LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBODIES AGAINST REASSORTANT ROTAVIRUS STRAIN RV441

TASANEE TENGCHAISRI

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

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1989

Copyright by Mahidol University

13902

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีย์ต่อ โรต้าไวรัส สายพันธุ์ผสม RV441

ผู้วิจัย ทัศนีย์ เต็งชัยศรี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

พันทิพา สินรัชตานันท์ Ph.D.

ศรีสิน คูสมิทธ์ Ph.D.

ชไลบล อยู่สุข Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 31 พฤษภาคม ๒๕๓๒

บทคัดย่อ

โรต้าไวรัสถูกจัดเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งในการก่อโรคอุจจาระร่วงในเด็กอ่อน ซึ่งพบทั้งในประเทศพัฒนาและประเทศกำลังพัฒนา วิธีที่ใช้ตรวจหาเชื้อโรต้าไวรัส ส่วนมากจะใช้วิธีตรวจทางน้ำเหลือง แต่เนื่องจากน้ำยาที่ใช้ตรวจโดยวิธีเหล่านี้มีราคาแพง และมีคุณภาพไม่ดีพอที่จะใช้ตรวจหาแอนติเจนที่แสดงถึง subgroup และ serotype ของไวรัสได้ในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการเตรียม และศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีย์ต่อโรต้าไวรัส

การศึกษาการเตรียม แอนติบอดีย์ ต่อโรต้าไวรัส สายพันธุ์ผสม RV441 ไวรัสชนิดนี้สามารถถูกเลี้ยงได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง (MA104 cell) และเป็นสายพันธุ์ผสมระหว่าง ไวรัสสายพันธุ์RV5 กับ สายพันธุ์ SA11 ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติของ แอนติเจนเป็น subgroup I และ serotype 2 ไวรัส

Copyright by Mahidol University

สายพันธุ์ผสม RV441 ถูกเตรียมเป็น immunogen โดยใช้วิธี Polyethyleneglycol concentration และ Fluorocarbon extraction สำหรับใช้ฉีดเข้ากระต่าย

ซีรั่มที่ได้หลังจากฉีดกระต่ายจะถูกนำมาศึกษาและวิเคราะห์โดยวิธี Immunoblotting assay พบว่า แอนติบอดีย์ จับกับ VP2 และ VP5 มากกว่าจับกับ VP6 และ VP7 ซึ่งเป็น โปรตีน ของไวรัสสายพันธุ์ผสม RV441 หลังจากนั้นจึงถูกนำมาสกัดเป็น Immunoglobulin G (IgG)บริสุทธิ์และถูกนำมาใช้เตรียม peroxidase-conjugated rabbit IgG ทั้ง purified rabbit IgG และ conjugated rabbit IgG ได้ถูกนำมาใช้ตรวจหา โรต้าไวรัส โดยวิธี double antibody sandwich ELISA กับจำนวนตัวอย่างตรวจซึ่งเป็นอุจจาระของผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงทั้งหมด 260 ราย พบว่ามี 100 รายให้ผลบวกกับ ELISA ในจำนวนนี้มี 88 ราย ให้ค่า OD_{490} สูง (1.12-2.5) และ 12 รายให้ค่า OD_{490} ต่ำ (0.23-1.00) ซึ่งผลบวกของตัวอย่างตรวจเหล่านี้ถูกสนับสนุนโดยวิธี ELISA blocking test รวมทั้งผลของการศึกษา RNA genome ของไวรัสกลุ่มนี้ได้ถูกวิเคราะห์โดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) พบว่ามีลักษณะเป็นแบบ "short" สำหรับตัวอย่างตรวจอีกจำนวนหนึ่ง 160 ราย ซึ่งมี 100 ราย มีลักษณะ RNA genome เป็น "long" และ 60 ราย ซึ่งตรวจไม่พบ rotavirus ทั้งโดยวิธี PAGE และ ELISA (โดยใช้แอนติบอดีย์ของ DAKO) พบว่าให้ผลลบกับ วิธี ELISA นี้ จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า แอนติบอดีย์ในซีรั่มกระต่ายมีความสามารถตรวจได้เฉพาะ subgroup I rotavirus ของคนในตัวอย่างตรวจโดยวิธี ELISA เพื่อเป็นการสนับสนุนคุณสมบัติของแอนติบอดีย์นี้ ว่ามีความเฉพาะต่อ subgroup I rotavirus จริง และก่อนนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปนั้นควรจะศึกษาแอนติบอดีย์ชนิดนี้ต่อไป โดยทำการทดสอบแอนติบอดีย์กับสายพันธุ์อื่นๆของโรต้าไวรัสที่ทราบคุณสมบัติแน่นอน และกับตัวอย่างตรวจในจำนวนมากโดยวิธี ELISA และเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่น่าเชื่อถือได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Preparation and Characterization of Antibodies against Reassortant Rotavirus Strain RV441

Name Tasanee Tengchaisri

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisor Committee

Pantipa Sinarachatanant, Ph.D.

Srisin Khusmith, Ph.D.

Chalobon Yoosook, Ph.D.

Date of Graduation 31 May B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Rotaviruses have been shown to be the major cause of infantile gastroenteritis in developed and developing countries. In developing countries, the serological assays are the main use of rotavirus detection but the comercially available reagents used for the assays are too expensive. The reference rotavirus antigens and antibodies representative of subgroups and serotypes are not yet available.

A reassortant rotavirus strain RV441 with subgroup I serotype 2 antigenic determinants was propagated in MA104 cells, precipitated with polyethyleneglycol, extracted with fluorocarbon and then used to immunize rabbit. Hyperimmune responses of rabbit was detected by ELISA. Immunoblotting analysis of rabbit antiserum showed that immune response

Copyright by Mahidol University

directed strongly to VP2 and VP5 and weakly to VP6 and VP7 structural proteins of rotavirus. Purified immunoglobulin was prepared from rabbit antiserum and used at the optimal dilutions to develop a double-sandwich ELISA to monitor the presence of rotavirus in clinical specimens. A total of 260 fecal specimens from diarrheic patients were tested. Only 88 specimens showed high OD_{490} reading value (1.12 - 2.5), and all of them were "short" RNA electropherotypes. Other 12 specimens reacted weakly in the ELISA test (OD_{490} = 0.23-1.00), and had been confirmed possitive by blocking ELISA test. The remaining 160 specimens, composed of 100 specimens with "long" electropherotype and 60 specimens negative for rotavirus, all showed negative results in this ELISA. We proposed that this ELISA system may be of value in identifying subgroup I human rotavirus but further test of additional clinical specimens and other reference rotavirus strains are required to confirm the sensitivity and specificity of the method.

Copyright by Mahidol University