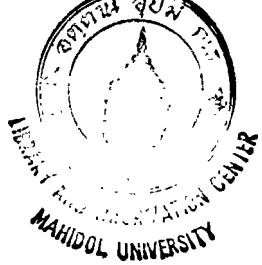
8 FEB 1993



DETECTION FOR DENGUE VIRUS INFECTION USING SUCKLING MICE AS A BIOLOGICAL AMPLIFICATION SYSTEM AND ENZYMEIMMUNOASSAY

BY

MARISA KEMAPUNMANUS

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(PATHOBIOLOGY)

IN THE
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
OF
MAHIDOL UNIVERSITY
1992

Copyright by Mahidol University

21203

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกโดยการใช้หนูแรกเกิดเป็นระบบการเพิ่มจำนวนไวรัส และวินิจฉัยด้วยวิธีเอ็นซัยม์อิมมิวโน

ผู้วิจัย มาริษา เขมะพันธุ์มนัส

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พยาธิชีววิทยา)

คณะกรรมการ วีณา เชิดบุญชาติ (Ph.D.)
ณัฐ ภมรประวัติ (MD.,D.Sc.)
สกล พันธุ์ยิ้ม (Ph.D.)

วันที่สำเร็จการศึกษา 25 ธันวาคม พ.ศ.2535

บทคัดย่อ

การศึกษาการตรวจหาโปรตีนของไวรัสในซีรั่มคนไข้ที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก โดยการใช้หนูแรกเกิดเป็นระบบการเพิ่มจำนวนไวรัสและวินิจฉัยด้วยวิธีเอ็นซัยม์อิมมิวโน ก่อนนำหนูแรกเกิดมาทำการศึกษา ได้ลองตรวจหาไวรัสจากซีรั่มคนไข้ โดยตรงด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าและวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็นซัยม์อิมมิวโน แล้วพบว่าให้ผลลบคือไม่พบโปรตีนของไวรัส เนื่องจากมีโปรตีนอื่นๆ ปนอยู่มากในซีรั่ม ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาต่อไป โดยใช้ Seed ของไวรัสไข้เลือดออก ชนิดที่ 2 เป็นแบบอย่างในการทดลอง จากนั้นศึกษาในซีรั่มคนไข้ 2 กลุ่มจากโรงพยาบาลรามาธิบดีที่วินิจฉัยโดยแพทย์ว่าเป็นโรคไข้เลือดออกในเด็ก ในการศึกษาครั้งนี้เราได้หาระดับความเจือจางที่เหมาะสมของซีรั่มที่จะฉีดเข้าสมองหนูแรกเกิด โดยเปรียบเทียบความเจือจางที่ 1:1, 1:3 และ 1:10 ในระหว่างการศึกษาก็เฝ้าสังเกตุดูอาการทางสมองของหนูที่ถูกฉีด หลังจากนั้นทำการฆ่าและเก็บหนูทุกตัวในวันที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ แล้วนำสมอง ม้าม ตับ และรวมทั้งพลาสม่าของหนูมาตรวจสอบหาโปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกโดยวิธีอีเล็คโทรโฟริซีส และเอ็นซาย์มอิมมิวโนต่อไป

Copyright by Mahidol University

ผลการศึกษาพบว่า ความเจือจางที่ 1:1 เป็นความเจือจางที่เหมาะสมและดีที่สุดที่จะเตรียมซีรั่มคนไข้ก่อนที่จะฉีดเข้าสมองหนูแรกเกิด และวันที่ 7 หลังจากฉีดหนูแล้วฆ่าและนำสมองมาทำการตรวจหาโปรตีน ก็สามารถพบโปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกได้ชัดเจนกว่าวันที่ 5 และ 6 แม้ในหนูที่ไม่มีอาการทางสมองและเมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาโปรตีนของไวรัสด้วยแอนติซีรั่มต่อไวรัสไข้เลือดออก 4 ตัว ได้แก่ rabbit anti-dengue sera, dengue human hyperimmune sera, specific polyclonal anti-D2 (NS3) และ MAb-D2 (E) พบว่า human huperimmune sera เป็นแอนติซีรั่มที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษานี้ และการที่พบว่าโปรตีนของไวรัสจากแต่ละตัวอย่างที่ตรวจให้ผลบวกที่มีลักษณะของแถบโปรตีนที่แตกต่างกัน การค้นพบนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปสู่การตรวจแยกชนิดของไวรัสไข้เลือดออกจากสมองหนูและได้ตรวจพบโปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกในตับหนูด้วย แต่ไม่พบในม้ามและพลาสม่า อย่างไรก็ตามจำนวนแถบของโปรตีนที่พบในตับมีน้อยกว่าที่พบในสมองของหนูตัวเดียวกันหรือครอกเดียวกัน

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Detection for Dengue Virus Infection Using Suckling Mice as a Biological Amplification System and Western blot/ Enzymeimmunoassay

Name Marisa Kemapunmanus

Degree Master of Science (Pathobiology)

Thesis Supervisory Committee

Vina Churdboonchart (Ph.D.)

Natth Bhamarapravati (M.D., D.Sc.)

Sakol Panyim (Ph.D.)

Date of Graduation 25 December B.E. 2535 (1992)

Abstract

Detection for dengue viral proteins in patients' sera with dengue virus infection was investigated by using suckling mouse as a biological amplification system evaluated in conjunction with the Viral antigens strip/ enzymeimmunoassay (VAS/EIA). Dengue viral proteins can not be detected directly from patients'sera by VAS/EIA method due to the high concentration of other serum proteins in human plasma. Therefore, an additional step must be inserted in order to facilitate the use of VAS/EIA. Classical biological amplification system using dengue type 2 virus inoculated intracerebrally to suckling mouse brain was used as the first step to amplify the number of virion circulated in patients' sera. Dengue type 2, new guinea C strain, was employed for titration. Two groups of patients' sera with clinical diagnosis of dengue infection collected

Copyright by Mahidol University

from Ramathibodi hospital were tested for this study. Three dilutions, 1:1, 1:3 and 1:10 of patients' sera were compared to select the proper serum dilution for an inoculation. The signs and symptoms of infected mice were closely observed. After inoculation, they were sacrified on day 5, 6, and 7. Infected mouse organs including the brain, spleen, liver, and also plasma were examined for the presence of dengue viral proteins by VAS/EIA.

The best dilution for serum specimen to be used for an inoculation was found to be at 1:1 ratio, and the positive brain collected on day 7^{th} clearly showed dengue viral proteins, eventhough the mice had no sign of infection which was used previously to indicate the establishment of dengue virus in mouse brain. Rabbit anti-dengue sera, dengue human hyperimmune sera, specific polyclonal anti-D2 (NS3), and MAb-D2 (E) were used as the specific primary antibody to identify dengue viral proteins. Human hyperimmune sera was found to be the most useful antibody for this purpose. Dengue viral proteins from each positive case revealed different patterns which were useful for further typing of dengue virus strains in another study which was done at this laboratory. Besides the brain, dengue viral proteins were also detected in the liver, but not in the spleen and plasma. However, the intensities of protein bands appeared after immunoenzymatic assay from infected liver specimens showed lower reaction than those from infected brain of the same animal.

Copyright by Mahidol University