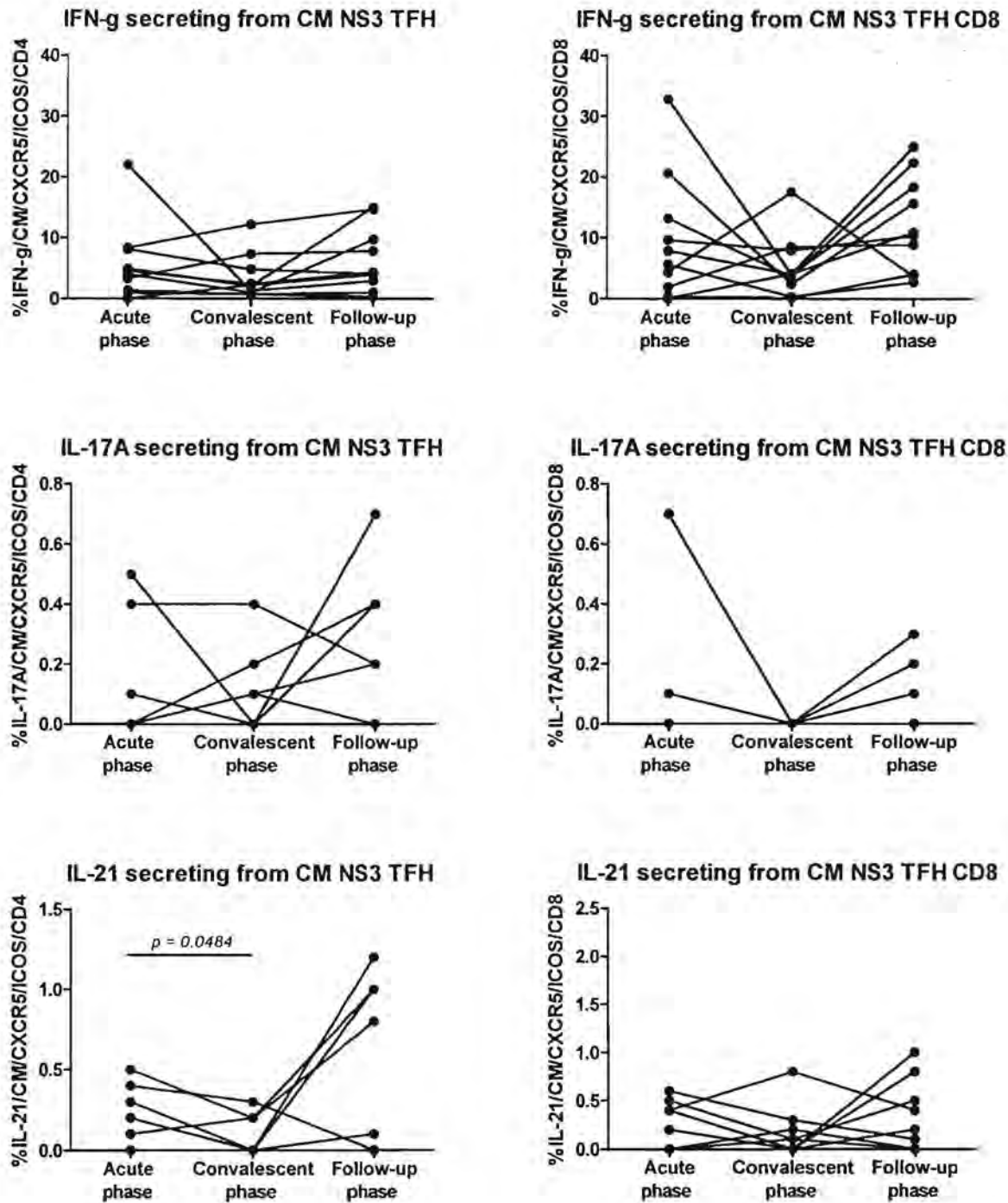




Central memory (CM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 peptides

Central memory (CM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 4.3%, 2.2% และ 4.2% ตามลำดับ และ CM T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 6.7%, 4.0% และ 10.6% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  และ IL-17A ในแต่ละ phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม พบว่า CM T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-21 ของ acute phase มากกว่า convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0484$ ) แม้ว่า CM T cells ของ TFH cells ชนิด CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-21 ในแต่ละ phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 13)

รูปที่ 13: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก central memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides

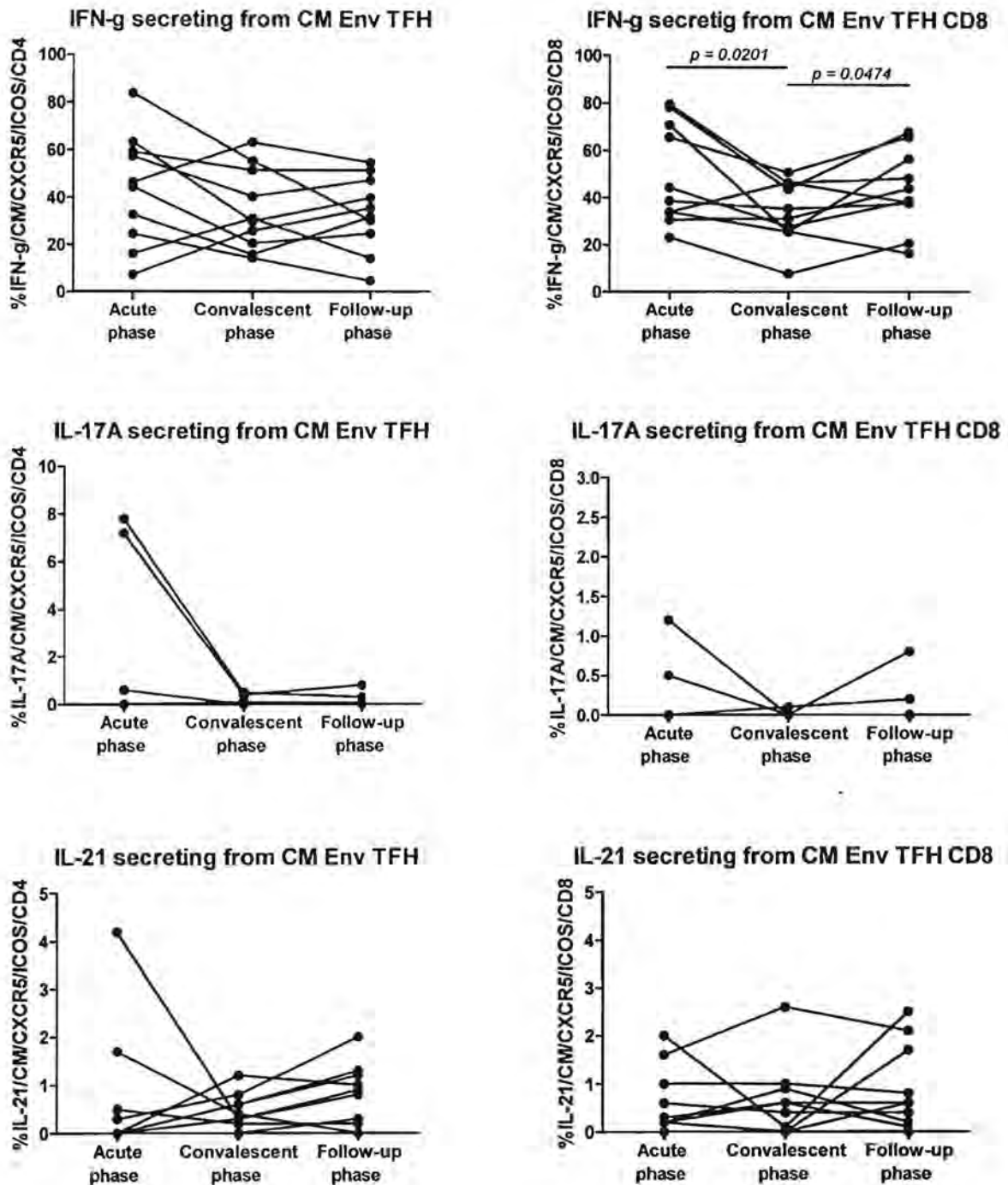


Central memory (CM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env peptides

Central memory (CM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 45.4%, 30.5% และ 33.6% ตามลำดับ และ CM T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 41.4%, 33.3% และ 41.4% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่า CM T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T

cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17A และ IL-21 ในแต่ละ phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ CM T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env พบว่า มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มากกว่า convalescent phase และ convalescent phase มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  น้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0201$  และ  $p = 0.0474$  ตามลำดับ) และปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A และ IL-21 ของแต่ละ phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 14)

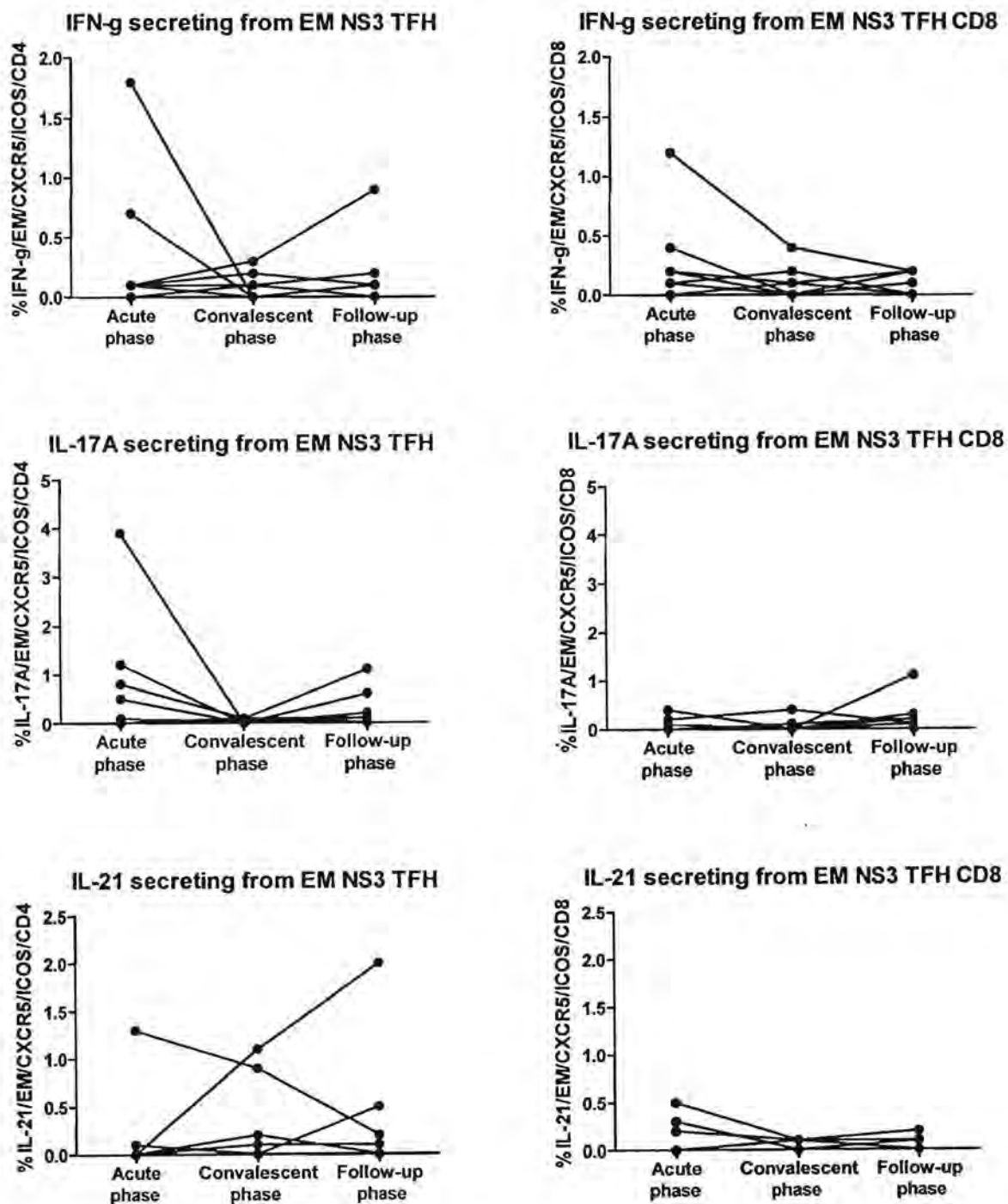
**รูปที่ 14:** ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก central memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides



Effector memory (EM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 peptides

Effector memory (EM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0.1%, 0% และ 0.1% ตามลำดับ และ EM T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0.2%, 0.1% และ 0.1% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่าปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$ , IL-17A และ IL-21 ในแต่ละ phase มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 15)

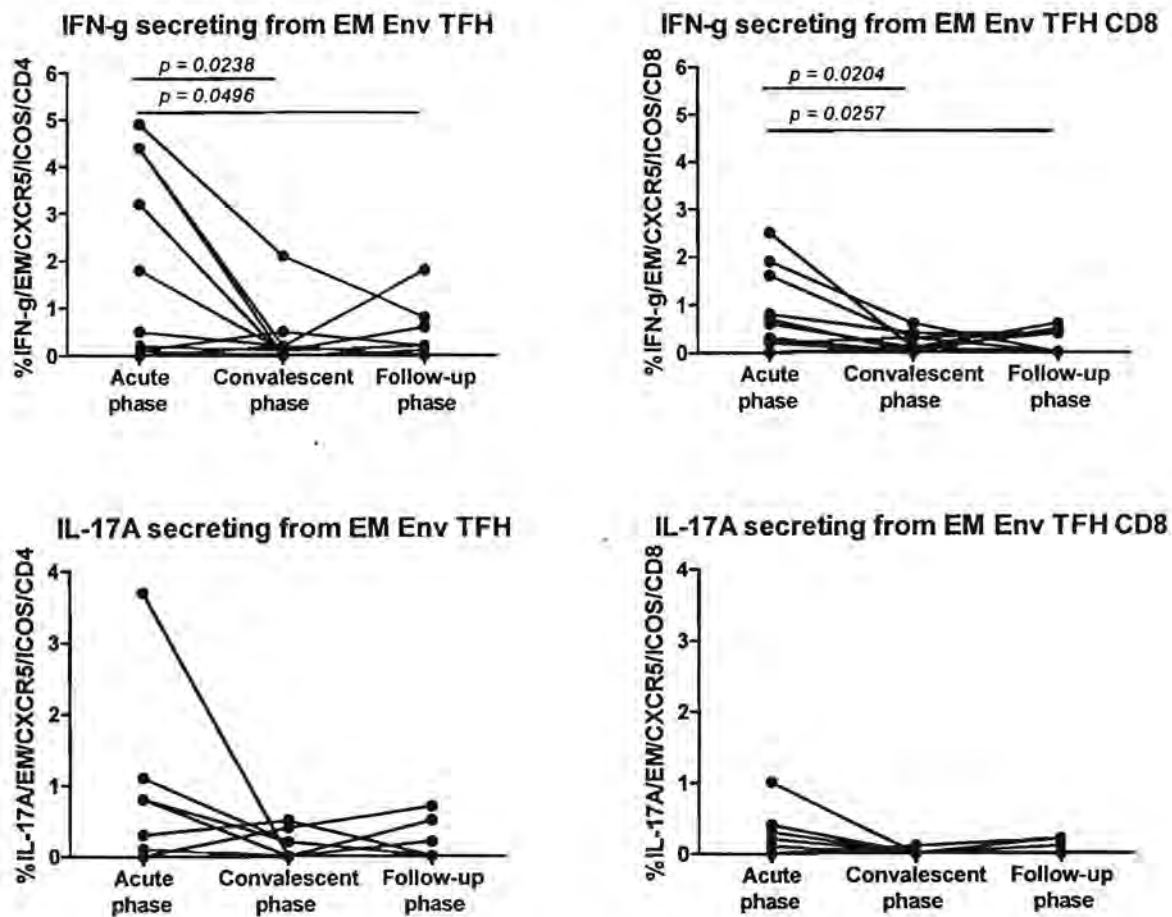
รูปที่ 15: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก effector memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides

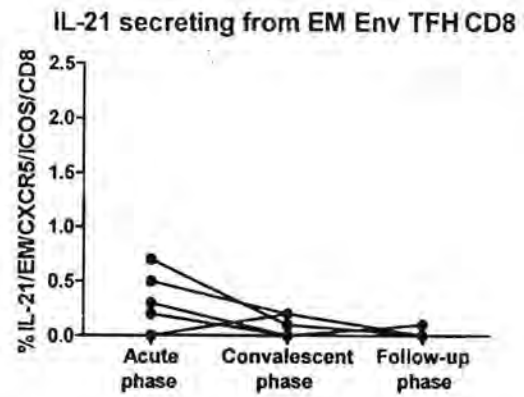
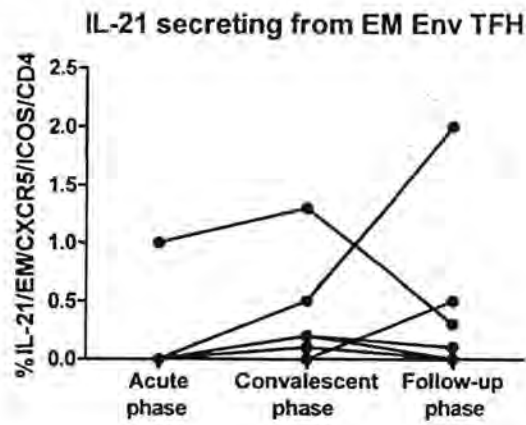


Effector memory (EM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env peptides

Effector memory (EM) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 1.2%, 0.2% และ 0.2% ตามลำดับ และ EM T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0.7%, 0.1% และ 0.2% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่า EM T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0238$  และ  $p = 0.0496$  ตามลำดับ) ปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A ของ acute phase มีแนวโน้มมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase และ ปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-21 ของ acute phase มีแนวโน้มน้อยกว่า convalescent phase และ follow-up phase นอกจากนี้ เมื่อกระตุ้น EM T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env พบว่า มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ของ acute phase มากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0204$  และ  $p = 0.0257$  ตามลำดับ) และปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-17A และ IL-21 ของ acute phase มีแนวโน้มมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase (รูปที่ 16)

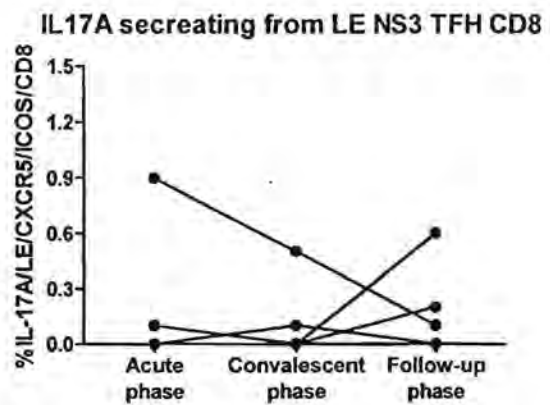
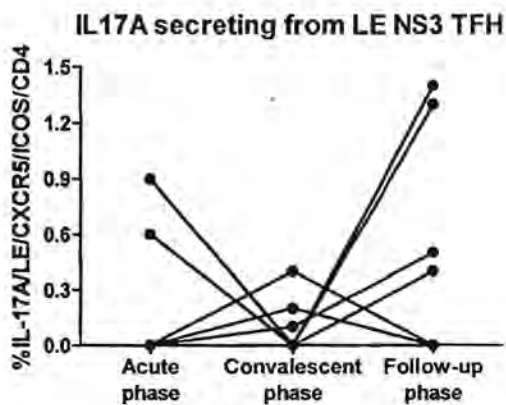
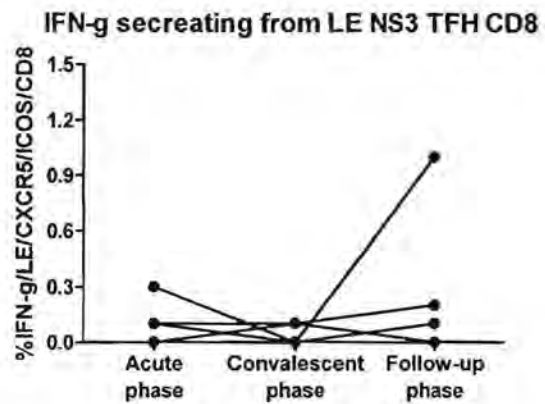
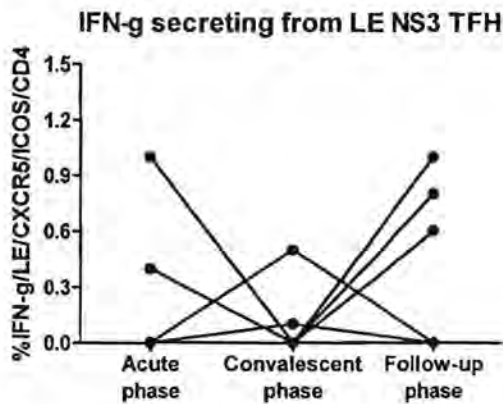
รูปที่ 16: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก effector memory T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides

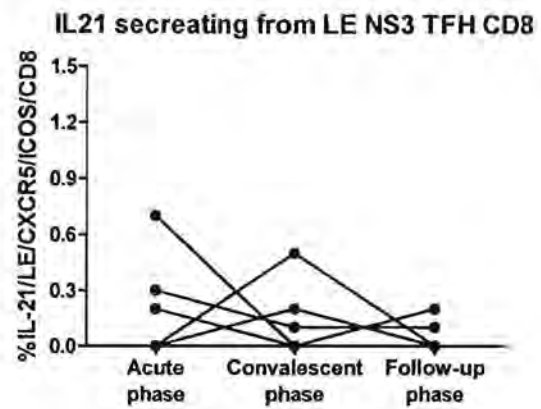
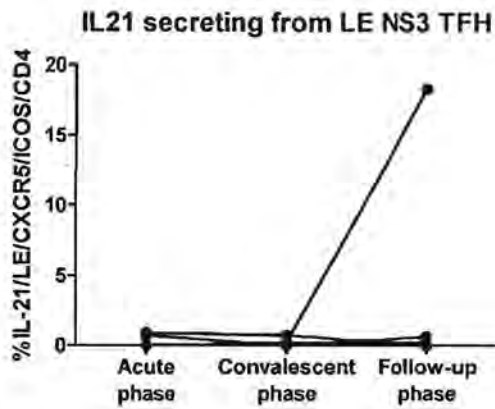




Late effector (LE) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 peptides  
 Late effector (LE) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย NS3 พบว่ามีปริมาณ  
 ไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  และ IL-17A ในแต่ละ phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 17)

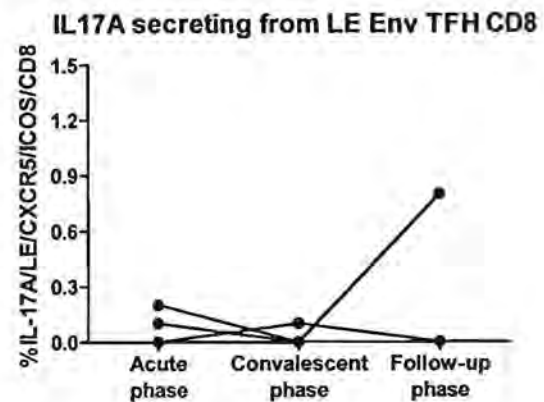
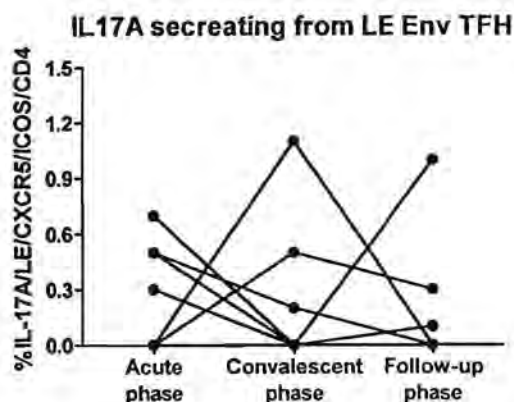
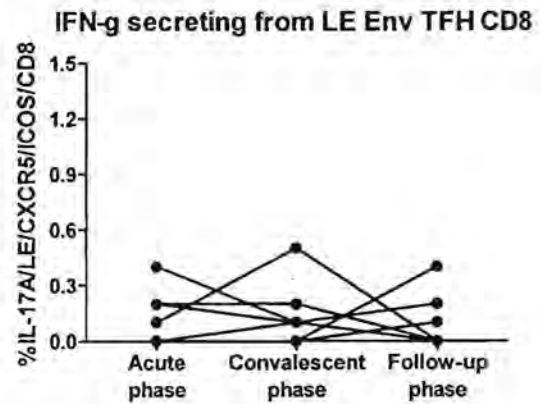
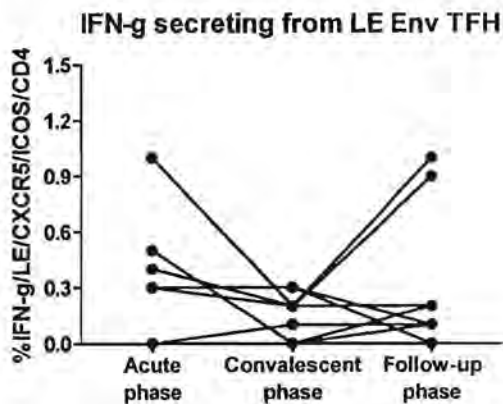
รูปที่ 17: ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก late effector T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells  
 หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด NS3 peptides



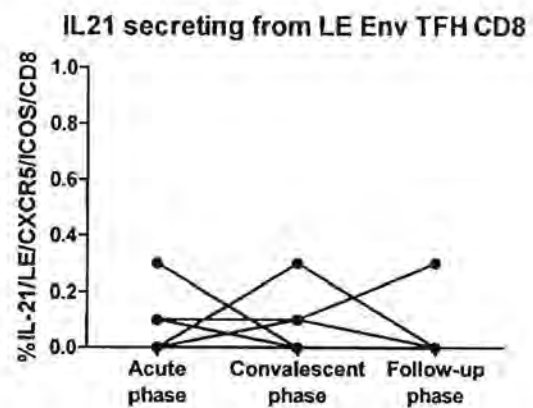
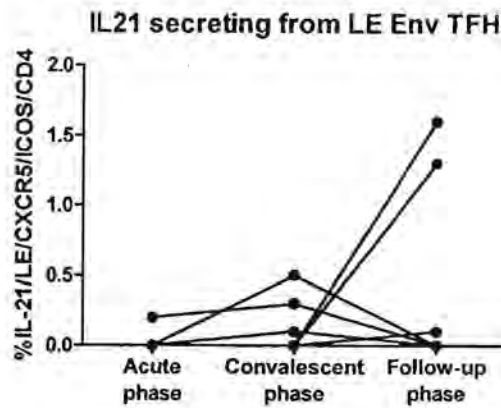


Late effector (LE) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Env peptides  
 Late effector (LE) T cells ของ TFH ชนิด CD4+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0.3%, 0.2% และ 0.1% ตามลำดับ และ LE T cells ของ TFH ชนิด CD8+ T cells มีค่ามัธยฐานของไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ระยะ acute phase, convalescent phase และ follow-up phase คือ 0%, 0.1% และ 0.1% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละ phase พบว่า มีปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  และ IL-17A ในแต่ละ phase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 18)

**รูปที่ 18:** ปริมาณไซโตไคน์ที่หลังจาก late effector T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของไวรัสเดงกี ชนิด Env peptides







### สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีจำนวน 48 ราย พบว่ามีการติดเชื้อ serotype 2 (DENV2) มากที่สุดคือ ร้อยละ 38 (18/48) รองลงมาคือ serotype 1 (DENV1) ร้อยละ 35 (17/48) ซึ่ง serotype 2 เป็น serotype ที่การระบาดมากที่สุดในคนไทย ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของเซลล์ TFH ในเลือดผู้ป่วย โดยทั่วไปการตรวจหา TFH มักทำการศึกษาใน lymph node และ tonsil แต่จากการทดสอบครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในเลือด ซึ่งมีนักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการศึกษาและสามารถตรวจพบ TFH ได้ในเลือด<sup>(6,23)</sup> จากการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ในกลุ่มคนไข้ที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกีในระยะต่างๆกันของโรคไข้เลือดออก (Acute phase, Convalescent phase และ Follow-up phase) จำนวน 10 ราย ได้นำมาทำการศึกษาก่อนปริมาณของเซลล์ CD4+ T cells, CD8+ T cells, TFH cells และ subset T cells ชนิด naive cells, central memory (CM) cells, effector memory (EM) cells และ late effector (LE) cells (ตารางที่ 6) พบว่า ปริมาณ CD4+ T cells ใน acute phase น้อยกว่า convalescent phase ( $p = 0.0116$ ) และ follow-up phase ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่ CD8+ T cells ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละ phase ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาในกลุ่มของ Azeredo EL, et al. 2006 ที่พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณ CD4 ลดลงในช่วง acute infection และมีค่าเพิ่มขึ้นในระยะ convalescent phase แต่ไม่เท่ากับตอนเริ่มต้นเมื่อเทียบกับคนปกติ นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยของปริมาณ CD8 ไม่แตกต่างกันในคนไข้ระยะ acute infection, convalescent และคนปกติ<sup>(24)</sup> และยังเป็นที่น่าสนใจงานวิจัยในกลุ่มของ Green et al. 1999a, Liu et al. 2002<sup>(25-26)</sup> ที่ทำการศึกษาในผู้ติดเชื้อไข้เลือดออก (dengue fever) และพบว่ามีปริมาณ CD4 ลดลง เช่นเดียวกัน ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้นำ PBMC ของผู้ติดเชื้อมาทำการกระตุ้นด้วย dengue antigen ชนิด NS3 และ Env peptides ของเชื้อไวรัสเดงกี serotype 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการตอบสนองมากที่สุด<sup>(27-29)</sup> แม้ว่าผู้ติดเชื้อที่นำมาทดสอบจะมีหลาย serotype ก็ตามแต่จากการทดสอบพบว่า ผู้ติดเชื้อที่มี serotype 1 และ serotype 3 เกิด cross reactive T cell response กับ serotype 2 ได้ จากการตรวจหาปริมาณ TFH ทั้งในส่วนของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells โดยทำการตรวจหาปริมาณ CXCR5+/ICOS+/CD4+ หรือ CD8+ ที่ถูกกระตุ้นด้วย dengue antigen ชนิด NS3 และ Env peptides ของเชื้อไวรัสเดงกี serotype 2 พบว่าค่า CXCR5+ จะเพิ่มขึ้นเมื่อ T cells ถูกกระตุ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณ TFH CD4+ T cells เมื่อถูกกระตุ้นด้วย NS3 pool peptide ใน acute phase (30.8%) จะมีปริมาณมากกว่า convalescent phase (11.9%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0214$ ) และ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Env pool peptide ใน acute phase (44.6%) จะมีปริมาณมากกว่า convalescent phase (14.4%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0061$ ) และ follow-up phase (24.2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.0190$ ) ในขณะที่ TFH CD8+ T cells เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Env pool peptide ใน acute

phase (36.1%) จะมีปริมาณมากกว่า convalescent phase (24.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0392$ ) ส่วนการกระตุ้นด้วย NS3 ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ phase แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อที่มีมากในระยะ acute infection จะมีการกระตุ้น T cells ทำให้สามารถตรวจพบปริมาณ TFH CD4+ T cells (CXCR5+/ICOS+/CD4+) มากกว่าในระยะ convalescent infection นอกจากนี้ในกลุ่มของ Rasheed AU, et al. 2006 ได้ทำการศึกษาใน tonsil ซึ่งเป็น secondary lymphoid organ พบว่ามีการแสดงออกของ CXCR5<sup>hi</sup>/ICOS<sup>hi</sup>/CD4 เช่นกัน <sup>(30)</sup> ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจหาค่า TFH CD8+ T cells (CXCR5+/ICOS+/CD8+) ซึ่งพบว่ายังมีข้อมูลมาสนับสนุนผลที่ได้ อย่างไรก็ตามในกลุ่มของ Quigley MF, et al. 2007 ได้ทำการศึกษา TFH ชนิด CD8+ T cell ใน tonsil โดยดูการแสดงออกของ CXCR5 เพียงโมเลกุลเดียว พบว่า CXCR5+ CD8+ T cells ไม่มีการแสดงออกของโมเลกุล cytolytic effector ได้แก่ perforin <sup>(31)</sup> และในกลุ่มของ Forster R, et al. 1994 ได้ทำการตรวจหา CXCR5+ CD8+ T cells ในเลือดคนปกติจำนวน 12 ราย พบว่ามีปริมาณ CXCR5+ CD8+ T cells เพียง  $1.9 \pm 0.8\%$  <sup>(32)</sup> ซึ่งในกลุ่มของ Quigley MF, et al. 2007 ทำการตรวจหา CXCR5+ CD8+ T cells ใน tonsil คนปกติจำนวน 12 ราย พบว่ามีปริมาณ  $26.9 \pm 7.9\%$  ซึ่งมากกว่าในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.0001$ ) <sup>(31)</sup> นอกจากนี้ได้ทำการตรวจหาปริมาณ subset T cells ชนิด CD4+ T cells โดยดูการแสดงออกของ CD45RA ซึ่งเป็น transmembrane tyrosine phosphatase ซึ่งบ่งบอกถึงความเป็น naïve cell และ CCR7 ซึ่งเป็น homing marker พบว่า Naïve T cells (CD45RA+CCR7+) ในระยะ acute, convalescent และ follow-up phase ไม่มีความแตกต่างกัน Effector memory (EM) T cells ในระยะ acute phase และ convalescent phase มีค่าน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0367$  และ  $p = 0.0159$  ตามลำดับ) เนื่องจากในระยะ acute phase จะมีเชื้อ Dengue antigen จำนวนมาก ทำให้มีการติดเชื้อและทำลาย naïve CD4+ T cell จำนวนมาก จึงทำให้เกิดการอักเสบและติดเชื้อมาก ส่งผลให้ EM CD4+ T cells ถูกทำลายมาก ส่วน subset T cells ชนิด Central memory (CM) T cells ในระยะ acute phase มีค่ามากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0143$  และ  $p = 0.0020$  ตามลำดับ) เนื่องจากเมื่อมีการติดเชื้อ Dengue antigen ในระยะ acute phase ทำให้ไปกระตุ้น CM CD4+ T cells ซึ่งมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ ทำให้สามารถตรวจพบปริมาณของ CM CD4+ T cells ได้มากกว่าในระยะ convalescent phase และ follow-up phase ซึ่งจะพบ Dengue antigen ได้น้อยกว่า จึงพบปริมาณ CM CD4+ T cells ได้น้อยกว่า ส่วน subset T cells ชนิด Late effector (LE) T cells ในระยะ acute phase มีค่าน้อยกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0350$  และ  $p = 0.0296$  ตามลำดับ) ในส่วนของการตรวจหาปริมาณ subset T cells ชนิด CD8+ T cells พบว่า naïve T cells ในระยะ acute phase มีค่ามากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0146$ ) เนื่องจาก Dengue antigen จะกระตุ้น naïve CD8+ T cells ให้เป็น CTL เพื่อช่วยในการฆ่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเดงกี จึงทำให้ตรวจพบปริมาณ naïve CD8+ T cells จำนวนมากในระยะ acute phase ซึ่งผลที่ได้ตรงกันข้ามกับกลุ่มของ Akondy RS, et al. 2009 <sup>(33)</sup> ที่ได้ทำการทดลองพบว่า YF-17D specific CD8+ T cells จะมีการแสดงออกของโมเลกุล naïve cells ลดลงเมื่ออยู่ระหว่างการเปลี่ยนไปเป็น effector cells ส่วน EM T cells ในระยะ acute phase มีค่าน้อยกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0422$  และ  $p = 0.0021$  ตามลำดับ) CM T cells ในระยะ acute phase และ convalescent phase มีค่ามากกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0064$  และ  $p = 0.0367$  ตามลำดับ) ซึ่งในกลุ่มของ Akondy RS, et al. 2009 <sup>(20)</sup> พบว่า late effector memory CD8+ T cells ที่มีการแสดงออกของ CD45RA+ อย่างเดียว พบปริมาณมากในระยะ acute infection ของ yellow fever virus ซึ่งให้ผลเหมือนกันกับกลุ่ม Precopio ML, et al 2007 และ Miller JD, et al. 2008 ซึ่งพบ CD45RA+ ในระยะ acute infection ของ vaccinia virus <sup>(34)</sup> yellow fever virus และ

smallpox virus<sup>(35)</sup> และ B19 virus<sup>(36)</sup> LE T cells ในระยะ convalescent phase มีค่าน้อยกว่า follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0147$ )

เมื่อทำการกระตุ้น PBMCs ด้วย Dengue antigens ชนิด NS3 และ Env peptides พบว่า TFH ที่มีการแสดงออกของ CXCR5+ และ ICOS+ ทั้ง CD4+ T cells และ CD8+ T cells ในระยะ acute phase มีปริมาณมากกว่า convalescent phase และ follow-up phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อาจกล่าวได้ว่า ในระยะ acute phase เซลล์ TFH ถูกกระตุ้นด้วย Dengue antigens ซึ่งมีปริมาณมาก ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น และยังมีการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  เพิ่มขึ้นด้วย และเมื่ออยู่ในระยะ convalescent phase ร่างกายเริ่มมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ทำให้มีปริมาณ Dengue antigen ลดลง และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง นอกจากนี้ TFH CD4+ T cells จะมีแนวโน้มในการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-17 และ IL-21 เพิ่มขึ้นในระยะ acute, convalescent และ follow-up phase ตามลำดับ ในขณะที่ TFH CD8+ T cells จะมีแนวโน้มในการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  เพิ่มขึ้นในระยะ acute, convalescent และ follow-up phase ตามลำดับ ที่น่าสนใจคือ central memory (CM) T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่กระตุ้นด้วย Dengue antigens ชนิด NS3 peptides สามารถตรวจพบปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-21 ในระยะ acute phase ได้มากกว่าในระยะ convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0484$ ) ซึ่งในกลุ่มของ Nurieva R.I., et al. (2008) พบว่า naive T cells ที่ถูกกระตุ้นโดยมี IL-21 จะเปลี่ยนไปเป็น TFH และจะเข้าสู่ germinal center ต่อไป<sup>(37)</sup> และในกลุ่มของ Streeck H., et al. (2013) ได้กล่าวว่า นักวิจัยบางท่านใช้การแสดงออกของ CXCR5 หรือการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด IL-21 ตัวใดตัวหนึ่งในการบ่งบอกคุณสมบัติของ TFH หรือ TFH-like แต่อย่างไรก็ตาม IL-21 ยังมีการแสดงออกไม่มากพอที่จะใช้ในการ identify เซลล์ TFH<sup>(38)</sup> นอกจากนี้ กลุ่มของ Pallikkuth S., et al. (2012) ได้ทำการศึกษา peripheral TFH ในผู้ติดเชื้อ HIV ที่ฉีด H1N1 influenza vaccine โดยนำเซลล์ของผู้ติดเชื้อที่มีการตอบสนองต่อวัคซีนมากระตุ้นซ้ำ และเก็บ supernatant มาทำการทดสอบ พบว่า pTFH มีการหลั่งสารไซโตไคน์ชนิด IL-21 และมีการแสดงออกของ CXCL13 เพิ่มขึ้น<sup>(39)</sup> และ naive T cells, effector memory (EM) T cell และ central memory (CM) T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่กระตุ้นด้วย Dengue antigens ชนิด Env peptides สามารถตรวจพบปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- $\gamma$  ในระยะ acute phase ได้มากกว่าในระยะ convalescent phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

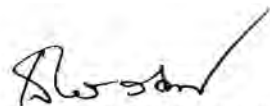
โดยสรุป ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี serotype 2 (DENV2) เป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดมากที่สุดในคนไทย จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย Dengue antigen พบว่าปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ในระยะ acute phase มีปริมาณมากกว่าในระยะอื่นๆ ที่น่าสนใจคือ สามารถตรวจพบปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-21 ในระยะ acute phase ได้มากกว่าในระยะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ใน CM T cells ของ TFH cells ชนิด CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่กระตุ้นด้วย Dengue antigens ชนิด NS3 peptides ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ TFH CD4+ T cells และ TFH CD8+ T cells ที่ตรวจพบได้ในปริมาณมากในระยะ acute phase นอกจากนี้ ในส่วนของ TFH CD8+ T cells พบว่ายังไม่มีความสัมพันธ์ผลที่ได้ จึงน่าสนใจจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

## บรรณานุกรม

- (1) World Health Organization (WHO). Dengue and severe dengue. [Online]. 2013. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> [2013, Sep 23].
- (2) Gubler D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in 21<sup>st</sup> century. *Trends Microbiol* 10 (2002): 100-103.
- (3) Michael B. Epidemiology, burden of disease and transmission. *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. France: WHO; 2009. P. 3-21.
- (4) World Health Organization. *Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, 2<sup>nd</sup> edition. Geneva: World Health Organization, 1997.
- (5) Hottz E, Tolley N.D., Zimmerman G.A., et al. Platelets in dengue infection. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Haematology* 8 (2011): e33-e38.
- (6) Crill W.D. and Roehrig J.T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75 (2001): 7769-7773.
- (7) Matusan A.E., Pryor M.J., Davidson A.D., et al. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *J Virol* 75 (2001): 9633-9643.
- (8) Duangchinda T., Dejnirattisai W., Vasanawathana S., et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *PNAS* 107 (2010): 16922-16927.
- (9) Dengue virus net. Dengue symptoms. [Online]. 2013. Available from: <http://www.denguevirusnet.com> [2013, Sep 23].
- (10) The Retroscope. Dengue virus. [Online]. 2013. Available from: <http://www.retroscope.eu/wordpress/dengue-virus/> [2013, Sep 23]
- (11) O'Shea J.J. and Paul W.E. Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science* 327 (2010): 1098-1102.
- (12) Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity; implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol* 131 (2013):1276-1287.
- (13) Mathew A. and Rothman A.L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev* 225 (2008): 300-313.
- (14) Crotty S. Follicular Helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29 (2011): 621-663.
- (15) Perreau M., Savoye A.L., Crignis E.D., et al. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210 (2013):143-156.
- (16) Yue F.Y., Lo C., Sakhdari A., Lee E.Y., et al. HIV-specific IL-21 producing CD4+ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J Immunol* 185 (2010): 498-506.
- (17) Charles R. Mackay C.R. Dual personality of memory T cells. *Nature* 401 (1999): 659-660.
- (18) Mullen K.M., Gocke A.R., Allie R., et al. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *J Neuroimmunol* 249 (2012):86-92.

- (19) Martinez G.J., Nurieva R.I., Yang X.O., et al. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1143 (2008):188-211.
- (20) Broere F., Apasov S.G., Sitkovsky M.V., et al. T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principle of Immunopharmacology: 3<sup>rd</sup> revised and extended edition*. Springer Basel AG 2011: 15-27.
- (21) Harari A., Vallelian F., and Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol* 34 (2004):3525-3533.
- (22) Sallusto F., Lenig D., Förster R., et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401 (1999): 708–712.
- (23) Morita R., Schmitt N., Bentebibel S.E., et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34 (2011):108-121.
- (24) Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, et al. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (2006):437-449.
- (25) Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 180 (1999): 1429-1435.
- (26) Liu CC, Huang KJ, Lin YS, et al. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol* 68 (2002): 241-252.
- (27) Duangchinda T., Dejnirattisai W., Vasanawathana S., et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci USA* 28 (2010): 16922–16927.
- (28) Rivino L., Kumaran E.A., Jovanovic V., et al. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. *J Virol* 87 (2013):2693-2706.
- (29) Appanna R., Huat T.L., Chai See L.L., et al. Cross-Reactive T-Cell Responses to the Nonstructural Regions of Dengue Viruses among Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients in Malaysia. *Clin Vaccine Immunol* 14 (2007): 969–977.
- (30) Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, et al. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* 36 (2006):1892-1903.
- (31) Quigley MF, Gonzalez VD, Granath A, et al. CXCR5+ CCR7- CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. *Eur J Immunol* 37(2007):3352-3362.
- (32) Förster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 84 (1994):830-840.
- (33) Akondy RS, Monson ND, Miller JD, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 183 (2009):7919-7930.
- (34) Precopio ML, MR. Betts, J. Parrino, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 204 (2007): 1405-1416.
- (35) Miller J.D., Van der Most R.G., Akondy R.S., et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 28 (2008): 710-722.
- (36) Isa A., Kasprowicz V., Norbeck O., et al. Prolonged activation of virus-specific CD8+ T cells after acute B19 infection. *PLoS Med* 2 (2005): e343.

- (37) Nurieva R.I., Chung Y., Hwang D., et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 18 (2008):138-149.
- (38) Streeck H., D'Souza M.P., Littman D.R., and Crotty S. Harnessing CD4<sup>+</sup> T cell responses in HIV vaccine development. *Nat Med* 19 (2013):143-149.
- (39) Pallikkuth S., Parmigiani A., Silva S.Y., et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120 (2012): 985-993.



.....  
ศ.นพ.เกียรติ รัชชงธรรม

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

.....27...../.....ธันวาคม...../.....2556.....

**ประวัตินักวิจัยและคณะ**

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์เกียรติ รักรุ่งธรรม  
 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Kiat Ruxrungtham, M.D.  
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-5099-01159-31-8  
 ตำแหน่งปัจจุบัน: ศาสตราจารย์  
 หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์  
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
 โทร. 0-2256-4152 โทรสาร. 0-2254-2323  
 E-mail : rkiat@chula.ac.th

**ประวัติการศึกษา**

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	พ.บ.	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1)	2522
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	วุฒิบัตรแสดงความรู้ความ ชำนาญในการประกอบ วิชาชีพเวชกรรม	อายุรศาสตร์	2526
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	สหสาขาจุลชีววิทยา ทางการแพทย์	2531-2532
Laboratory of Immunoregulation (LIR) National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) National Institutes of Health (NIH)	Visiting Researcher	HIV Immunology	2534-2536

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: HIV Molecular and Immunology, Allergy

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ  
 โครงการวิจัยอื่นๆที่กำลังดำเนินการ 4โครงการ

ลำดับที่	ผู้วิจัยหลัก	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้
1	ศ.นพ.เกียรติ รักรุ่งธรรม	ทุนวิจัยและพัฒนา Dengue DNA tetraivalent vaccine	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	2551
2	ศ.นพ.เกียรติ รักรุ่งธรรม	โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีน และภูมิคุ้มกันบำบัดต้านโรคเอดส์และ โรคภูมิแพ้	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	2548-2552
3	ศ.นพ.เกียรติ รักรุ่งธรรม	การตอบสนองของ dengue specific T cells ในอาสาสมัครที่เคย ติดเชื้อไวรัสเด็งกี	ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553	2553
4	ศ.นพ.เกียรติ รักรุ่งธรรม	ความสำคัญและความชุกของเชื้อ เอชไอวีที่เป็นประชากรส่วนน้อยที่ ติดต่อทางด้านไวรัสเอชไอวี	สำนักงานคณะกรรมการการ อุดมศึกษา	2553

**ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)**

- Ruxrungtham K, Brown T, Phanuphak P. HIV/AIDS in Asia. *Lancet*. 2004; 364:69-82. *Impact factor* =28.32
- Ruxrungtham K, Pedro RJ, Latiff GH, Conradie F, Domingo P, Lupo S, Pumpradit W, Vingerhoets JH, Peeters M, Peeters I, Kakuda TN, De Smedt G, Woodfall B; TMC125-C227 study group. Impact of reverse transcriptase resistance on the efficacy of TMC125 (etravirine) with two nucleoside reverse transcriptase

- inhibitors in protease inhibitor-naïve, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients: study TMC125-C227. *HIV Med.* 2008 Nov;9(10):883-96. *Impact factor* =3.34
3. Ruxrungtham K, Boyd M, Bellibas SE, Zhang X, Dorr A, Kolis S, Kinchelov T, Buss N, Patel IH. Lack of interaction between enfuvirtide and ritonavir or ritonavir-boosted saquinavir in HIV-1-infected patients. *J Clin Pharmacol.* 2004; 44:793-803. *Impact factor*=3.06
  4. Ruxrungtham K, Ubolyam S, Hassink EA, Ungsedhapand C, Kroon E, Duncombe C, Weverling GJ, Nookai S, Lange J, Cooper D, Phanuphak P. Significant differences between plasma HIV-1 RNA assays in HIV-1 subtype E infected patients treated with antiretroviral therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2002; 20:105-11. *Impact factor*=.455
  5. Ruxrungtham K, Kroon ED, Ungsedhapand C, Teeratakulpisarn S, Ubolyam S, Buranapraditkun S, van Leeuwen R, Weverling GJ, Kuananusont C, Lange JM, Cooper DA, Phanuphak P. A randomized, dose-finding study with didanosine plus stavudine versus didanosine alone in antiviral-naïve, HIV-infected Thai patients. *AIDS.* 2000;14:1375-82. *Impact factor* =5.63
  6. Ruxrungtham K, Suwanagool S, Tavel JA, Chuenyam M, Kroon E, Ubolyam S, Buranapraditkun S, Techasathit W, Li Y, Emery S, Davey RT, Fosdick L, Kuananusont C, Lane HC, Phanuphak P. A randomized, controlled 24-week study of intermittent subcutaneous interleukin-2 in HIV-1 infected patients in Thailand. *AIDS.* 2000; 14:2509-13. *Impact factor*=5.63
  7. Ruxrungtham K, Phanuphak P. Update on HIV/AIDS in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2001 Jun;84 Suppl 1:S1-17.
  8. Ruxrungtham K, Boone E, Ford H, Jr., Driscoll JS, Davey RT, Jr. and Lane HC. Potent activity of 2'-beta-fluoro-2',3'-dideoxyadenosine against human immunodeficiency virus type 1 infection in hu-PBL-SCID mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2369-74 *Impact factor* =4.03
  9. Ruxrungtham K, Muller O, Sirivichayakul S, et al. AIDS at a university hospital in Bangkok, Thailand. *AIDS* 1996;10:1047-9. *Impact factor* 5.84
  10. Siripassorn K, Manosuthi W, Chottanapund S, Pakdee A, Sabaitae S, Prasithsirikul W, Tunthanathip P, Ruxrungtham K. Effectiveness of Boosted Protease Inhibitor-Based Regimens in HIV Type 1-Infected Patients Who Experienced Virological Failure with NNRTI-Based Antiretroviral Therapy in a Resource-Limited Setting. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010; 26:139-48.
  11. Crane M, Sirivichayakul S, Chang JJ, Avihingsanon A, Ubolyam S, Buranapraditkun S, Thantiworasit P, Wightman F, Locarnini S, Matthews G, Dore GJ, Ruxrungtham K, Lewin SR. No Increase in Hepatitis B Virus (HBV)-Specific CD8+ T Cells in Patients with HIV-1-HBV Coinfections following HBV-Active Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2010 Mar;84(6):2657-65.
  12. Pumpradit W, Ananworanich J, Lolak S, Shikuma C, Paul R, Siangphoe U, Chaoniti N, Kaew-On P, Paris R, Ruxrungtham K, Valcour V. Neurocognitive impairment and psychiatric comorbidity in well-controlled human immunodeficiency virus-infected Thais from the 2NN Cohort Study. *J Neurovirol.* 2010 Jan 6.
  13. Gorowara M, Burger D, Hill A, Ruxrungtham K. Pharmacokinetics of low-dose protease inhibitors and efavirenz in low- and middle-income countries. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010 Jan;5(1):90-6.



14. Pozniak AL, Morales-Ramirez J, Katabira E, Steyn D, Lupo SH, Santoscoy M, Grinsztejn B, Ruxrungtham K, Rimsky LT, Vanveggel S, Boven K; TMC278-C204 Study Group. Efficacy and safety of TMC278 in antiretroviral-naive HIV-1 patients: week 96 results of a phase IIb randomized trial. *AIDS*. 2010 Jan 2;24(1):55-65.
15. Puthanakit T, Chokeyhaibulkit K, Suntarattiwong P, Gorowara M, Leawsrisuk P, Suwanlerk T, Boonrak P, Ruxrungtham K. Therapeutic drug monitoring of lopinavir in human immunodeficiency virus-infected children receiving adult tablets. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Jan;29(1):79-82.
16. Sungkanuparph S, Anekthananon T, Hiransuthikul N, Bowonwatanuwong C, Supparatpinyo K, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Tansuphaswadikul S, Buppanharun W, Manosuthi W, Techasathit W, Ratanasuwan W, Tantisiriwat W, Suwanagool S, Leechawengwongs M, Ruxrungtham K; Thai AIDS Society. Guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents: the recommendations of the Thai AIDS Society (TAS) 2008. *J Med Assoc Thai* 2008;91:1925-35
17. Manosuthi W, Sungkanuparph S, Tantanathip P, Mankatitham W, Lueangniyomkul A, Thongyen S, Eampokarap B, Uttayamakul S, Suwanvattana P, Kaewsaard S, Ruxrungtham K; for the N2R Study Team. Body Weight Cutoff for Daily Dosage of Efavirenz and 60-week Efficacy of Efavirenz-based Regimen in Co-infected HIV and Tuberculosis Patients Receiving Rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug 10.
18. Li AH, Phanuphak N, Sahasrabuddhe VV, Chaithongwongwatthana S, Vermund SH, Jenkins CA, Shepherd BE, Teeratakulpisarn N, van der Lugt J, Avihingsanon A, Ruxrungtham K, Shikuma C, Phanuphak P, Ananworanich J. Anal squamous intraepithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative men who have sex with men in Thailand. *Sex Transm Infect*. 2009 Jun 11.
19. Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREATAsia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods*. 2009 Aug;159(2):185-93
20. Mills AM, Nelson M, Jayaweera D, Ruxrungtham K, Cassetti I, Girard PM, Workman C, Dierynck I, Sekar V, Abeele CV, Lavreys L. Once-daily darunavir/ritonavir vs. lopinavir/ritonavir in treatment-naive, HIV-1-infected patients: 96-week analysis. *AIDS*. 2009 May 29.
21. van der Lugt J, Colbers A, Molto J, Hawkins D, van der Ende M, Vogel M, Wyen C, Schutz M, Koopmans P, Ruxrungtham K, Richter C, Burger D; SARA study team. The pharmacokinetics, safety and efficacy of boosted saquinavir tablets in HIV type-1-infected pregnant women. *Antivir Ther*. 2009;14(3):443-50.
22. Chang JJ, Sirivichayakul S, Avihingsanon A, Thompson AJ, Revill P, Iser D, Slavin J, Buranapraditkun S, Marks P, Matthews G, Cooper DA, Kent SJ, Cameron PU, Sasadeusz J, Desmond P, Locarnini S, Dore GJ, Ruxrungtham K, Lewin SR. Impaired quality of the hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell response in human immunodeficiency virus type 1-HBV coinfection. *J Virol*. 2009 Aug;83(15):7649-58.
23. van der Lugt J, Gorowara M, Avihingsanon A, Burger D, Ananworanich J, Sringam K, Kerr S, Wit F, Lange J, Ruxrungtham K. Reducing the boosting dose of ritonavir does not affect saquinavir plasma concentrations in HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 2009 Jun 1;23(9):1176-9.
24. Manosuthi W, Sungkanuparph S, Tantanathip P, Lueangniyomkul A, Mankatitham W, Prasithsirskul W, Burapatarawong S, Thongyen S, Likanonsakul S, Thawornwa U, Prommool V, Ruxrungtham K; N2R Study Team. A randomized trial comparing plasma drug concentrations and efficacies between 2 nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-based regimens in HIV-infected patients receiving rifampicin: the N2R Study. *Clin Infect Dis*. 2009 Jun 15;48(12):1752-9.

25. Bunupuradah T, van der Lugt J, Kosalaraksa P, Engchanil C, Boonrak P, Puthanakit T, Mengthaisong T, Mahanontharit A, Lumbiganon P, Tompkins E, Burger D, Ruxrungtham K, Ananworanich J; HIV-NAT 017 Study Team. Safety and efficacy of a double-boosted protease inhibitor combination, saquinavir and lopinavir/ritonavir, in pretreated children at 96 weeks. *Antivir Ther.* 2009;14(2):241-8.
26. Calmy A, Gayet-Ageron A, Montecucco F, Nguyen A, Mach F, Burger F, Ubolyam S, Carr A, Ruxrungtham K, Hirschel B, Ananworanich J; STACCATO Study Group. HIV increases markers of cardiovascular risk: results from a randomized, treatment interruption trial. *AIDS.* 2009 May 15;23(8):929-39.
27. Crane M, Oliver B, Matthews G, Avihingsanon A, Ubolyam S, Markovska V, Chang JJ, Dore GJ, Price P, Visvanathan K, French M, Ruxrungtham K, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatic flare in HIV/hepatitis B virus (HBV)-coinfected individuals after the initiation of HBV-active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2009 Apr 1;199(7):974-81.
28. Walmsley S, Avihingsanon A, Slim J, Ward DJ, Ruxrungtham K, Brunetta J, Bredeek UF, Jayaweera D, Guittari CJ, Larson P, Schutz M, Raffi F. Gemini: a noninferiority study of saquinavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir as initial HIV-1 therapy in adults. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 Apr 1;50(4):367-74.
29. Sungkanuparph S, Anekthananon T, Hiransuthikul N, Bowonwatanuwong C, Supparatpinyo K, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Tansuphaswadikul S, Buppanharun W, Manosuthi W, Techasathit W, Ratanasuwon W, Tantisiriwat W, Suwanagool S, Leechawengwongs M, Ruxrungtham K; Thai AIDS Society. Guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents: the recommendations of the Thai AIDS Society (TAS) 2008. *J Med Assoc Thai.* 2008 Dec;91(12):1925-35.
30. Avihingsanon A, van der Lugt J, Kerr SJ, Gorowara M, Chanmano S, Ohata P, Lange J, Cooper DA, Phanuphak P, Burger DM, Ruxrungtham K. A low dose of ritonavir-boosted atazanavir provides adequate pharmacokinetic parameters in HIV-1-infected Thai adults. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Apr;85(4):402-8.
31. Lewin SR, Ribeiro RM, Avihingsanon A, Bowden S, Matthews G, Marks P, Locarnini SA, Ruxrungtham K, Perelson AS, Dore GJ. Viral dynamics of hepatitis B virus DNA in human immunodeficiency virus-1-hepatitis B virus coinfecting individuals: similar effectiveness of lamivudine, tenofovir, or combination therapy. *Hepatology.* 2009 Apr;49(4):1113-21.
32. Mocroft A, Wyatt C, Szczech L, Neuhaus J, El-Sadr W, Tracy R, Kuller L, Shlipak M, Angus B, Klinker H, Ross M; INSIGHT SMART Study Group. Interruption of antiretroviral therapy is associated with increased plasma cystatin C. *AIDS.* 2009 Jan 2;23(1):71-82.
33. Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K. Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008 May 8.
34. Avihingsanon A, van der Lugt J, Kerr S, Gorowara M, Chanmano S, Ohata P, Lange J, Cooper D, Phanuphak P, Burger D, Ruxrungtham K. A Low Dose of Ritonavir-Boosted Atazanavir Provides Adequate Pharmacokinetic Parameters in HIV-1-Infected Thai Adults. *Clin Pharmacol Ther* 2008. *Impact factor 8.03*
35. Lewin SR, Ribeiro RM, Avihingsanon A, Bowden S, Matthews G, Marks P, Locarnini SA, Ruxrungtham K, Perelson AS, Dore GJ. Viral dynamics of hepatitis B virus DNA in human immunodeficiency virus-1-hepatitis B virus coinfecting individuals: Similar effectiveness of lamivudine, tenofovir, or combination therapy. *Hepatology* 2008 *Impact factor 6.64*
36. Matthews GV, Avihingsanon A, Lewin SR, Amin J, Rerknimitr R, Petcharapirat P, Marks P, Sasadeusz J, Cooper DA, Bowden S, Locarnini S, Ruxrungtham K, Dore GJ. A randomized trial of combination hepatitis B therapy in HIV/HBV coinfecting antiretroviral naive individuals in Thailand. *Hepatology* 2008;48:1062-9 *Impact factor 6.642*

37. Ananworanich J, Puthanakit T, Saphonn V, Cooper DA and Ruxrungtham K. Lessons from a multicentre paediatric HIV trial. *Lancet* 2008;372:356-7. *Impact factor* =18.32
38. Avihingsanon A, Manosuthi W, Kantipong P, Chuchotaworn C, Moolphate S, Sakornjun W, Gorowara M, Yamada N, Yanai H, Mitarai S, Ishikawa N, Cooper DA, Phanuphak P, Burger D, Ruxrungtham K. Pharmacokinetics and 48-week efficacy of nevirapine: 400 mg versus 600 mg per day in HIV-tuberculosis coinfection receiving rifampicin. *Antivir Ther* 2008;13:529-36 *Impact factor* 4.547
39. Mangclaviraj S, Kerr SJ, Chaithongwongwatthana S, Ananworanich J, Hirschel B, Emery S, Cooper DA, Chotnopparatpattara P, Ruxrungtham K, Phanuphak P. Nadir CD4 count and monthly income predict cervical squamous cell abnormalities in HIV-positive women in a resource-limited setting. *Int J STD AIDS* 2008;19:529-32 *Impact factor* 1.3
40. Sirivichayakul S, Phanuphak P, Pankam T, R OC, Sutherland D and Ruxrungtham K. HIV drug resistance transmission threshold survey in Bangkok, Thailand. *Antivir Ther* 2008;13 Suppl 2:109-13. *Impact factor* 4.547
41. Ananworanich J, Gayet-Ageron A, Ruxrungtham K, et al. Long-term efficacy and safety of first-line therapy with once-daily saquinavir/ritonavir. *Antivir Ther* 2008;13:375-80. *Impact factor* 4.547
42. Preiss S, Littlejohn M, Angus P, Thompson A, Desmond P, Lewin SR, Sasadeusz J, Matthews G, Dore GJ, Shaw T, Sozzi V, Yuen L, Lau G, Ayres A, Thio C, Avihingsanon A, Ruxrungtham K, Locarnini S, Revill PA. Defective hepatitis B virus DNA is not associated with disease status but is reduced by polymerase mutations associated with drug resistance. *Hepatology* 2008;48:741-9. *Impact factor* 6.642
43. Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K. Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;125:18-30. *Impact factor* 1.957
44. Kosalaraksa P, Bunupuradah T, Engchanil C, Boonrak P, Intasan J, Lumbiganon P, Burger D, Ruxrungtham K, Schutz M, Ananworanich J; HIV-NAT 017 Study Team. Double boosted protease inhibitors, saquinavir, and lopinavir/ritonavir, in nucleoside pretreated children at 48 weeks. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:623-8. *Impact factor* 2.376
45. Ananworanich J, Nuesch R, Cote HC, Kerr SJ, Hill A, Jupimai T, Laopraynak N, Saenawat S, Ruxrungtham K, Hirschel B. Changes in metabolic toxicity after switching from stavudine/didanosine to tenofovir/lamivudine--a Staccato trial substudy. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1340-3. *Impact factor* 4.038
46. van der Lugt J, Autar RS, Ubolyam S, Garcia EF, Sankote J, Avihingsanon A, Chuenyam T, Cooper DA, Lange J, Phanuphak P, Wit F, Ruxrungtham K, Burger D; HIV-NAT 019 Study Team. Pharmacokinetics and short-term efficacy of a double-boosted protease inhibitor regimen in treatment-naive HIV-1-infected adults. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1145-53. *Impact factor* 4.038
47. Autar RS, Boyd MA, Wit FW, Ruxrungthams K, Sankote J, Lange J, Cooper DA, Phanuphak P, Burger DM, Reiss P. Relationships between drug exposure, changes in metabolic parameters and body fat in HIV-infected patients switched to a nucleoside sparing regimen. *Antivir Ther* 2007;12:1265-71. *Impact factor* 4.547
48. Manosuthi W, Sungkanuparph S, Ruxrungtham K, et al. Plasma levels, safety, and 60-week efficacy of a once-daily double-boosted protease inhibitor regimen of atazanavir, saquinavir, and ritonavir. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;47:127-9

49. Nuesch R, Ananworanich J, Srasuebkul P, et al. Interruptions of tenofovir/emtricitabine-based antiretroviral therapy in patients with HIV/hepatitis B virus co-infection. *AIDS* 2008;22:152-4. *Impact factor* 5.842
50. Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Mootsikapun P, Kiertiburanakul S, Anekthananon T, Bowonwatanuwong C, Kowadisaiburana B, Supparatpinyo K, Ruxrungtham K; Study Team. Efficacy and tolerability of a double boosted protease inhibitor (lopinavir + saquinavir/ritonavir) regimen in HIV-infected patients who failed treatment with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *HIV Med* 2007;8:529-35. *Impact factor* 3.348
51. Mocroft A, Wyatt C, Szczech L, Neuhaus J, El-Sadr W, Tracy R, Kuller L, Shlipak M, Angus B, Klinker H, Ross M; INSIGHT SMART Study Group. Interruption of antiretroviral therapy is associated with increased plasma cystatin C. *AIDS*. 2009 Jan 2;23(1):71-82.
52. Fox Z, Phillips A, Cohen C, Neuhaus J, Baxter J, Emery S, Hirschel B, Hullsiek KH, Stephan C, Lundgren J; SMART Study Group. Viral resuppression and detection of drug resistance following interruption of a suppressive non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimen. *AIDS*. 2008 Nov 12;22(17):2279-89. *Impact factor* 5.842
53. SMART Study Group, El-Sadr WM, Grund B, Neuhaus J, Babiker A, Cohen CJ, Darbyshire J, Emery S, Lundgren JD, Phillips A, Neaton JD. Risk for opportunistic disease and death after reinitiating continuous antiretroviral therapy in patients with HIV previously receiving episodic therapy: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2008 Sep 2;149(5):289-99. *Impact factor* 11.13
54. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM, Girard PM, Grund B, Law M, Losso MH, Palfreeman A, Wood R. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis*. 2008 Apr 15;197(8):1133-44. *Impact factor* 6.03
55. ESPRIT Research Group, Fox Z, Antunes F, Davey R, Gazzard B, Klimas N, Labriola A, Losso M, Neaton JD, Phillips AN, Ruxrungtham K, Staszewski S, Weiss L, Lundgren JD. Predictors of CD4 count change over 8 months of follow up in HIV-1-infected patients with a CD4 count  $\geq$  300 cells/microL who were assigned to 7.5 MIU interleukin-2. *HIV Med*. 2007 Mar;8(2):112-23. *Impact factor* 3.347
56. Buranapraditkun S, Nookhai S, Ubolyam S, Sirivichayakul S, Phanuphak P, Ruxrungtham K. Cost savings by reagent reduction in flow cytometry-based CD4+ T cell counts: an approach to improve accessibility for HIV management. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2007 Mar;25(1):83-9. *Impact factor* =0.455
57. van Leth F, Phanuphak P, Ruxrungtham K, Baraldi E, Miller S, Gazzard B, Cahn P, Lalloo UG, van der Westhuizen IP, Malan DR, Johnson MA, Santos BR, Mulcahy F, Wood R, Levi GC, Reboredo G, Squires K, Cassetti I, Petit D, Raffi F, Katlama C, Murphy RL, Horban A, Dam JP, Hassink E, van Leeuwen R, Robinson P, Wit FW, Lange JM; 2NN Study team. Comparison of first-line antiretroviral therapy with regimens including nevirapine, efavirenz, or both drugs, plus stavudine and lamivudine: a randomised open-label trial, the 2NN Study. *Lancet*. 2004 Apr 17;363(9417):1253-63. *Impact factor* =28.32
58. Boom J, Kusters E, Duncombe C, Kerr S, Hirschel B, Ruxrungtham K, de Mast Q, Kosalaraksa P, Ulbolyam S, Jupimai T, Ananworanich J; Staccato Study Group. Ferritin levels during structured treatment interruption of highly active antiretroviral therapy. *HIV Med*. 2007 Sep;8(6):388-95. *Impact factor* =2.67
59. Autar RS, Wit FW, Sankote J, Sutthichom D, Kimenai E, Hassink E, Hill A, Cooper DA, Phanuphak P, Lange JM, Burger DM, Ruxrungtham K. Ketoconazole is inferior to ritonavir as an alternative booster for saquinavir in a once daily regimen in Thai HIV-1 infected patients. *AIDS*. 2007 Jul 31;21(12):1535-9. *Impact factor* =5.63

60. Madruga JV, Berger D, McMurchie M, Suter F, Banhegyi D, Ruxrungtham K, Norris D, Lefebvre E, de Bethune MP, Tomaka F, De Pauw M, Vangeneugden T, Spinosa-Guzman S; TITAN study group. Efficacy and safety of darunavir-ritonavir compared with that of lopinavir-ritonavir at 48 weeks in treatment-experienced, HIV-infected patients in TITAN: a randomised controlled phase III trial. *Lancet*. 2007 Jul 7;370(9581):49-58. *Impact factor* =18.32
61. Wirach Maek-A-Nantawat, Supranee Buranapraditkun, Jettanong Klaewsongkram, Kiat Ruxrungthum. Increased Interleukin-17 Production Both in Helper T Cell Subset Th17 And CD4-Negative T Cells in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Viral Immunology* 2007; 20:66-75. *Impact factor* =2.133
62. Asasutjarit R, Lorenzen SI, Sirivichayakul S, Ruxrungtham K, Ruktanonchai U, Ritthidej GC. Effect of Solid Lipid Nanoparticles Formulation Compositions on Their Size, Zeta Potential and Potential for In Vitro pHIS-HIV-Hugag Transfection. *Pharm Res*. 2007 Mar 24. *Impact factor* =2.85
63. Gayet-Ageron A, Ananworanich J, Jupimai T, Chetchotisakd P, Prasithsirikul W, Ubolyam S, Le Braz M, Ruxrungtham K, Rooney JF, Hirschel B. No change in calculated creatinine clearance after tenofovir initiation among Thai patients. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Mar 21. *Impact factor* =3.89
64. Hill A, Ruxrungtham K, Hanvanich M, Katlama C, Wolf E, Soriano V, Milinkovic A, Gatell J, Ribera E. Systematic review of clinical trials evaluating low doses of stavudine as part of antiretroviral treatment. *Expert Opin Pharmacother*. 2007 Apr;8(5):679-88. *Impact factor* =1.733
65. Kerr SJ, Duncombe C, Avihingsanon A, Ananworanich J, Boyd M, Sopa B, Medtech B, Chuenyam T, Cooper DA, Lange JM, Phanuphak P, Ruxrungtham K. Dyslipidemia in an asian population after treatment for two years with protease inhibitor-containing regimens. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)*. 2007 Mar;6(1):36-46.
66. Srasuebkul P, Ungsedhapand C, Ruxrungtham K, Boyd MA, Phanuphak P, Cooper DA, Law MG. Predictive factors for immunological and virological endpoints in Thai patients receiving combination antiretroviral treatment. *HIV Med*. 2007 Jan;8(1):46-54. *Impact factor* =2.67
67. Manosuthi W, Ruxrungtham K, Likanonsakul S, Prasithsirikul W, Inthong Y, Phoorisri T, Sungkanuparph S. Nevirapine levels after discontinuation of rifampicin therapy and 60-week efficacy of nevirapine-based antiretroviral therapy in HIV-infected patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 1;44(1):141-4. *Impact factor* =6.19
68. Siripassorn K, Charoenwongse P, Ruxrungtham K. Three suitable antigens for delayed-type hypersensitivity skin testing in a tropical country like Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2006 Jun-Sep;24(2-3):143-52. *Impact factor* =0.455
69. Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Kiertiburanakul S, Sutthent R, Anekthananon T, Bowonwatanuwong C, Kowadisaiburana B, Supparatpinyo K, Horsakulthai M, Chasombat S, Ruxrungtham K; Study Team. High rate multiple drug resistances in HIV-infected patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in Thailand, where subtype A/E is predominant. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)*. 2006 Dec;5(4):152-6.
70. Avihingsanon A, Avihingsanon Y, Darnpornprasert P, Kerr S, Ungsedhapand C, Duncombe C, Ubolyam S, Ruxrungtham K, Phanuphak P. High prevalence of indinavir-associated renal complications in Thai HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai*. 2006 Aug;89 Suppl 2:S21-7.
71. Boyd MA, Dixit NM, Siangphoe U, Buss NE, Salgo MP, Lange JM, Phanuphak P, Cooper DA, Perelson AS, Ruxrungtham K. Viral decay dynamics in HIV-infected patients receiving ritonavir-boosted saquinavir

- and efavirenz with or without enfuvirtide: a randomized, controlled trial (HIV-NAT 012). *J Infect Dis.* 2006 Nov 1;194(9):1319-22. Epub 2006 Sep 25. *Impact factor* =5.36
72. Ananworanich J, Hirschel B, Sirivichayakul S, Ubolyam S, Jupimai T, Prasithsirikul W, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Munsakul W, Raksakulkarn P, Tansuphasawadikul S, Schutz M, Snowden W, Ruxrungtham K; Staccato Study Team. Absence of resistance mutations in antiretroviral-naive patients treated with ritonavir-boosted saquinavir. *Antivir Ther.* 2006;11(5):631-5. *Impact factor* =4.988
  73. Boyd MA, Carr A, Ruxrungtham K, Srasuebkul P, Bien D, Law M, Wangsuphachart S, Krisanachinda A, Lerdlum S, Lange JM, Phanuphak P, Cooper DA, Reiss P. Changes in body composition and mitochondrial nucleic acid content in patients switched from failed nucleoside analogue therapy to ritonavir-boosted indinavir and efavirenz. *J Infect Dis.* 2006 Sep 1;194(5):642-50. *Impact factor* =5.36
  74. Nuesch R, Srasuebkul P, Ananworanich J, Ruxrungtham K, Phanuphak P, Duncombe C; HIV-NAT Study Team. Monitoring the toxicity of antiretroviral therapy in resource limited settings:a prospective clinical trial cohort in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Sep;58(3):637-44. *Impact factor* =4.15
  75. Ananworanich J, Gayet-Ageron A, Le Braz M, Prasithsirikul W, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Munsakul W, Raksakulkarn P, Tansuphasawadikul S, Sirivichayakul S, Cavassini M, Karrer U, Genne D, Nuesch R, Vernazza P, Bernasconi E, Leduc D, Satchell C, Yerly S, Perrin L, Hill A, Perneger T, Phanuphak P, Furrer H, Cooper D, Ruxrungtham K, Hirschel B; Staccato Study Group; Swiss HIV Cohort Study. CD4-guided scheduled treatment interruptions compared with continuous therapy for patients infected with HIV-1: results of the Staccato randomised trial. *Lancet.* 2006 Aug 5;368(9534):459-65. *Impact factor* =18.32
  76. Manosuthi W, Sungkanuparph S, Thakkinstian A, Rattanasiri S, Chaovavanich A, Prasithsirikul W, Likanonsakul S, Ruxrungtham K. Plasma nevirapine levels and 24-week efficacy in HIV-infected patients receiving nevirapine-based highly active antiretroviral therapy with or without rifampicin. *Clin Infect Dis.* 2006 Jul 15;43(2):253-5. *Impact factor* =6.186
  77. Boyd MA, Srasuebkul P, Khongphattanayothin M, Ruxrungtham K, Hassink EA, Duncombe CJ, Ubolyam S, Burger DM, Reiss P, Stek M Jr, Lange J, Cooper DA, Phanuphak P. Boosted versus unboosted indinavir with zidovudine and lamivudine in nucleoside pre-treated patients: a randomized, open-label trial with 112 weeks of follow-up (HIV-NAT 005). *Antivir Ther.* 2006;11(2):223-32. *Impact factor* =4.988
  78. Boyd MA, Srasuebkul P, Ruxrungtham K, Mackenzie PI, Uchaipichat V, Stek M Jr, Lange JM, Phanuphak P, Cooper DA, Udomuksorn W, Miners JO. Relationship between hyperbilirubinaemia and UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism in adult HIV-infected Thai patients treated with indinavir. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 May;16(5):321-9. *Impact factor* =5.39
  79. Boyd MA, Siangphoe U, Ruxrungtham K, Reiss P, Mahanontharit A, Lange JM, Phanuphak P, Cooper DA, Burger DM. The use of pharmacokinetically-guided indinavir dose reductions in the management of indinavir-associated renal toxicity. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jun;57(6):1161-7. *Impact factor* =4.15
  80. Manosuthi W, Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S, Ruxrungtham K, Vibhagool A, Rattanasiri S, Thakkinstian A. Efavirenz 600 mg/day versus efavirenz 800 mg/day in HIV-infected patients with tuberculosis receiving rifampicin: 48 weeks results. *AIDS.* 2006 Jan 2;20(1):131-2. *Impact factor* =5.63
  81. Autar RS, Wit FW, Sankote J, Mahanontharit A, Anekthananon T, Mootsikapun P, Sujaikaew K, Cooper DA, Lange JM, Phanuphak P, Ruxrungtham K, Burger DM. Nevirapine plasma concentrations and concomitant use of rifampin in patient coinfecting with HIV-1 and tuberculosis. *Antivir Ther.* 2005;10(8):937-43. *Impact factor* =4.988

82. Boyd MA, Siangphoe U, Ruxrungtham K, Duncombe CJ, Stek M, Lange JM, Cooper DA, Phanuphak P. Indinavir/ritonavir 800/100 mg bid and efavirenz 600 mg qd in patients failing treatment with combination nucleoside reverse transcriptase inhibitors: 96-week outcomes of HIV-NAT 009. *HIV Med.* 2005 Nov;6(6):410-20. *Impact factor =2.64*
83. Ananworanich J, Kosalaraksa P, Hill A, Siangphoe U, Bergshoeff A, Pancharoen C, Engchanil C, Ruxrungtham K, Burger D; HIV-NAT 017 Study Team. Pharmacokinetics and 24-week efficacy/safety of dual boosted saquinavir/lopinavir/ritonavir in nucleoside-pretreated children. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Oct;24(10):874-9. *Impact factor =3.215*
84. Ananworanich J, Hill A, Siangphoe U, Ruxrungtham K, Prasithsirikul W, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Munsakul W, Raksakulkarn P, Tansuphasawadikul S, Nuesch R, Cooper DA, Hirschel B; STACCATO Study Group. A prospective study of efficacy and safety of once-daily saquinavir/ritonavir plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in treatment-naïve Thai patients. *Antivir Ther.* 2005;10(6):761-7. *Impact factor =4.988*
85. Autar RS, Boffito M, Hassink E, Wit FW, Ananworanich J, Siangphoe U, Pozniak A, Cooper DA, Phanuphak P, Lange JM, Ruxrungtham K, Burger DM. Interindividual variability of once-daily ritonavir boosted saquinavir pharmacokinetics in Thai and UK patients. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Nov;56(5):908-13. *Impact factor =4.15*
86. Manosuthi W, Sungkanuparph S, Thakkinstian A, Vibhagool A, Kiertiburanakul S, Rattanasiri S, Prasithsirikul W, Sankote J, Mahanontharit A, Ruxrungtham K. Efavirenz levels and 24-week efficacy in HIV-infected patients with tuberculosis receiving highly active antiretroviral therapy and rifampicin. *AIDS.* 2005 Sep 23;19(14):1481-6. *Impact factor =5.63*
87. Ananworanich J, Siangphoe U, Hill A, Cardiello P, Apateerapong W, Hirschel B, Mahanontharit A, Ubolyam S, Cooper D, Phanuphak P, Ruxrungtham K. Highly active antiretroviral therapy (HAART) retreatment in patients on CD4-guided therapy achieved similar virologic suppression compared with patients on continuous HAART: the HIV Netherlands Australia Thailand Research Collaboration 001.4 study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Aug 15;39(5):523-9. *Impact factor 4.412*
88. Ananworanich J, Chantaphakul H, Teeratakulpisarn S, Siangphoe U, Ubolyam S, Chuenyam T, Ungsedhaphan C, Lange J, Cooper D, Phanuphak P, Ruxrungtham K. No effect of interleukin-2 on IgE levels given in addition to antiretroviral therapy in HIV-infected adults with CD4 >300 cells/mm<sup>3</sup>. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2005 Mar;23(1):23-8. *Impact factor =0.455*
89. Boyd M, Mootsikapun P, Burger D, Chuenyam T, Ubolyam S, Mahanontharit A, Sangkote J, Bunyaprawit P, Horsakulchai M, Lange J, Cooper D, Phanuphak P, Ruxrungtham K. Pharmacokinetics of reduced-dose indinavir/ritonavir 400/100 mg twice daily in HIV-1-infected Thai patients. *Antivir Ther.* 2005;10(2):301-7. *Impact factor =4.988*
90. Cardiello P, Srasuebkul P, Hassink E, Mahanontharit A, Samor T, Ruxrungtham K, Lange J, Cooper D, Phanuphak P. The 48-week efficacy of once-daily saquinavir/ritonavir in patients with undetectable viral load after 3 years of antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2005 Mar;6(2):122-8. *Impact factor =2.67*
91. Nuesch R, Ananworanich J, Sirivichayakul S, Ubolyam S, Siangphoe U, Hill A, Cooper D, Lange J, Phanuphak P, Ruxrungtham K. Development of HIV with drug resistance after CD4 cell count-guided structured treatment interruptions in patients treated with highly active antiretroviral therapy after dual-nucleoside analogue treatment. *Clin Infect Dis.* 2005 Mar 1;40(5):728-34. *Impact factor =6.186*
92. Cardiello PG, Hassink E, Ananworanich J, Srasuebkul P, Samor T, Mahanontharit A, Ruxrungtham K, Hirschel B, Lange J, Phanuphak P, Cooper DA. A prospective, randomized trial of structured treatment

- interruption for patients with chronic HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis*. 2005 Feb 15;40(4):594-600. *Impact factor* =6.186
93. Ananworanich J, Moor Z, Siangphoe U, Chan J, Cardiello P, Duncombe C, Phanuphak P, Ruxrungtham K, Lange J, Cooper DA. Incidence and risk factors for rash in Thai patients randomized to regimens with nevirapine, efavirenz or both drugs. *AIDS*. 2005 Jan 28;19(2):185-92. *Impact factor* =5.63
  94. Duncombe C, Kerr SJ, Ruxrungtham K, Dore GJ, Law MG, Emery S, Lange JM, Phanuphak P, Cooper DA. HIV disease progression in a patient cohort treated via a clinical research network in a resource limited setting. *AIDS*. 2005 Jan 28;19(2):169-78. *Impact factor* =5.63
  95. Lolekha R, Sirivichayakul S, Siangphoe U, Pancharoen C, Kaewchana S, Apateerapong W, Mahanontharit A, Chotpitayasunondh T, Ruxrungtham K, Phanuphak P, Ananworanich J. Resistance to dual nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in children infected with HIV clade A/E. *Clin Infect Dis*. 2005 Jan 15;40(2):309-12. Epub 2004 Dec 21. *Impact factor* =6.186
  96. Ananworanich J, Siangphoe U, Mahanontharit A, Hill A, Hirschel B, Ruxrungtham K. Saquinavir trough concentration before and after switching NRTI to tenofovir in patients treated with once-daily saquinavir hard gel capsule/ritonavir 1600 mg/100 mg. *Antivir Ther*. 2004;9:1035-6. *Impact factor* =4.988
  97. Ananworanich J, Pancharoen C, Sirivichayakul S, Buranapraditkun S, Apateerapong W, Ubolyam S, Ruxrungtham K. Undetectable plasma HIV-1 RNA with strong gag-pol specific interferon-gamma ELISPOT response in an HIV-1 clade A/E-infected child untreated with antiretroviral therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2004;22:165-9. *Impact factor* =0.455
  98. Sirivichayakul S, Tirawatnapong T, Ruxrungtham K, Oelrichs R, Lorenzen SL, Xin KQ, Okuda K, Phanuphak P. Construction and immunogenicity study of a 297-bp humanized HIV V3 DNA of an approximated last common ancestor in mice. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2004;22:49-60. *Impact factor* =0.455
  99. Autar RS, Ananworanich J, Apateerapong W, Sankote J, Hill A, Hirschel B, Cooper D, Lange J, Phanuphak P, Ruxrungtham K, Burger D. Pharmacokinetic study of saquinavir hard gel caps/ritonavir in HIV-1-infected patients: 1600/100 mg once-daily compared with 2000/100 mg once-daily and 1000/100 mg twice-daily. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:785-90. *Impact factor* =4.15
  100. Ananworanich J, Cheunyam T, Teeratakulpisarn S, Boyd MA, Ruxrungtham K, Lange J, Cooper D, Phanuphak P. Creation of a drug fund for post-clinical trial access to antiretrovirals. *Lancet*. 2004 Jul 3;364(9428):101-2. *Impact factor* =18.32
  101. Chansritrakul S, Eiam-Ong S, Kansanabuch T, Wathanavaha A, Ruxrungtham K. Continuous ambulatory peritoneal dialysis improves both the number and memory function of CD4 T cells in uremic patients. *J Med Assoc Thai*. 2004 Apr;87(4):389-94.
  102. Arduino RC, Nannini EC, Rodriguez-Barradas M, Schrader S, Losso M, Ruxrungtham K, Allende MC, Emery S, Fosdick L, Neaton J, Tavel JA, Davey RT, Lane HC; Evaluation of Subcutaneous Proleukin in a Randomized International Trial (ESPRIT) Vanguard Group; ESPRIT Executive Committee. CD4 cell response to 3 doses of subcutaneous interleukin 2: meta-analysis of 3 Vanguard studies. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 1;39(1):115-22. Epub 2004 Jun 14. *Impact factor* =6.186
  103. Ungsedhapand C, Srasuebkul P, Cardiello P, Ruxrungtham K, Ratanasuwan W, Kroon ED, Tongtalung M, Juengprasert N, Ubolyam S, Siangphoe U, Emery S, Lange JM, Cooper DA, Phanuphak P; on Behalf of the HIV-NAT 002 and HIV-NAT 003 Study Team. Three-year durability of dual-nucleoside versus triple-nucleoside therapy in a Thai population with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004 Jun 1;36(2):693-701.



104. Law WP, Duncombe CJ, Mahanontharit A, Boyd MA, Ruxrungtham K, Lange JM, Phanuphak P, Cooper DA, Dore GJ. Impact of viral hepatitis co-infection on response to antiretroviral therapy and HIV disease progression in the HIV-NAT cohort. *AIDS*. 2004 May 21;18(8):1169-77. *Impact factor* =5.63

#### BOOK CHAPTERS

1. Ruxrungtham K. HIV/AIDS in Thailand: Epidemiology and Clinical Management. In: *AIDS und HIV-Infektionen* (Chapter II-1.6). Editors: Herausgeben von, H. Jager. Ecomed 1999.
2. Ruxrungtham K, N Kumarasamy, Suniti Solomon, Mark Newell. Management of HIV-infected patients in developing country. In: *Management of the HIV-infected patients*. Second edition, Crowe Suzanne, et al ed., Cambridge University Press, 2002; Chapter 23.
3. Kerr SJ, Ruxrungtham K. Transmission of HIV and its prevention in Asia. In 'Global HIV/AIDS Medicine' Ed Sande M.A.; Volberding P.A. & Lange J, Elsevier 2007.
4. Ruxrungtham K. HIV-NAT Clinical Trials in Thailand, In: *A Decade of HAART: Historical Perspectives and Future Directions*. Bartlett J, Zuniga JM, Whiteside A, Ghaziani A, eds. 2008
5. Ruxrungtham Kiat. Immunology of HIVinfection. In: *Fundamentals of Global HIV Medicine*. Edited by Z Temesgen (Editor-in-chief), Anthony Amoroso, Bruce Gilliam, Eric P Goosby and Robert Orenstein. IHL press GA, USA 2009

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) สุปรานี บุรณประดิษฐ์กุล  
 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Suprane Buranapraditkun  
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1009-01383-52-3  
 ตำแหน่งปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ (ชำนาญการ) ระดับ 7  
 นิสิตปริญญาเอก  
 หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคมุมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์  
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4579  
 โทรสาร. 0-652-3100  
 E-mail: [bsuprane2001@yahoo.com](mailto:bsuprane2001@yahoo.com)

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	2538
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2545
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปร.ด.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2554

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: AIDS, Cellular Immunology

Fellowship Awarded AND CONFERENCE ATTENDED:

- 1996 - Fellowship Training Program in CTL against HIV from French Government at Pitie Salpetriere Hospital, Paris, France. October - December, 1996.
- 1998 - Bangkok symposium on HIV Medicine, Bangkok, Thailand, January 21-23, 1998.  
 - 5<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, IL., USA, February 1-5, 1998.
- 1999 - Bangkok symposium on HIV Medicine, Bangkok, Thailand, January 20-22, 1999.
- 2000 - Full scholarship to attend the 13th AIDS Conference, Durban, South Africa, July 9-14, 2000.  
 - FIMSA Travel Award to attend the Australasian Society for Immunology, 30th Annual Conference, Sydney, Australia, Dec 10-15, 2000.
- 2001 - Application of ELISPOT assay for the assessment of cell-mediated immune responses in HIV-vaccine-related research, Duke University Medical Centre, Durham, North Carolina, USA, April 15-20, 2001.
- 2002 - Scholarship to attend the 6th FIMSA Advanced Course and Conference "Molecular Mechanisms of Infection and Immunity" Ayutthaya, Thailand, October 21-25, 2002
- 2003 - Application of the IFN-gamma ELISPOT assay to monitor cellular immune responses in HIV vaccine-related research in Asia, National Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China, January 13-18, 2003  
 - Fellow scholarship to attend the 10<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA., USA, February 10-14, 2003.  
 - 2<sup>nd</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Paris, France, July 13-16, 2003.
- 2004 - Fellow scholarship to attend the 11<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA., USA, February 8-11, 2004.

- 2005 - 12<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA., USA, February 22-25, 2005.
- 2<sup>nd</sup> Annual Scientific Advisory Meeting Relative to Vaccine Design (NIH contract #No1-AI-30024), Lima, Peru, July 19-24, 2005
- 2006 - Fellowship Training Program in Development of Clinically relevant formulations of HIV vaccines: human and primate studied from at Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands. January – August, 2006.
- 3<sup>rd</sup> Annual Scientific Advisory Meeting Relative to Vaccine Design (NIH contract #No1-AI-30024), Beijing, China, September 17--21, 2006
- 2007 - 4<sup>th</sup> Annual Scientific Advisory Meeting Relative to Vaccine Design (NIH contract #No1-AI-30024), Boston, USA, September 1-9, 2007
- 2008 - 15<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA., USA, February 3-7, 2008.
- 2009 - HIV Immunology: From Infection to Immune Control, Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA, March 21-28, 2009.
- Vaccine 3rd Global Congress, Singapore, October 3-7, 2009
- 2010 - XVIII International AIDS Conference, Vienna, Austria, July 18-23, 2010.
- Travel Bursary to attend the 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
- 2011 - 14<sup>th</sup> Bangkok International symposium on HIV Medicine, Bangkok, Thailand, January 19-21, 2011.
- AIDS Vaccine 2011, Bangkok, Thailand, September 12-15, 2011.
- 2012 - 15<sup>th</sup> Bangkok International symposium on HIV Medicine, Bangkok, Thailand, January 18-20, 2012.
- Full scholarship to attend the AIDS Vaccine 2012, Boston, MA., USA, Sep 9-12, 2012
- 2013 - 3<sup>rd</sup> Asean Cytometry Workshop, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, MAhidol University, Bangkok, Thailand, April 1-5, 2013

**ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)**

1. Phanuphak P, Chuenyam M, Ubolyam S, Buranapraditkun S, Teeratakulpisarn S, Ruxrungtham K, Norio I and Takashi M. Clinical Study of Micronized Reishi Mushroom in Thai HIV patients. In Proceedings of the First International Symposium on Ganoderma lucidum in Japan, November 1997.
2. Kroon ED, Ungsedhapand C, Ruxrungtham K, Chuenyam M, Ubolyam S, Newell ME, van Leeuwen R, Kuanusont C, Buranapraditkun S, Sirivichayakul S, Lange JM, Cooper DA, Phanuphak P . A randomized, double-blind trial of half versus standard dose of zidovudine plus zalcitabine in Thai HIV-1-infected patients (study HIV-NAT 001). HIV Netherlands Australia Thailand Research Collaboration: AIDS 2000 Jul 7; 14(10):1349-56.
3. Ruxrungtham K, Kroon ED, Ungsedhapand C, Teeratakulpisarn S, Ubolyam S, Buranapraditkun S, van Leeuwen R, Weverling GJ, Kuanusont C, Lange JM, Cooper DA, Phanuphak P. A randomized, dose-finding

study with didanosine plus stavudine versus didanosine alone in antiviral-naive, HIV-infected Thai patients: AIDS 2000 Jul 7;14(10):1375-82.

4. Ruxrungtham K, Suwanagool S, Tavel JA, Chuenyam M, Kroon E, Ubolyam S, Buranapraditkun S, Techasathit W, Li Y, Emery S, Davey RT, Fosdick L, Kunanusont C, Lane HC, Phanuphak P; Vanguard Study Group. A randomized, controlled 24-week study of intermittent subcutaneous interleukin-2 in HIV-1 infected patients in Thailand: AIDS. 2000 Nov 10;14(16):2509-13.
5. Ungsedhapand C, Kroon ED, Suwanagool S, Ruxrungtham K, Yimsuan N, Sonjai A, Ubolyam S, Buranapraditkun S, Tiengrim S, Pakker N, Kunanusont C, Lange JM, Cooper DA, Phanuphak P. A randomized, open-label, comparative trial of zidovudine plus lamivudine versus zidovudine plus lamivudine plus didanosine in antiretroviral-naive HIV-1-infected Thai patients: J Acquir Immune Defic Syndr. 2001 Jun 1;27(2):116-23.
6. Ananworanich J, Pancharoen C, Sirivichayakul S, Buranapraditkun S, Apateerapong W, Ubolyam S, Ruxrungtham K. Undetectable plasma HIV-1 RNA with strong gag-pol specific interferon-gamma ELISPOT response in an HIV-1 clade A/E-infected child untreated with antiretroviral therapy: Asian Pac J Allergy Immunol. 2004 Jun-Sep;22(2-3):165-9.
7. Hansasuta P, Incomserb P, Buranapraditkun S and Bhattarakosol P. Establishment of Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Autologous Epstein-Barr Virus in HIV-infected Patients: The Feasibility Study of EBV-specific immunotherapy for Patients With EBV-associated Lymphoma. J Med Assoc Thai 2004; 87(Suppl2): S146-51.
8. Suradhat S, Sada W, Buranapraditkun S, Damrongwatanapokin S. The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). Vet Immunol Immunopathol. 2005 Jul 15;106(3-4):197-208.
9. Suradhat S, Kedsangsakonwut S, Sada W, Buranapraditkun S, Wongsawang S, Thanawongnuwech R. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. Vaccine. 2006 Mar 24;24(14):2634-42. Epub 2005 Dec 19.
10. Bunaprasert T, Thongmarongsri N, Thanakit V, Ruangvejvorachai P, Buranapraditkun S, Maneesri S, Kanokpanont S. Tissue engineering of cartilage with porous polycaprolactone-alginate scaffold: the first report of tissue engineering in Thailand. J Med Assoc Thai 2006;89 Suppl 3:S108-14.
11. Maek-A-Nantawat W, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J, Ruxrungtham K. Increased interleukin-17 production both in helper T cell subset Th17 and CD4-negative T cells in human immunodeficiency virus infection. Viral Immunol 2007; 20(1): 66-75.
12. Buranapraditkun S, Nookhai S, Ubolyam S, Sirivichayakul S, Phanuphak P, Ruxrungtham K. Cost Savings by Reagent Reduction in Flow Cytometry-Based CD4+ T Cell Counts: An Approach to Improve Accessibility for HIV Management Asian Pac J Allergy Immunol 2007; 25 (1): 83-89.
13. Chang J, Sirivichayakul S, Avihingsanon A, Thompson A, Revill P, Iser D, Slavin J, Buranapraditkun S, Marks P, Matthews G, Cooper D, Kent S, Cameron P, Sasadeusz J, Desmond P, Locarnini S, Dore G, Ruxrungtham K, and Lewin S. Impaired Quality of the Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Response in Human Immunodeficiency Virus Type 1-HBV Coinfection. Journal of Virology 2009; 83(15):7649-7658.

14. Wongyanin P, Buranapraditkun S, Chokeshai-Usaha K, Thanawonguwech R, Suradhat S. Induction of inducible CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* 2010;133(2-4):170-82.
15. Crane M, Sirivichayakul S, Chang JJ, Avihingsanon A, Ubolyam S, Buranapraditkun S, Thantiworasit P, Wightman F, Locarnini S, Matthews G, Dore GJ, Ruxrungtham K, Lewin SR. No increase in hepatitis B virus (HBV)-specific CD8+ T cells in patients with HIV-1-HBV coinfections following HBV-active highly active antiretroviral therapy. *Journal of Virology* 2010; 84(6):2657-65.
16. Pulsawat P, Piboonpocanun S, Sirivichayakul S, Buranapraditkun S, Jacquet A, Shimada M, Okuda K, Ruxrungtham K. Production and immunogenicity of hypoallergenic codon-optimized DNA vaccine encoding mature Der p 1 allergen. *J Investig Allergol Clin Immunol*.2010; 20(7):582-90.
17. Wismol P, Putivoranat P, Buranapraditkun S, Pinnobphun P, Ruxrungtham K, Klaewsongkram J. The values of nasal provocation test and basophil activation test in the different patterns of ASA/NSAID hypersensitivity. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012; 40(3):156-63.
18. Pinnobphun P, Buranapraditkun S, Kampitak T, Hirankarn N, Klaewsongkram J. The diagnostic value of basophil activation test in patients with an immediate hypersensitivity reaction to radiocontrast media. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 May;106(5):387-93.
19. Sirivichayakul S, Thantiworasit P, Chatkulkawin P, Buranapraditkun S, Munier ML, Kelleher AD, Ruxrungtham K. Immunogenicity assay validation for an HIV vaccine trial: High IFN $\gamma$ (+)/IL-2(+) CD8(+) T cells background in healthy Thais. *Vaccine*. 2011 Aug 11;29(35):6002-7.
20. Buranapraditkun S, Hempel U, Pitakpolrat P, Allgaier RL, Thantivorasit P, Lorenzen SI, Sirivichayakul S, Hildebrand WH, Aitfeld M, Brander C, Walker BD, Phanuphak P, Hansasuta P, Rowland-Jones SL, Allen TM, Ruxrungtham K. A novel immunodominant CD8+ T cell response restricted by a common HLA-C allele targets a conserved region of Gag HIV-1 clade CRF01\_AE infected Thais. *PLoS One*. 2011;6(8):e23603.
21. Wangrattanasopon P, Ruxrungtham K, Chantaphakul H, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J. Alkali-treated penicillin G solution is a better option than penicillin G as an alternative source of minor determinants for penicillin skin test. *Allergy Asthma Proc*. 2012 Mar; 33(2): 152-9.
22. Wongyanin P, Buranapraditkun S, Yoo D, Thanawongnuwech R, Roth JA, Suradhat S. Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg). *J Gen Virol*. 2012 Jun; 93(Pt 6):1236-46.
23. Tanvarasethee B, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J. The Potential of Using Enzyme-linked Immunospot to Diagnose Cephalosporin-induced Maculopapular Exanthems. *Acta Derm Venereol*. 2012 Jun 21.

24. Tongtako W, Klaewsongkram J, Jaronsukwimal N, Buranapraditkun S, Mickleborough TD, Suksom D. The effect of acute exhaustive and moderate intensity exercises on nasal cytokine secretion and clinical symptoms in allergic rhinitis patients. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012 Sep;30(3):185-92.
25. Chokeshai-u-saha K, Buranapraditkun S, Jacquet A, Nguyen C, Ruxrungtham K. A two-step non-flowcytometry-based naïve B cell isolation method and its application in Staphylococcal enterotoxin B (SEB) presentation. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012 Sep;30(3):214-23.
26. Thongprayoon C, Tantrachoti P, Phatharacharukul P, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J. Associated immunological disorders and cellular immune dysfunction in thymoma: a study of 87 cases from Thailand. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Feb;61(1):85-93.
27. Pulsawat P, Pitakpolrat P, Prompetchara E, Kaewamatawong T, Techakriengkrai N, Sirivichayakul S, Buranapraditkun S, Hannaman D, Ruxrungtham K, Jacquet A. Optimization of a Der p 2-based prophylactic DNA vaccine against house dust mite allergy. *Immunol Lett*. 2013 Feb 8. pii: S0165-2478(13)00015-1.

3. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ชุตีธร เกตุลอย  
 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Chutitorn Ketloy  
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1009-03888-40-1  
 ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์  
 หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: ภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูง  
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4136  
 ต่อ 114  
 E-mail: chutitorn.k@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์ (เกียรตินิยมอันดับ 2)	2541
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	วิทยาทางการแพทย์	2544
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปร.ด.	ชีวเวชศาสตร์	2551

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: Dengue

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Suwannaboot S, Ketloy C, Ganokroj P, Ujgin P. Correlation of analytical performance of automated chemistry analyzer between Abbott Architect c8000 and Roche Cobas c501. Chula Med J 2012; 56(4): 413-419.
2. Mekaroonkamol P, Ketloy C, Chamnanprai S, Milintakas A, Chatsantikul R and Ujgin P. Evaluation of COBAS c111 and COBAS INTEGRA 800 automated analyzers, Chula Med J 2009; 53(6): 499-507.
3. Mekaroonkamol P, Liyamasawat P, Akvong P, Thepa N, Ketloy C, and Ujgin P. Is automated urine sediment analyzer iQ200 a practical replacement ?, Chula Med J 2009; 53(6): 477-487.
4. Ketloy C, Sirivichayakul S, Ruxrungtham K. A low cost duplex polymerase chain reaction to detect common HIV-1 CRF 01AE reverse transcriptase inhibitors resistance-associated mutations: 103N/181C and 151M/215Y. Asian Biomedicine 2009; 3 (6): 611-621.
5. Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K: Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. Vet Immunol Immunopathol 2008; 125(1-2): 18-30.

4. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) เอกชัย พรหมเพชร  
 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Eakachai Prompetchara  
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-8607-00266-77-9  
 ตำแหน่งปัจจุบัน: นิสิตปริญญาเอก  
 หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาวิชาโรคภูมิแพ้ฯ ภาควิชาอายุรศาสตร์  
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4000  
 ต่อ 3564 โทรสาร. 02-6523100  
 E-mail: eak\_ahs12@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์ (เกียรตินิยมอันดับ 1)	2549
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปร.ด.	ชีวเวชศาสตร์	2556

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: Dengue, DNA vaccine

ACADEMIC ATTENDANCE AND TRAINING

June 2007 Training participant in "Good Clinical Laboratory Practice Training Workshop"  
 Bangkok, Thailand

October 2008 Attendance in "2<sup>nd</sup> International Conference on Dengue Fever/Dengue  
 Hemorrhagic fever" Phuket, Thailand

December 2008 Training participant in "Training on the Use of Laboratory Animals for Scientific  
 Purposes" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

October 2012 Attendance in "Abbas's Advanced Course in Basic and Clinical Immunology"  
 Bangkok, Thailand

October 2012 Attendance in "Research Training Program in Biomedical  
 Science" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

August 2013 Training participant in "Training for working in Biosafety Level 2 & 3 Laboratory"  
 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

CONFERENCE

April 2007 31<sup>st</sup> Annual Meeting of Medical Technologist Association of Thailand, Bangkok,  
 Thailand (Poster Presentation)

November 2012 Singapore International Conference on Dengue and Emerging Infections,  
 Singapore (Poster Presentation)

April 2013 RGJ-Ph.D. Congress XIV, Pattaya, Thailand (with outstanding Poster  
 Presentation Award)

June 2013 52<sup>nd</sup> Annual Scientific Conference, Faculty of Medicine, Chulalongkorn  
 University, Bangkok, Thailand. (Oral Presentation, Awarded)



ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Pinya Pulsawat, Patrawadee Pitakpolrat, Eakachai Prompetchara, Theerayuth Kaewamatawong, Navapon Techakriengkrai, Sunee Sirivichayakul, Supranee Buranapraditkun, Drew Hannaman, Kiat Ruxrungtham, Alain Jacquet. Optimization of a Der p 2-based prophylactic DNA vaccine against house dust mite allergy. *Immunol Lett.* 2013 Mar;151(1-2):23-30.
2. Araya Radtanakantikanon, Juthatip Keawcharoen, Nataya Charoenvisal, Yong Poovorawan, Eakachai Prompetchara, Ryoji Yamaguchi, Somporn Techangamsuwan. Genotypic lineages and restriction fragment length polymorphism of canine distemper virus isolates in Thailand. *Veterinary Microbiology.* 2013; 166 76–83.
3. Chutitorn Ketloy, Poonsook Keelapang, Eakachai Prompetchara, Amporn Suphatrakul, Chunya Puttikhunt, Watchara Kasinrerak, Eiji Konishi, Nopporn Sittisombut and Kiat Ruxrungtham. Strategies to improve the immunogenicity of prM+E dengue virus type-2 DNA vaccine. (Submitted to *Vaccine Journal*)
4. Eakachai Prompetchara, Chutitorn Ketloy, Poonsook Keelapang, Nopporn Sittisombut, Kiat Ruxrungtham. Homologous Prime/Boost of Tetravalent Dengue DNA-based Vaccine by Using *In Vivo* Electroporation Induced Strong Neutralizing Antibody Against four serotypes of Dengue Virus in Mice. (Submitted to *PLOS ONE*)
5. Eakachai Prompetchara, Chutitorn Ketloy, Poonsook Keelapang, Prida Malasit, Nopporn Sittisombut and Kiat Ruxrungtham. Priming effect of Dengue or Japanese encephalitis viruses on tetravalent dengue DNA vaccine immunogenicity. (in preparation)