

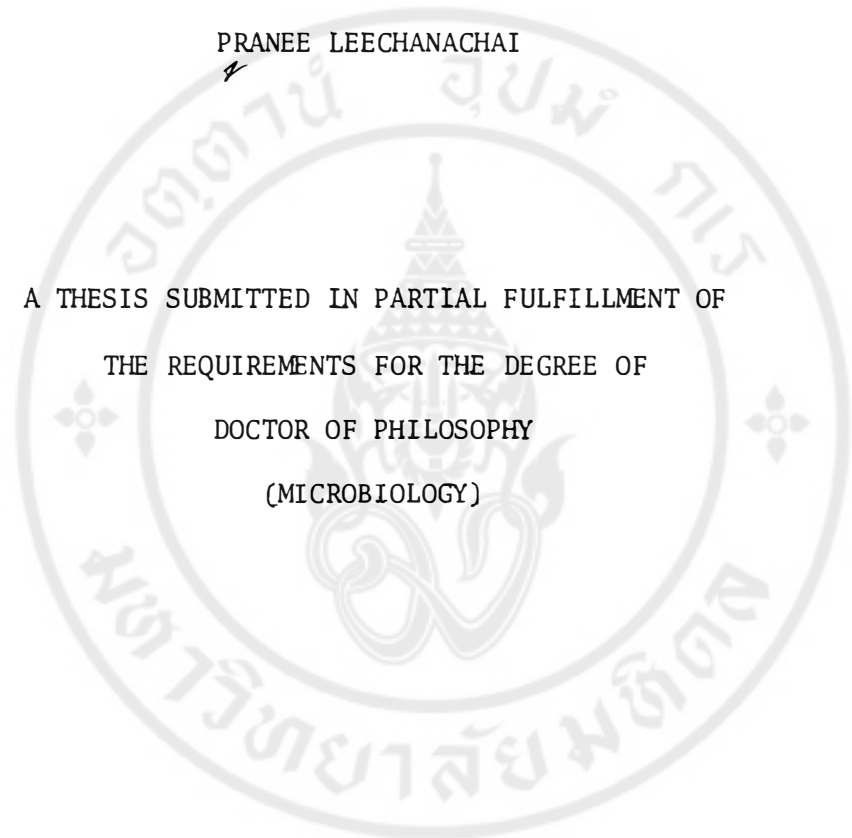
002206



CENTRAL LIBRARY
MAHIDOL UNIVERSITY
PREVALENCE OF ENTERIC CORONAVIRUS INFECTION
AMONG THAIS AND CHARACTERIZATION
OF THEIR MONOCLONAL ANTIBODIES

PRANEE LEECHANACHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)



IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1987

Copyright by Mahidol University

อธิบดีบรรณการ
จาก
สำนักวิทยบริการ ม. มหิดล

ชื่อวิทยานิพนธ์ ภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อ Enteric Coronavirus ในกลุ่มคนไทย
และลักษณะของ Monoclonal Antibodies ต่อไวรัส

ผู้วิจัย น.ส. ปราณี ลิ้นนะชัย

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

1. นายพรชัย มาตังคสมบัติ M.D., Ph.D.
2. นางชโลบล อยู่สุข ปร.ด.
3. นายสมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา Ph.D.
4. นายปีเตอร์ บิลลิง Ph.D.
5. นายประเสริฐ ทองเจริญ M.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 24 พฤศจิกายน 2530

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือต้องการตรวจหาภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อ corona-
viruses ในระบบทางเดินอาหารของคน เนื่องจากไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถเลี้ยงได้ในเซลล์
เพาะเลี้ยง จึงจำเป็นต้องหาวิธีการที่มีความไว (sensitivity) สูง และเหมาะสมเพื่อนำ
มาใช้ เทคนิคการตรวจสอบซึ่งเข้าข่ายดังกล่าวมีอยู่ 2 วิธีคือ การตรวจหา antigens ของ
ไวรัสโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการดูลักษณะรูปร่าง
ของไวรัสโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยใช้ protein A-coated grid
technique (PA-CGT) ในขั้นแรกได้นำสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นอุจจาระ มาทำการตรวจสอบโดย
ใช้ ELISA blocking test จากนั้นจึงได้ทำการสุ่มตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลลบหรือบวกมา
ทำการศึกษาโดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดังกล่าว ผลปรากฏว่า ในจำนวน

สิ่งส่งตรวจซึ่งให้ผล ELISA blocking test เป็นลบ 39 รายนั้น มี 38 ราย (97.4%)
ซึ่งยังคงให้ผลลบโดยวิธี PA-CGT ในขณะที่วิธีนี้ให้ผลบวกเพียง 26 ใน 32 ราย (81.2%)
จากจำนวนที่ผล ELISA blocking test เป็นบวกเท่านั้น จึงกล่าวได้ว่าวิธี ELISA
blocking test ดีกว่าวิธีการซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการตรวจหา coronaviruses
ในระบบทางเดินอาหาร

เมื่อทำการศึกษาวัยติการของการติดเชื้อไวรัสนี้โดยวิธี ELISA blocking test
โดยทำการศึกษาในกลุ่มประชากรซึ่งมีภูมิลำเนาอยู่ในกรุงเทพฯ และในจังหวัดขอนแก่น พบว่า
ไวรัสชนิดนี้แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในคนปกติซึ่งไม่มีอาการและในคนที่มีอาการอุจจาระร่วง ทั้งใน
เด็กและผู้ใหญ่ สำหรับในกรุงเทพฯ พบไวรัสในผู้ไม่มีอาการในอัตราที่สูงกว่าผู้ที่มีอาการอุจจาระ
ร่วง อายุเฉลี่ยที่พบมากที่สุดคือระหว่าง 1-5 ขวบ ส่วนในคนที่มีอาการอุจจาระร่วงนั้น เริ่มพบ
ไวรัสตั้งแต่ในเด็กวัยต่ำกว่า 1 ขวบ อย่างไรก็ตาม วัยติการการติดเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงไป
ตามอายุ และในผู้ไม่มีอาการบางรายนั้นสามารถตรวจพบไวรัสได้นานถึง 7 เดือน การติด
เชื้อในประชากรเด็กอายุน้อยกว่า 5 ขวบ ซึ่งอาศัยอยู่ในสลัมที่บางเขน ทั้งที่มีและไม่มีอาการ
พบในอัตราที่สูงกว่าประชากรซึ่งอาศัยอยู่ในเขตอื่น ส่วนในจังหวัดขอนแก่นนั้นวัยติการของการ
ติดเชื้อไม่ต่างกันไม่ว่าจะมีอาการหรือไม่มีอาการอุจจาระร่วงก็ตาม สำหรับวัยติการเปรียบ
เทียบระหว่างการติดเชื้อในขอนแก่นและกรุงเทพฯ นั้น ในคนปกติพบในกรุงเทพฯ มากกว่า
ส่วนในคนที่มีอาการพบวัยติการเท่ากัน

การศึกษาในกรุงเทพฯ บ่งชี้ว่าไวรัสนี้พบน้อยในกลุ่มคนที่มีฐานะทางสังคมและเศรษฐกิจ
ต่ำ กลุ่มนี้พบการติดเชื้อปาราไลติมากกว่า ส่วนการติดเชื้อร่วมกับ Rotavirus แบคทีเรีย
หรือเชื้ออื่น ๆ ไม่มีผลต่อการปล่อยเชื้อไวรัสนี้ออกมาในอุจจาระ

นอกจากนี้ยังได้ทำการผลิตและหาคู่สมมติของ monoclonal antibodies ต่อ
enteric coronavirus ของคน (HECV-Ric13) และของวัว (BCV-F16)
hybridomas ซึ่งผลิต antibodies ต่อ HECV-Ric13 มีทั้งหมด 12 clones ในจำนวน
นี้ 10 clones สร้าง antibodies ซึ่งทำปฏิกิริยาได้กับ capsid protein ขนาด 55K
อีก 2 clones สร้าง antibodies ซึ่งทำปฏิกิริยาได้กับ protein ซึ่งประกอบเป็น peplomer

ของไวรัส antibodies เหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ BCV-F16 เช่นกัน ส่วน clone ที่สร้าง monoclonal antibody ต่อ BCV-F16 ได้มาเพียง 1 clone เท่านั้น clone นี้ ให้ antibody ซึ่งทำปฏิกิริยาได้กับ capsid protein ขนาด 55K ของ BCV-F16 และ HECV-Ric13 ด้วย monoclonal antibodies เหล่านี้อาจมีประโยชน์ในแง่การใช้เป็นตัวตรวจสอบ (probe) สำหรับ enteric coronaviruses หรือใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไวรัส



Copyright by Mahidol University

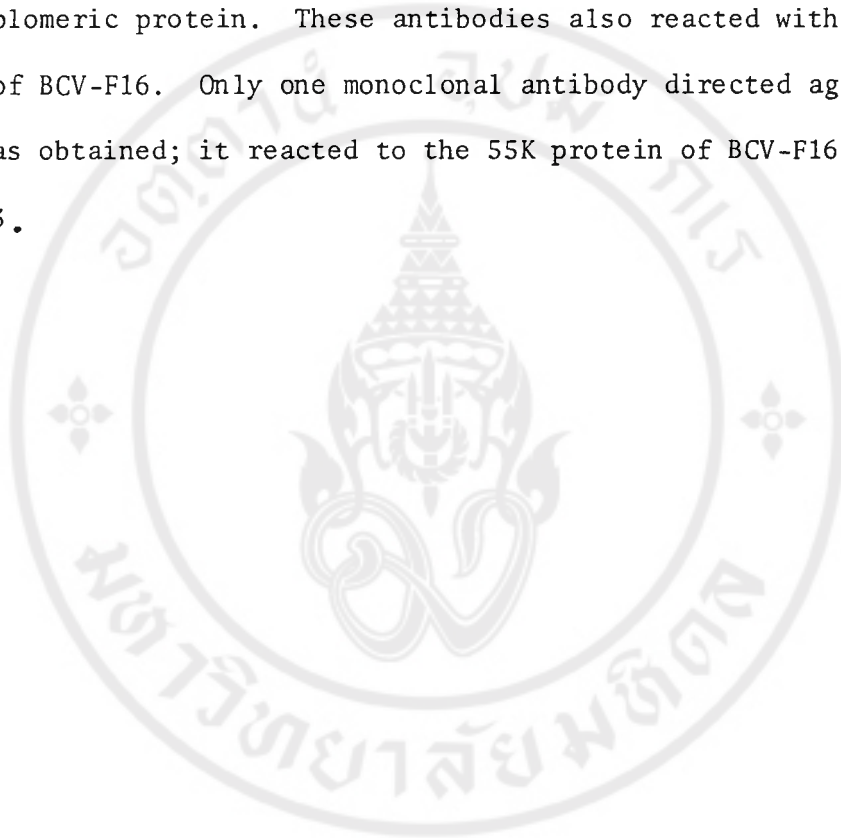
of 32 (81.2%) ELISA blocking test positive specimens. ELISA blocking test was superior to PA-CGT for detecting human enteric coronaviruses.

The prevalence of enteric coronavirus infection, among the Thai populations in Bangkok and Khon Kaen province, was then studied using the ELISA blocking test. The results indicated that coronaviruses were present in fecal samples from both children and adults with or without diarrhea. It is interesting to note that, in Bangkok, the viruses were more frequently observed in the apparently healthy individuals (8.59%) than in the patients with diarrhea (2.56%). Among non-diarrheal populations, coronaviruses were frequently observed in stools from children over one year of age and adults but not in children aged less than one year whereas in patients with diarrhea coronavirus infection started in the early neonatal life. The rate of coronavirus excretion in both groups did not increase with age and some apparently healthy subjects excreted the viruses in the feces for at least seven months. The results also suggested that chronic parasitic infection but not rotavirus and/or bacterial infections of the enteric tract might influence excretion of enteric coronaviruses in the feces. Moreover, the presence of coronaviruses in the normal population may be responsible for a long term silent infection of the enteric tract and chronic infection possibly ensued.

Monoclonal antibodies against human enteric coronaviruses (HECV-Ric13) and bovine enteric coronavirus (BCV-F16) were obtained and characterized by SDS-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) of the immunoprecipitates derived from reaction between these antibodies

Copyright by Mahidol University

and ^{125}I -labeled purified HECV-Ric13 and BCV-F16 which contained five polypeptides of molecular weights 98K, 63K, 55K, 47K and 22K. Twelve clones of the hybridomas secreting antibodies against HECV-Ric13 were obtained. Among these, 10 monoclonal antibodies reacted to the 55K capsid protein while the other two reacted to the high molecular weight peplomeric protein. These antibodies also reacted with the proteins of BCV-F16. Only one monoclonal antibody directed against BCV-F16 was obtained; it reacted to the 55K protein of BCV-F16 and HECV-Ric13.



Copyright by Mahidol University