

**DEVELOPMENT OF SEROTYPING-NS1-ELISA FOR
IDENTIFICATION OF DENGUE SEROTYPES**



NATHAPORN U-THAINUAL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2011**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

DEVELOPMENT OF SEROTYPING-NS1-ELISA FOR IDENTIFICATION OF DENGUE SEROTYPES

NATHAPORN U-THAINUAL 4937140 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHUNYA PUTTIKHUNT, Ph.D., PRIDA MALASIT, M.D., F.R.C.P.

ABSTRACT

Dengue haemorrhagic fever (DHF), caused by dengue virus (DENV) infection, is one of the public health problems in Thailand and regional regions. Four serotypes of DENV are co-circulated in endemic areas. Early detection of DENV infection can be done by time-consuming virus isolation, sophisticated RT-PCR and NS1 antigen assay. The first two methods are also able to identify DENV serotype.

This study aimed to develop a new serotyping assay based on NS1 capture ELISA, designated as “a serotyping-NS1-ELISA”, by using serotype-specific anti-NS1 monoclonal antibodies (Mabs). Since anti-NS1 Mabs to DENV1, DENV2, and DENV4 have been previously generated, at first, we then generated anti-NS1 Mabs specific to DENV3 in this study. The immuno-affinity purified NS1 protein of DENV3 was used to immunize BALB/c mice. After three-performed fusions and screening, 10 hybridoma clones producing anti-NS1 Mabs to DENV3 were finally obtained. The generated anti-NS1 Mabs can be divided into 2 groups. One is a cross-reactive group that contained 2 Mabs (D3NS1-5F3, D3NS1-381), which are reactive to DENV1 and DENV3, IgG1 isotype, and recognize to linear epitopes. The other is a DENV3-specific group that contained 8 Mabs (D3NS1-7, D3NS1-46, D3NS1-95, D3NS1-37, D3NS-101, D3NS1-177, D3NS1-189, and D3NS1-239), which are IgG2b isotype and recognize conformational epitopes.

All anti-NS1 Mabs to four DENV serotypes were selected for serotype-specificity based on NS1 capture ELISA. Two anti-NS1 Mabs specific for each serotype that gave highest serotype-specific reactivity were scaled-up, purified, and applied to the same assay. Finally, one serotype-specific anti-NS1 Mab from each serotype was chosen as a detection antibody to develop a serotyping-NS1-ELISA (i.e., D1NS1-84, D2NS1-3D1, D3NS1-46, and D4NS1-4). The optimal concentration of those Mabs in the assay was 25 µg/ml. Detection limits of the serotyping-NS1 assay for DENV1 to DENV4 were 4.4, 15.8, 2.9, and 1.7 ng/ml, respectively. The developed assay could correctly identify NS1 of four DENV serotypes which derived from infected Ps clone D, HEK 293T, and C6/36 cells. In infected Vero cells, the assay can identify NS1 of DENV1, DENV2, and DENV4, but not DENV3. Evaluation of the serotyping-NS1-ELISA should be further performed in clinical samples. This study has demonstrated that it is possible to utilize dengue NS1 specific Mabs to developed ELISA that is capable of identifying and quantifying DENV serotypes.

KEY WORDS: DENGUE VIRUS (DENV)/ NS1 / SEROTYPING / ELISA / MONOCLONAL ANTIBODIES

88 pages

การพัฒนาชุดตรวจ Serotyping-NS1-ELISA เพื่อใช้ในการแยกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกี
DEVELOPMENT OF SEROTYPING-NS1-ELISA FOR IDENTIFICATION OF DENGUE SEROTYPES

ณัฐพร อุทัยนวล 4937140 SIIM/M

วท.ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชัญญา พุทธิจันทร์, Ph.D., ปรีดา มาลาสิทธิ์, พ.บ., F.R.C.P.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันโรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ยังคงพบได้ในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี ซึ่งมีทั้งหมด 4 ซีโรทัยป์ วิธีตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นทำได้โดยวิธี การแยกไวรัสจากสิ่งส่งตรวจ การตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี RT-PCR และการตรวจหาโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกี ซึ่ง 2 วิธีแรกสามารถใช้ตรวจแยกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกีได้ด้วย

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจแยกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกีจากโปรตีน NS1 ด้วยวิธี NS1-capture ELISA ซึ่งเรียกว่า serotyping-NS1-ELISA โดยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 (anti-NS1 Mab) ที่จำเพาะต่อแต่ละซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกี เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยได้เคยผลิต anti-NS1 Mab ต่อซีโรทัยป์ 1, 2 และ 4 มาก่อนแล้ว ใน การศึกษานี้ จึงได้ทำการผลิต anti-NS1 Mabs ต่อซีโรทัยป์ 3 โดยใช้โปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกี 3 เป็นแอนติเจนในการฉีดหนู หลังจากการทำ fusion และคัดแยกโคลน hybridoma ผู้วิจัยสามารถผลิต anti-NS1 Mab ต่อซีโรทัยป์ 3 ได้ 10 Mabs ซึ่งแบ่งได้ เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีจำนวน 2 Mabs (D3NS1-5F3 และ D3NS1-381) สามารถทำปฏิกิริยาข้ามได้กับทั้งซีโรทัยป์ 1 และ 3 เป็น แอนติบอดีชนิด IgG1 และจำเพาะกับอีพิโทปสายตรง กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 8 Mabs (D3NS1-7, D3NS1-46, D3NS1-95, D3NS1-37, D3NS-101, D3NS1-177, D3NS1-189, and D3NS1-239) ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับซีโรทัยป์ 3 เป็นแอนติบอดีชนิด IgG2b และจำเพาะกับอีพิโทปที่มีการพับงอ

จากการตรวจหาความจำเพาะของ anti-NS1 Mabs ต่อแต่ละซีโรทัยป์ จากแอนติบอดีทั้งหมดที่มีอยู่โดยวิธี NS1 capture ELISA ผู้วิจัยได้เลือก anti-NS1 Mabs ที่จำเพาะต่อแต่ละซีโรทัยป์มาอย่างละ 2 ชนิด มาทำการเพิ่มจำนวน แยกบริสุทธิ์ และทดสอบโดยวิธีเดิม ในที่สุดได้คัดเลือก anti-NS1 Mab อย่างละ 1 ชนิดสำหรับแต่ละซีโรทัยป์ ได้แก่ D1NS1-84, D2NS1-3D1, D3NS1-46 and D4NS1-4 เพื่อเป็น detection antibody ในการพัฒนาชุดตรวจ serotyping-NS1-ELISA โดยมีความเข้มข้น ของแอนติบอดี คือ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และพบว่ามีความสามารถในการตรวจหาโปรตีน NS1 สำหรับซีโรทัยป์ 1 ถึง 4 ได้ในระดับต่ำสุดถึง 4.4, 15.8, 2.9 และ 1.7 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจแยกซีโรทัยป์ ของไวรัสเด็งกีจากโปรตีน NS1 ที่ได้จากเซลล์ Ps Clone D, HEK 293T และ C6/36 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีแต่ละซีโรทัยป์ได้อย่าง ถูกต้อง รวมถึงโปรตีน NS1 ที่ได้จากเซลล์ Vero ที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี 1, 2 และ 4 ยกเว้นโปรตีน NS1 จากไวรัสเด็งกี 3 ใน เซลล์ Vero ที่ไม่สามารถตรวจแยกซีโรทัยป์ได้อย่างถูกต้อง การประเมินความจำเพาะของชุดตรวจแยกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกี นี้ควรทำเพิ่มเติมโดยใช้ตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยไข้เลือดออก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า anti-NS1 Mabs ที่จำเพาะ ต่อไวรัสเด็งกีสามารถนำมาพัฒนาชุดตรวจ ELISA ซึ่งหาปริมาณและแยกซีโรทัยป์ของไวรัสเด็งกีได้