



How were viruses discovered, identified, and characterized using classical technique?

พิไลพันธ์ พุฒวันนะ

สมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย)

ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม และ ชีวการแพทย์สารสนเทศ

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

31 กรกฎาคม 2567

Key lessons from COVID-19 for preparedness
against influenza and emerging viruses
S.D. Avenue hotel

We know about diseases before knowing the causative agents.



Ramses or Rameses V



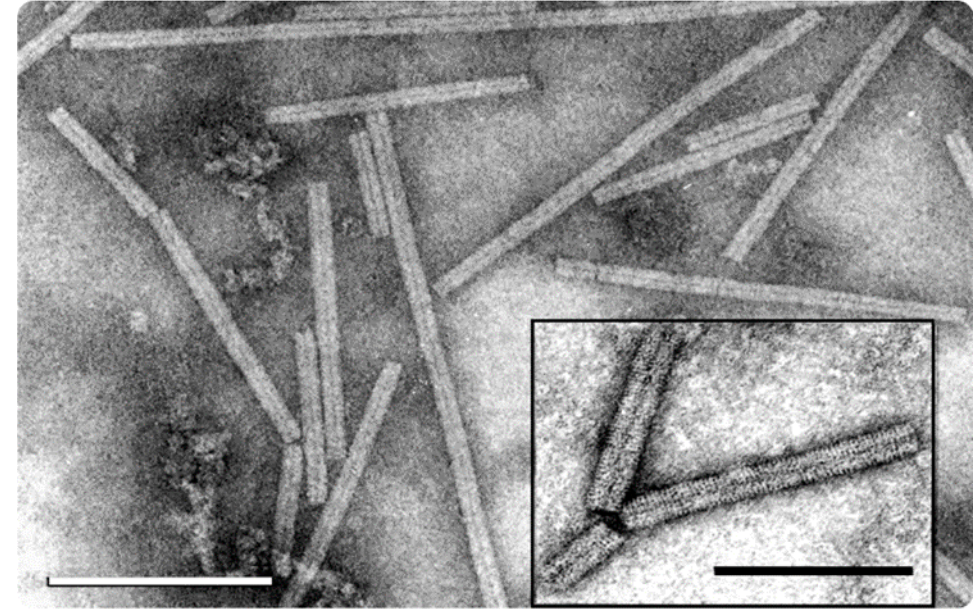
Baghdad, A.D. 1224

<http://www.asia.si.edu/collections/singleObject.cfm?ObjectNumber=F1953.91>

Pre-historic viral diseases: Smallpox, polio, rabies



Tobacco mosaic virus (TMV), once a serious disease of burley, rarely occurs in fields now since many varieties have excellent resistance. The most notable symptom of this disease is the mosaic of dark and light green areas on foliage. TMV is easily transmitted from plant to plant by mechanical means (e.g., worker's hands, cultivation, etc.). (Photo: Kenneth Seebold)

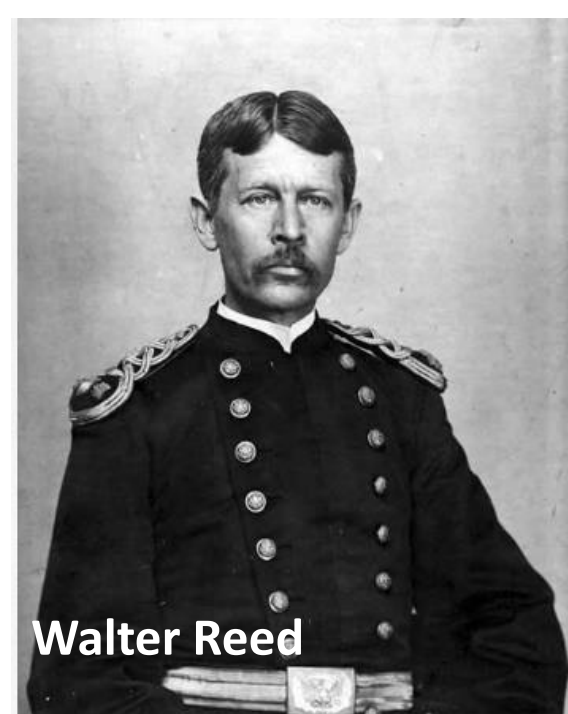


ICTV

Tobacco mosaic virus, the first known virus, was discovered in 1892 by Ivanofsky and Beijerinck.

Virus (ไวรัส) means poison or slimy liquid in Latin.

The virus particles were seen by electron microscopy in 1930s.



Walter Reed

ไวรัสก่อโรคในคนตัวแรกที่เราพบ คือ Yellow fever virus

- มีการกล่าวถึงเป็นครั้งแรกเมื่อกลางศตวรรษที่ 16 ใน Yucatán เม็กซิโก ทาสที่ติดเชื้อไวรัสถูกนำจากแอฟริกาขายทางโลกตะวันตก และทำให้เกิดการระบาดของโรคไข้เหลืองขึ้นประมาณปี 1648
- สามารถแยกเชื้อ YFV ได้ในปี 1927

- Finlay ซึ่งเป็นแพทย์ชาวคิวบาสันนิษฐานว่าการติดต่อของโรคเกิดจากการถูกยุงกัดไม่ใช่จากการสัมผัสโดยตรง แต่ Walter Reed เป็นผู้พิสูจน์ทฤษฎีนี้โดยทดลองให้ยุงที่ติดเชื้อมัดอาสาสมัคร ผลที่ได้ก็คือ ผู้ร่วมงานชื่อ Carolls ป่วย แต่ Lazear มีอาการรุนแรงจนถึงชีวิต
- โรคนี้มี *Aedes aegypti* เป็นยุงพาหะ เป็นโรคประจำถิ่นของแอฟริกาและอเมริกาใต้ มีอัตราตาย 20-60%.



Methods of virus discovery

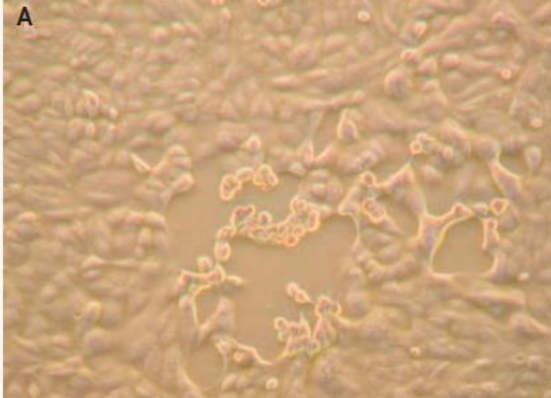
- Viral isolation and identification
- Electron microscopy
- Histo/cytopathology
- Nucleotide sequencing
- Seroarcheology
- Virus recovering



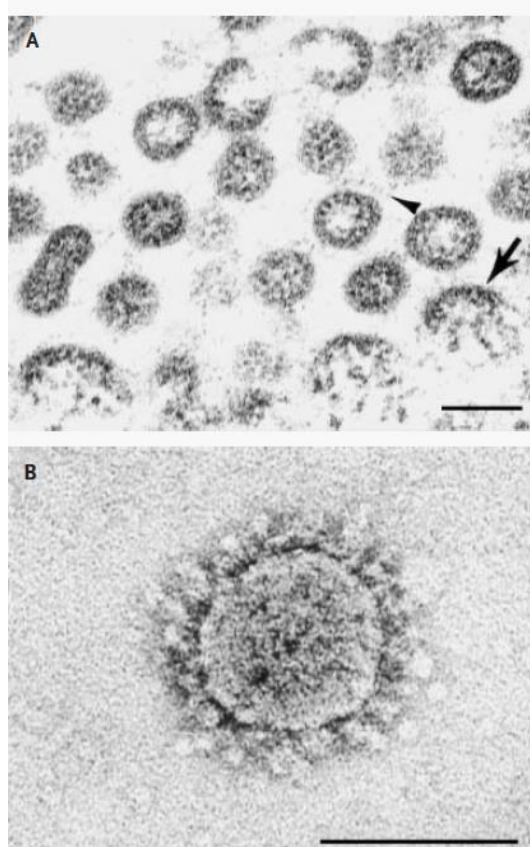
SARS coronavirus-1

- โรค severe acute respiratory syndrome (SARS) เป็นโรคทางเดินหายใจที่เป็น zoonotic disease มีค้างคาวเป็นรังโรค มีสาเหตุเกิดจาก SARS coronavirus-1
- ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง และบางรายกลายเป็นปอดบวมรุนแรง หายใจลำบาก (ARDS)
- โรคน่าจะเกิดในจีนตอนใต้ตั้งแต่ปลายปี 2002 และมีรายงานครั้งแรกในเดือน ก.พ. 2003 โดยแพทย์ที่ติดเชื้อจากผู้ป่วยเมืองกวางตุ้งนำเชื้อมาส่งฮ่องกงก่อนที่จะแพร่ต่อๆกันไป 29 ประเทศในโลก ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในเอเชีย **Malik Peiris, Univ of Hong Kong** เป็นคนแรกที่ค้นพบไวรัสนี้
- เมื่อโรคสงบพบว่ามีรายงานผู้ป่วยประมาณ 8469 คน อัตราตาย 10-11% ไม่พบผู้ป่วยอีกเลยหลังจากการระบาดเล็กน้อยในปี 2004 สิ้นสุดลง
- ประเทศไทยรายงาน probable cases 9 ราย ตาย 2 ราย

Discovery of SARS coronavirus 2003



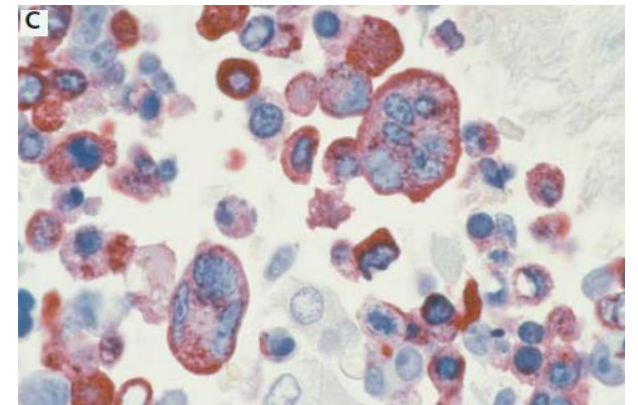
CPE of Vero E6 inoculated with respiratory sample



Morphology and size of virus particles in culture fluid are suggestive of coronavirus.

- Identify by immunofluorescence staining with antiserum against animal coronavirus
- RT-PCR using ORF 1b (pol) primers
- Nucleotide sequencing of PCR products of 405 nucleotides in length

The virus isolate was used to prepare antigens for antibody testing by indirect IF and ELISA



Immunohistochemical staining of lung tissue

Ksiazek, et al.
N Eng J Med 10 Apr 2003



Dr.Carlos Urbani

- Index case ที่ติดเชื้อจากฮ่องกงนำโรคมาแพร่ระบาดรุนแรงที่เวียดนาม
- Dr.Carlos Urbani แพทย์ชาวอิตาลีซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ของ WHO ประจำเวียดนามได้ร่วมทำการสืบสวนโรค และติดเชื้อ
- Dr.Urbani เริ่มมีอาการระหว่างการบินมาที่กรุงเทพ จึงได้แจ้งให้สาธารณสุขไทยทราบล่วงหน้า และถูกรับตัวจากเครื่องบินไปเข้าทำการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูรจนกระทั่งเสียชีวิต



Influenza virus discovery

- โรคไข้หวัดใหญ่เป็นโรคเก่าแก่ Hippocrates ได้อธิบายอาการที่น่าจะเป็นโรคไข้หวัดใหญ่ไว้ตั้งแต่ 412 ปีก่อนคริสตกาล แต่ pandemic flu ถูกบันทึกไว้เป็นครั้งแรกในปี 1580
- สามารถแยกเชื้อ swine influenza virus ได้ในปี ค.ศ. 1930s (Sw/Iowa/30)
- สามารถเพาะเชื้อ human influenza virus ได้โดยใช้ไข่ฟักในปี ค.ศ. 1933 (2476) ทำให้สรุปได้ว่าโรคไข้หวัดใหญ่นั้นมีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อไวรัส ไม่ใช่แบคทีเรีย *Haemophilus influenzae* (*Bacillus influenzae*) ซึ่งนำไปสู่การผลิตวัคซีนในปี 1942 ในที่สุด



Influenza pandemics

Virus isolation since 1933

Asian flu H2N2 in 1957 (mortality 0.02-0.05%)

Hong Kong flu H3N2 in 1968 (mortality 0.03%)

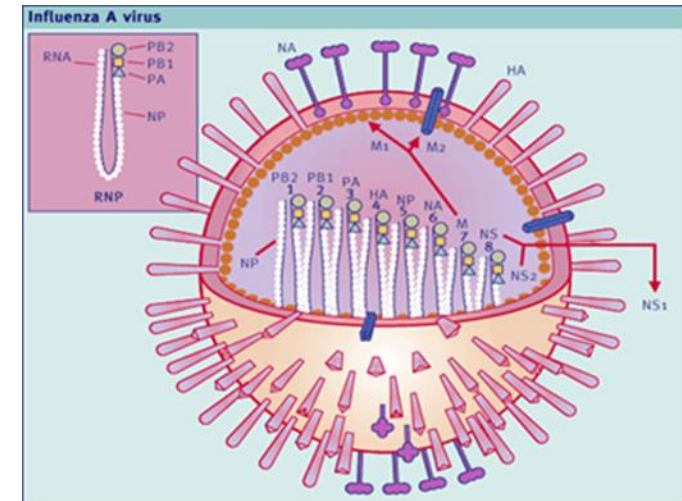
Pandemic A/H1N1 in 2009 (mortality 0.001-0.007%)

Seroarchaeology

1889-1898 Asiatic (Russian) flu A(H2N2)

1899-1917 A/H3N8

Spanish flu H1N1 in 1918 (mortality 1-3%)



Fields Virology. Third edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia

Spanish flu, the pandemic of legend



Spanish flu (Feb 1918- Apr 1920), the mother of all pandemics.
It was the most virulent pandemic flu in human history.

It did not originate in Asia, not in Spain, but probably in Kansas, U.S.

It was the ancestor of swine flu virus.- human to pig transmission?



Crowded conditions and the movement of troops during World War I likely contributed to the spread of the 1918 virus around the world. (Photo credit: www.museumsyndicate.com/item.php?item=56784#)

Recovering the Spanish flu virus

- 1918 – Deaths of 72 of 80 villagers in 5 days
- 1951 Johan Hultin, a 25 yr old-Swedish microbiologist and Ph.D. student at Univ. of Iowa และคณะ เดินทางไป Brevig Mission เพื่อเก็บชิ้นเนื้อปอด
- Hultin พยายามแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อปอดของผู้เสียชีวิต 4 ราย โดยใช้วิธีแยกเชื้อในไข่ฟัก แต่ไม่ประสบความสำเร็จ



Mass grave of Inuit natives at Brevig Mission, Alaska



Johan Hultin

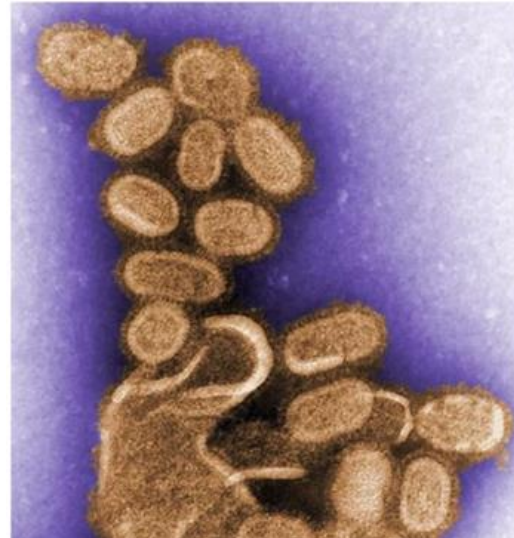
- ในปี 1997 Taubenberger และคณะ จาก Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. ตีพิมพ์ผลงานการค้นพบชิ้นส่วนของ viral genome ใน formalin fixed tissues ของทหารรายหนึ่งซึ่งเสียชีวิตในปี 1918
- Hultin, a retired pathologist ในวัย 72 ปีกลับไป Brevig Mission อีกครั้งเพื่อเก็บชิ้นเนื้อปอด
- จากชิ้นเนื้อของผู้หญิงชาวอินู (Inuit) Taubenberger และ Ann Reid ได้พบ viral genomes และ รายงานการพบ complete viral genome ในปี 2005.



Hultin at the Brevig Mission gravesite in 1997, 46 yrs after his attempt to rescue viruses.



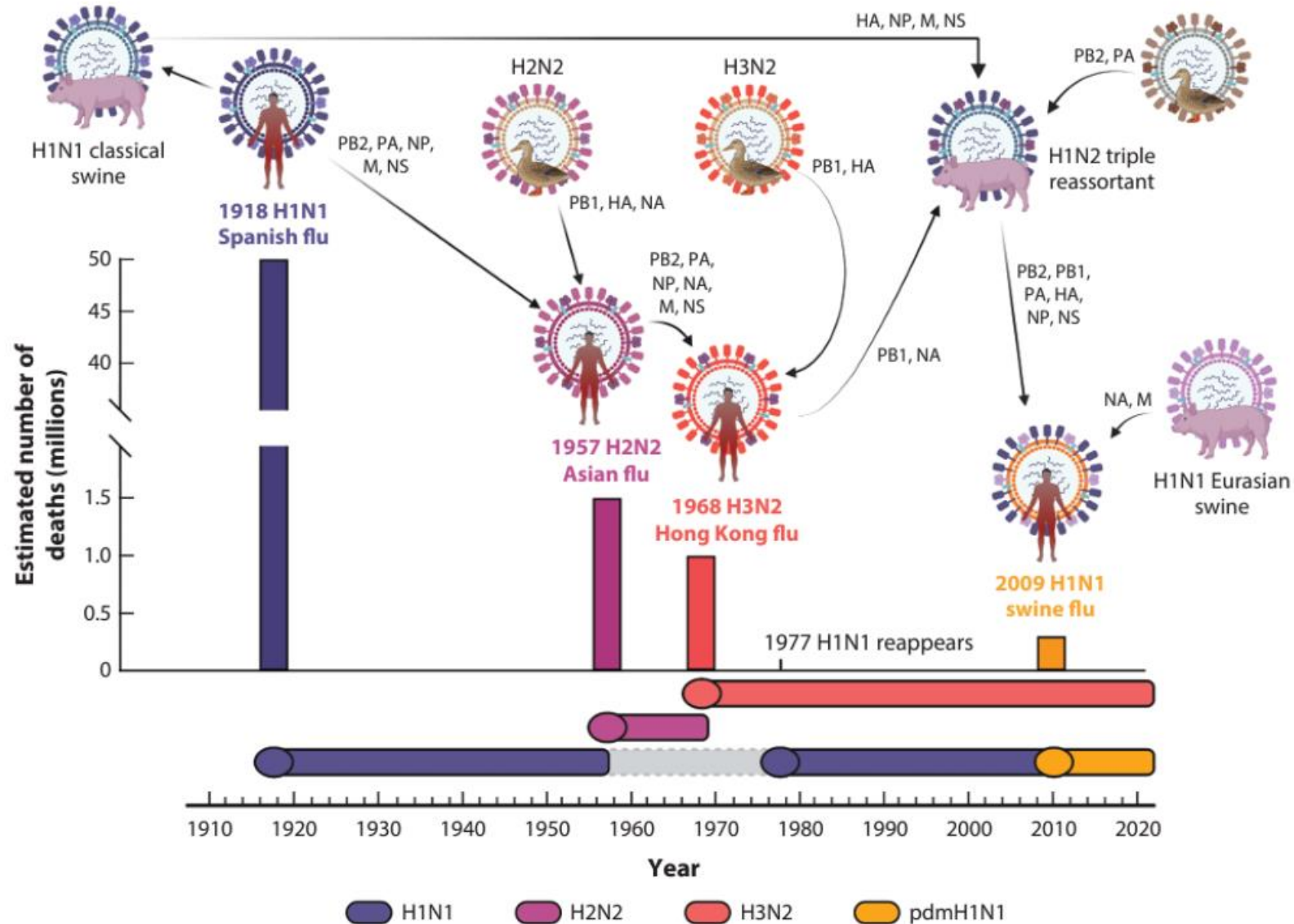
- Peter Palese และ Adolfo Garcia-Sastre, Mount Sinai School of Medicine, NYC ทำการสร้าง complete recombinant plasmids โดยใช้ reverse genetics technique
- Tumpey at CDC recovered the virus in July-August 2005 ใน BSL3 enhanced laboratory



A/Brevig Mission/1/18 (H1N1)

The 1918 virus
C. Goldsmith. CDC Public Health Library

Spanish flu virus, the mother of all pandemics



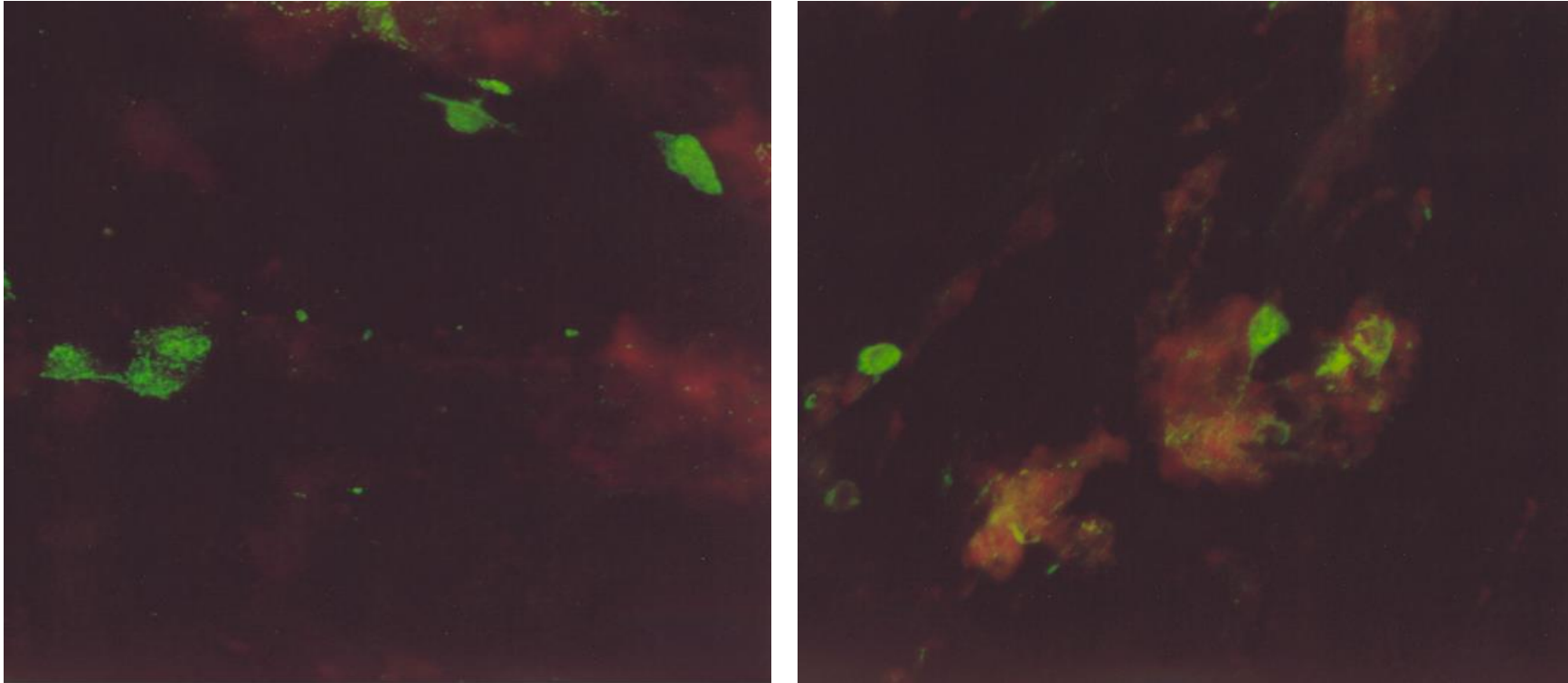


Avian influenza or bird flu (ไข้หวัดนก)

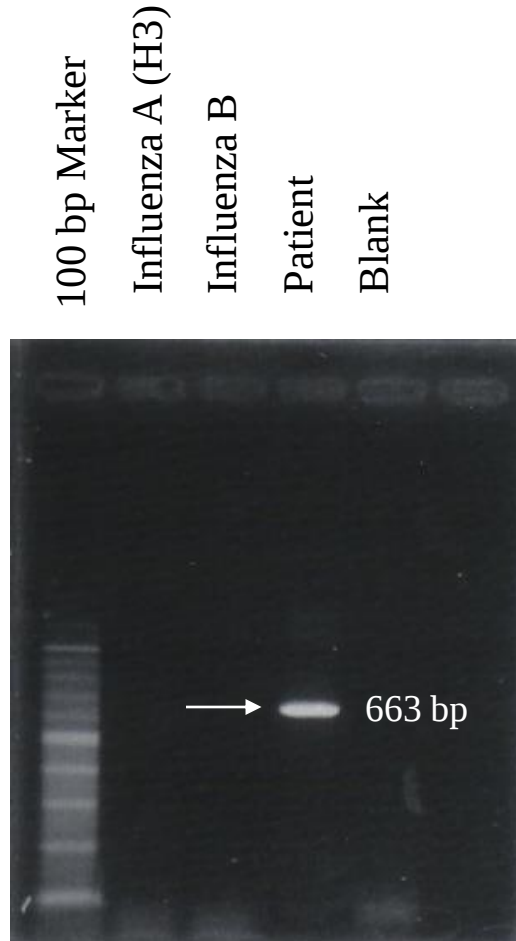
- โรคไข้หวัดนกซึ่งทำให้สัตว์ปีกล้มตายเป็นจำนวนมากเรียกว่า fowl plaque การระบาดของโรคมีบันทึกเป็นครั้งแรกในอิตาลี ในปี 1878 และต่อมา fowl plaque ได้รับชื่อใหม่ว่า highly pathogenic avian influenza (HPAI).
- H5N1 HPAI virus ถูกแยกได้ตั้งแต่ปี 1959
- การระบาดของ H5N1 HPAI ในปัจจุบัน เกิดขึ้นเป็นวงกว้างใน 5 ทวีป ในสัตว์น้ำ ร้อย species มีความรุนแรงอย่างที่ไม่เคยเกิดขึ้นมาก่อนในอดีต อาจเรียกว่าเป็น panzootic หรือ pandemic ของสัตว์
- การติดเชื้อ H5N1 ในคนมีรายงานเป็นครั้งแรกที่ฮ่องกงในปี 1997 มีผู้ติดเชื้อ 18 ราย เสียชีวิต 6 ราย (อัตราการตาย 33.3%)



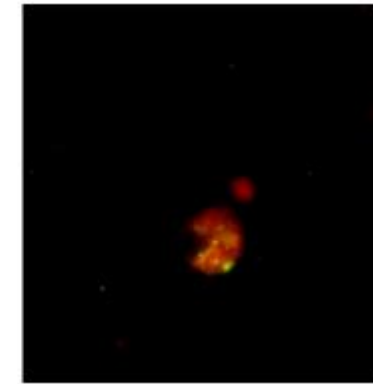
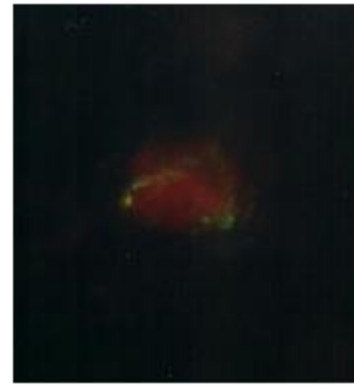
Discovery of H5N1 HPAI virus in Thailand in December 2002



Endotracheal cell smears from chicken stained with flu A Ab

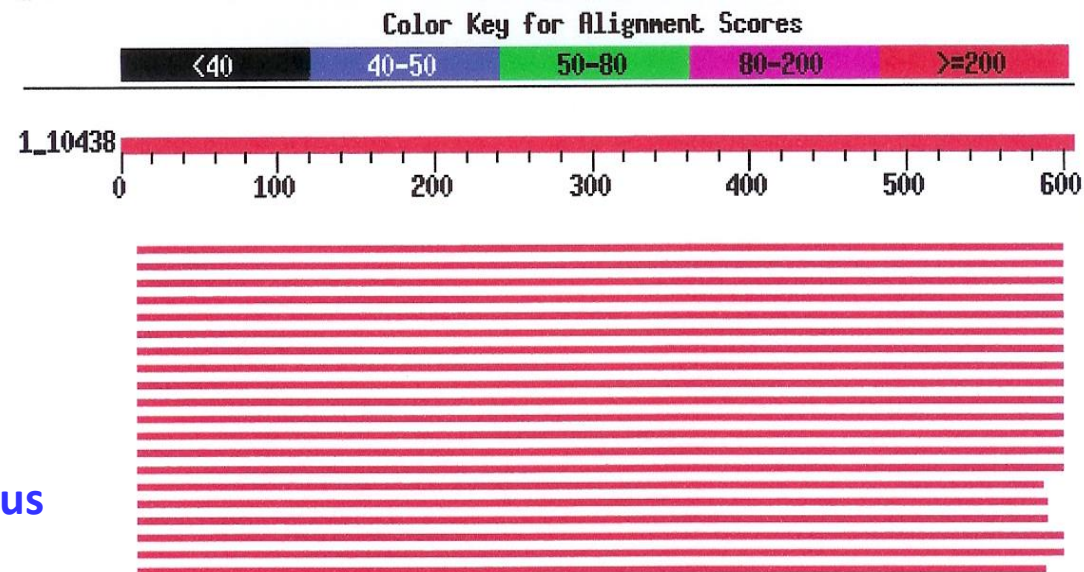


Conventional RT-PCR for H5
Using WHO primers for 1997 virus



Epithelial cells from NP wash of the patient stained with FluA Ab

BLAST of sequence of 606 nucleotides in *HA* gene



H5N1 : AY075030
H5N1 : AY075027
H5N1 : AF098545
H5N1 : AF216737
H5N1 : AF216721
H5N1 : AY075033

Discovery of the first H5N1 patient at Siriraj Hospital
(The second case of Thailand), January 2003



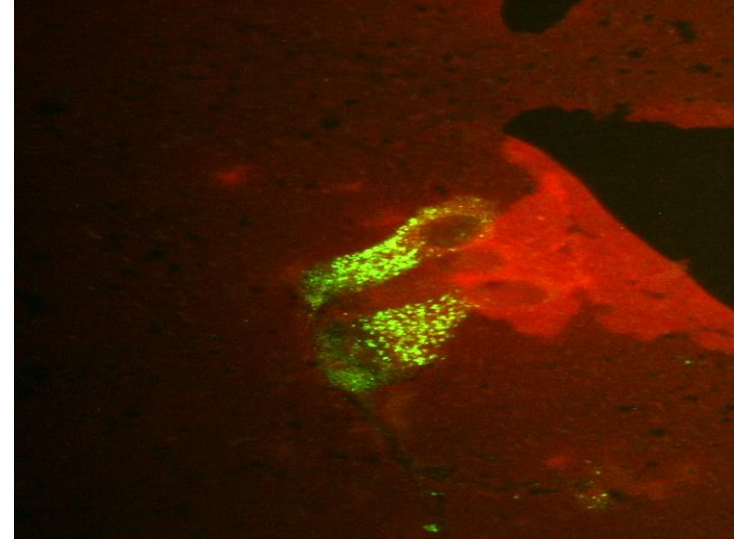
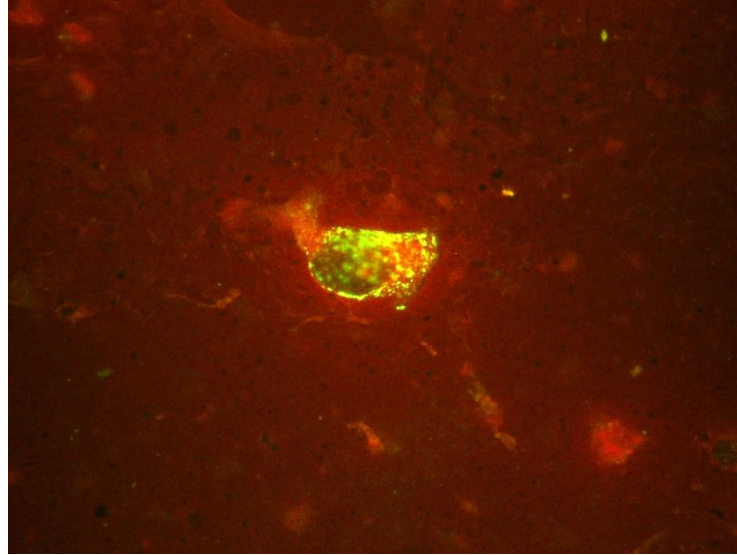
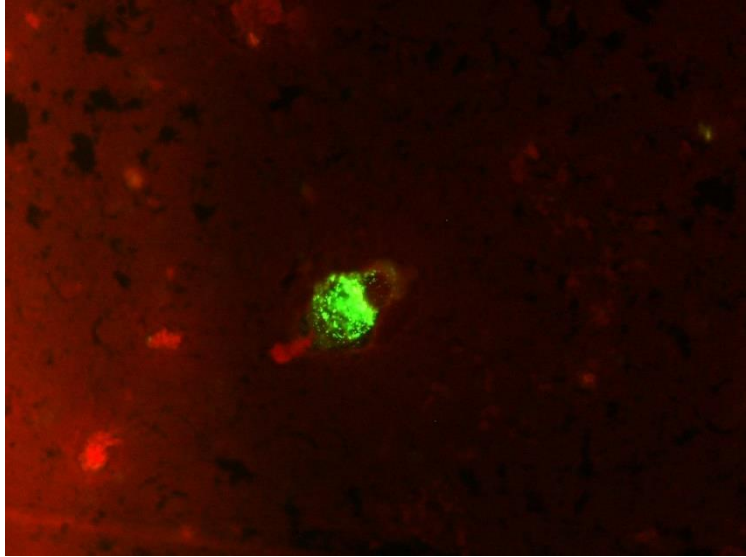
Laboratory investigation of the last H5N1 AI case of Thailand, Jul-Aug 2006

- RT-PCR yielded negative results using respiratory samples from this patient for about 9 times. The patient received oseltamivir treatment 2 days before specimen collection.
- H5N1 AI was laboratory confirmed in specimens collected at autopsy.

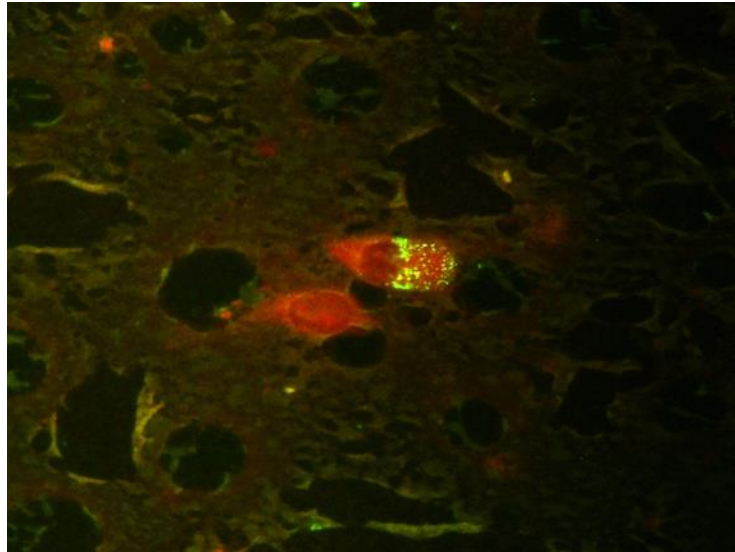
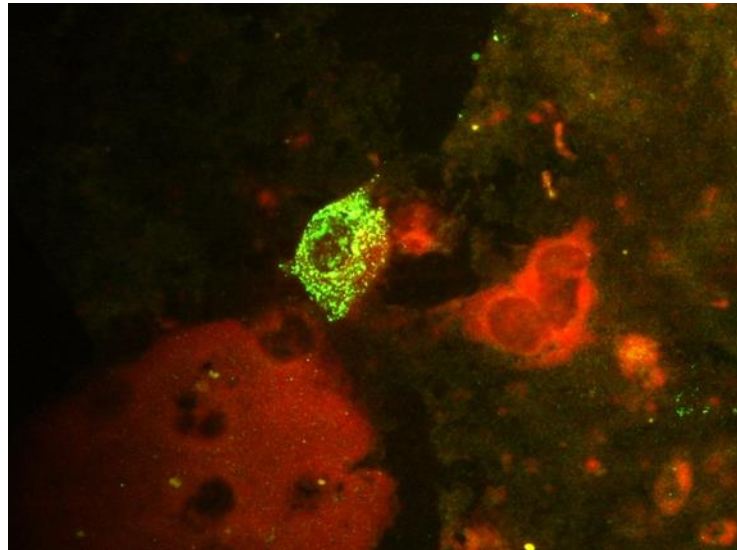
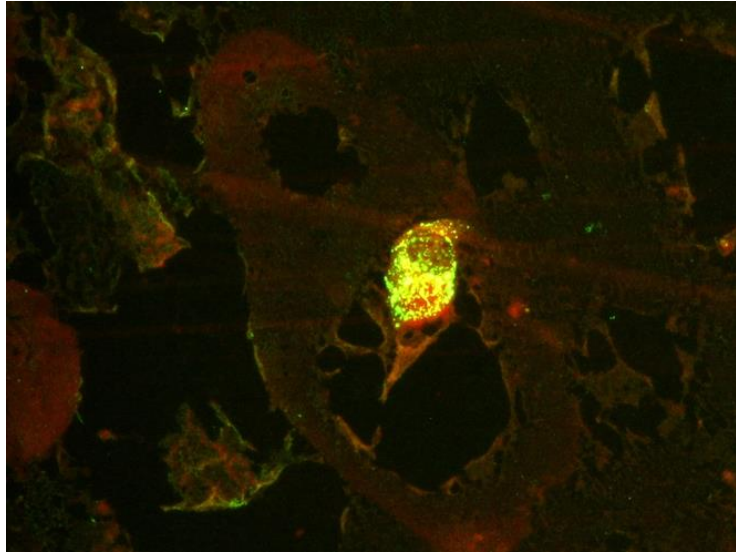
Discovery of the last H5N1 AI case of Thailand by indirect IF staining of autopsy tissues using fluA MAbs



Lung



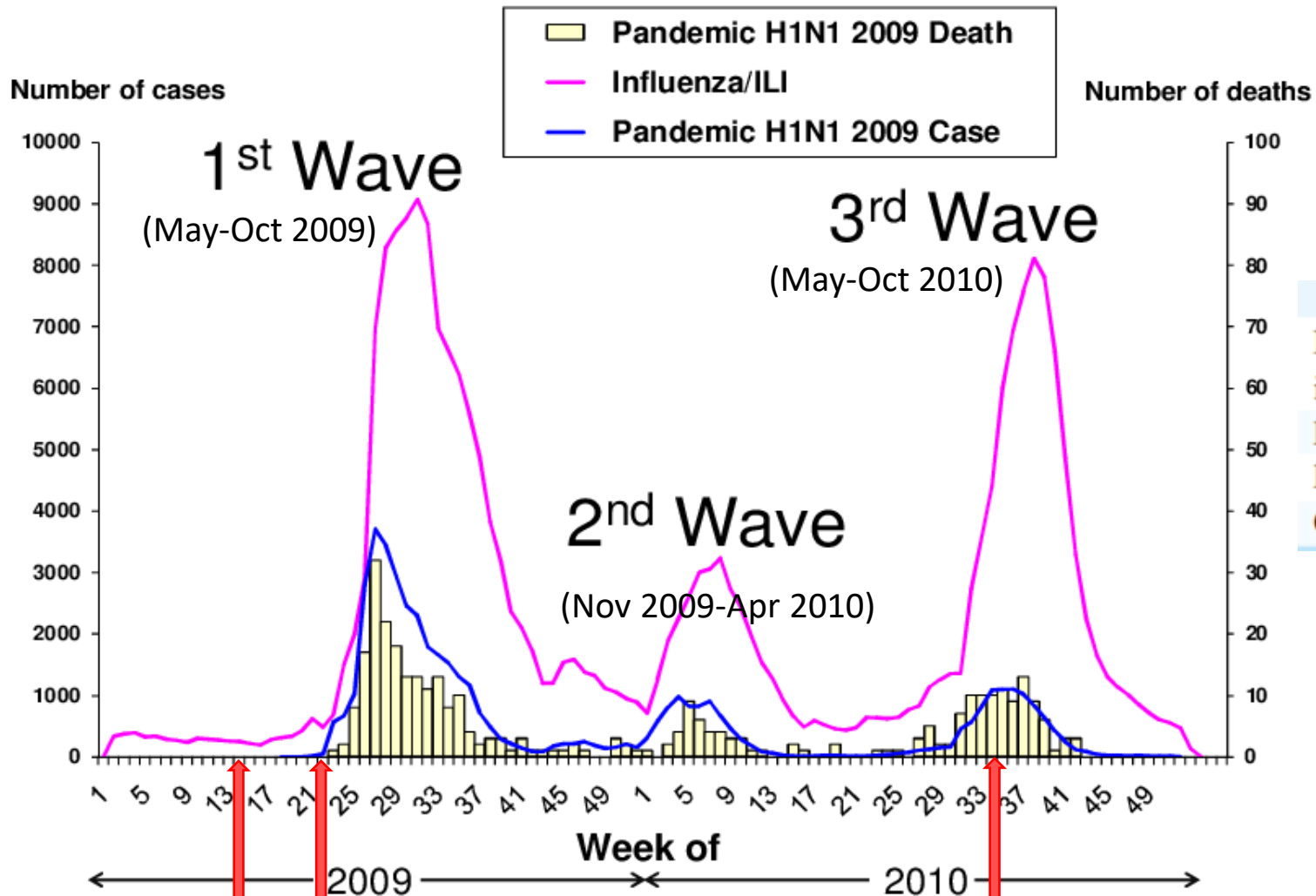
Trachea





Conclusion to discovery of the last H5N1 AI case

- RT-PCR yielded inconclusive results of all organ tissues investigated.
- Neutralizing antibody titers < 10 in paired blood
- Positive IF staining for nucleoprotein Ag of flu A
- Of all autopsy tissues investigated, the virus isolates were obtained from only 3 kinds of clinical specimens
 - A/Thailand/NBL1/2006-L from lung
 - A/Thailand/NBL1/2006-T from trachea
 - A/Thailand/NBL1/2006-F from intestinal fecal specimen
- Complete genome sequences of the virus isolates by Sanger method, and of paraffin embedded tissues by NGS



25 Apr 2009: WHO announced Public Health
Emergency of International Concern.

11 Jun 2009: WHO announced the pandemic phrase of H1N1.

10 Aug 2010: WHO announced a post-pandemic phase.

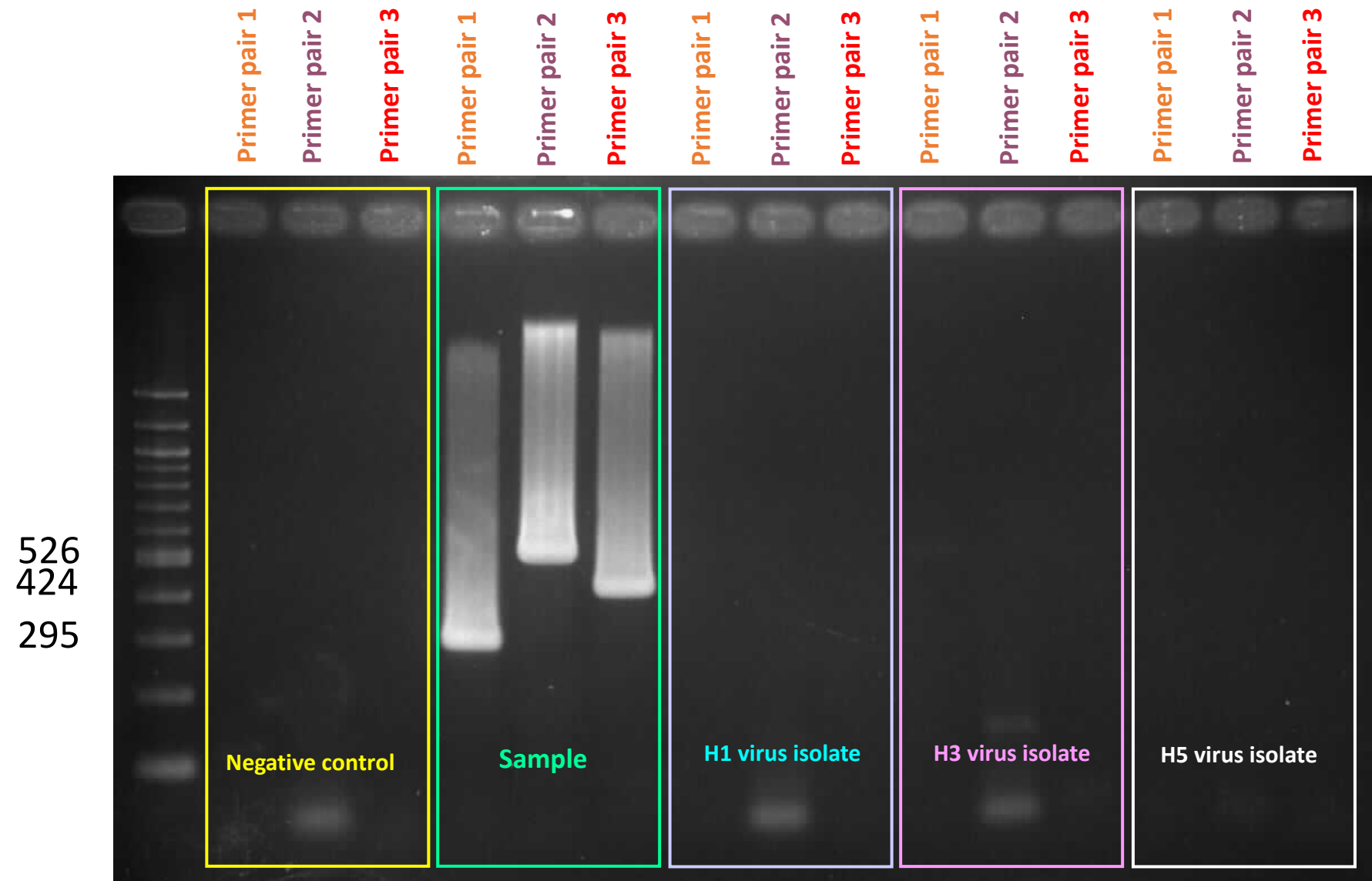
Pandemic H1N1 2009 in Thailand

	2009	2010
Influenza-like illness and other influenza subtypes cases	102,400	113,831
Pandemic H1N1 cases	30,956	16,455
Pandemic H1N1 deaths	197	150
Case fatality ratio	0.19%	0.13%

Iamsirithaworn S, et al. Siriraj Med J 2011;63:64-67



RT-PCR result of the first imported case of pandemic flu A (H1N1) 2009





Electron microscopy: A tool for discovery of uncultivable viruses

- **Rotavirus**: The virus particles were detected in cytoplasm of intestinal epithelial cells from a biopsied tissue of a child by Ruth Bishop, et al. in 1973.
- **Human papillomavirus** was first identified in 1949 by Strauss et al., but zur Hausen used DNA cloning technique to discover the association of HPV with cervical cancer.



Virus characterization

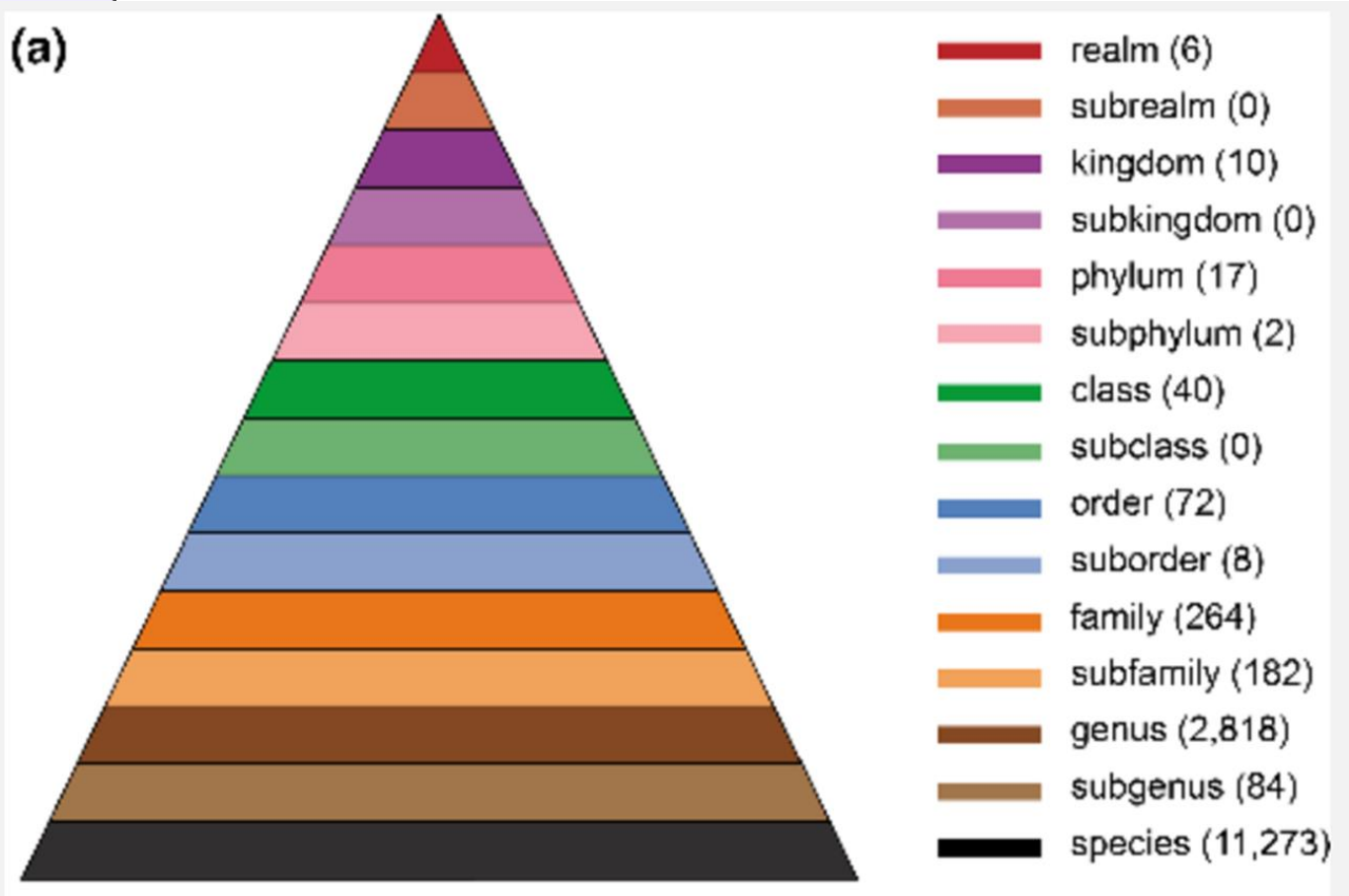
- Host-range
- Appearance of cytopathic effect, growth rate
- Cytopathology, pathogenesis
- Other biological properties: hemagglutination/hemagglutination
- Plaque formation: morphology, size
- Enveloped/non-enveloped
- Genome: DNA or RNA, linear, segmented, length
- Antigenic, serotypic/genotypic characterization
- Virulence markers
- Antiviral drug susceptibility



Can “Next Generation Sequencing” replace virus isolation method?

Taxonomic Level	Suffix
Realm	-viria
Subrealm	-vira
Kingdom	-virae
Subkingdom	-virites
Phylum	-viricota
Subphylum	-viricotina
Class	-viricetes
Subclass	-viricetidae
Order	-virales
Suborder	-virineae
Family	-viridae
Subfamily	-virinae
Genus	-virus
Subgenus	-virus

Virus taxonomy



Siddel, et al. J Gen Virol 2023: 104, issue 5.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001840>

