LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
30 JAN 1991

CHARACTERIZATION OF A NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION PROCEDURE AND A POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION PROCEDURE FOR DETECTION OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID

MALA CHUTINASWANGPORN

อภินันทนาการ
จาก

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

16475

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาเชื้อไวรัสแจแปนนีสเอ็นเซฟฟาไลตีสในซีรั่มและน้ำหล่อสมองไขสันหลังโดยวิธี นิวคลีอิคแอซิด ไฮบริไดเซชั่น และ วิธีเพิ่มปริมาณยีนโดยปฏิกิริยาต่อเนื่องของเอ็นซัมย์โปลีเมอเรส

ผู้วิจัย มาลา ชุตินะสว่างพร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

เจริญศรี มังกรกาญจน์, วท.ม. (ชีวเคมี)

พันโท Bruce L. Innis , พ.บ.

วันที่สำเร็จการศึกษา ๒๑ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๓๓

บทคัดย่อ

แจแปนนีสเอ็นเซฟฟาไลตีส เป็นโรคติดเชื้อของระบบประสาทส่วนกลางทำให้เกิดไข้สมองอักเสบ เชื้อต้นเหตุที่สำคัญของไข้สมองอักเสบที่เกิดจากเชื้อไวรัสในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือเชื้อเจอี การวินิจฉัยแจแปนนีสเอ็นเซฟฟาไลตีสทำได้โดยการตรวจหาแอนติ้บอดี้ย์ชนิด IgM ต่อเชื้อเจอี ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและมีความไวสูง แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยไข้สมองอักเสบที่เกิดจากเชื้อไวรัสในประเทศไทยประมาณ ๑๕ ถึง ๓๐ เปอร์เซนต์ ยังไม่สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคได้โดยวิธีที่มีใช้ในปัจจุบัน การคิดค้นหาวิธีการตรวจใหม่อาจเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคมากขึ้นโดยเฉพาะในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่รู้สาเหตุของโรค ดังนั้นวิธีการใหม่สองวิธีคือ นิวคลีอิคแอซิดไฮบริไดเซชั่น และการขยายยีนด้วยปฏิกิริยาต่อเนื่องของเอ็นซัมย์โพลีเมอเรส (พีซีอาร์) จึงได้ถูกพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อเจอี จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า การตรวจหาเชื้อเจอีโดยวิธีไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ RNA probe ที่มีความยาว ๒.๔ กิโลเบสมีความไวสูงกว่าการตรวจโดยใช้ DNA probe ที่มีความยาวใกล้เคียงกันประมาณ ๓ ถึง ๑๐ เท่า RNA probe สามารถช่วยตรวจหา

Copyright by Mahidol University

เชื้อเจอีได้ไวถึง $10^{1.5}$ ถึง $10^{2.7}$ 50% mosquito infective doses (MID_{50}'s) แต่ probe นี้ ให้ปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อในกลุ่ม Flaviviruses ตัวอื่นๆซึ่งรวมทั้งเชื้อไวรัส dengue ทั้ง ๔ ชนิด เนื่องจากยีนของ Flavivirus มีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นการตรวจหาเชื้อเจอีโดยวิธีไฮบริไดเซชั่นจะต้องเลือกหา probe ที่มีความยาวน้อยกว่านี้ และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเจอีมากกว่านี้จึงจะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยได้

การตรวจโดยวิธีพีซีอาร์พบว่ามีความไวมากกว่าวิธีไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ RNA probe ๑๐ ถึง ๓๐ เท่า คือ สามารถตรวจหาเชื้อเจอีตั้งแต่น้อยกว่า 10^{-1} ถึง 10^{3} MID_{50}'s โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเจอี ให้มีปริมาณมากขึ้นจนถึงระดับที่สามารถพบได้โดยวิธีการที่ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี คือ การย้อมด้วย ethidium bromide การตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ให้ปฏิกิริยาข้ามเฉพาะกับเชื้อ dengue-3 เท่านั้น primers ที่ใช้ในวิธีพีซีอาร์นี้พบว่าสามารถใช้ได้ทั้งกับสายพันธุ์มาตรฐานของเชื้อเจอีและสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย จากการตรวจหาเชื้อไวรัสเจอีที่แยกได้จากสัตว์และคน ๒๘ เชื้อ โดยวิธีพีซีอาร์พบว่าสามารถตรวจพบผลบวก ๒๔ เชื้อ

ในการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์เปรียบเทียบกับวิธีเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างซีรั่มและเม็ดเลือดขาวของลิงที่ทดลองให้โดนกัดโดยยุงที่ติดเชื้อไวรัสเจอีได้นำมาวิเคราะห์ทุกวันเป็นเวลา ๑๐ วัน พบว่าตัวอย่างทั้งหมดตรวจไม่พบเชื้อโดยวิธีพีซีอาร์ และวิธีเลี้ยงเชื้อจากการฉีดยุง ยกเว้นซีรั่มที่เก็บในวันที่ ๑ และ ๒ ให้ผลบวกแต่น้อยมากเฉพาะวิธีเลี้ยงเชื้อ การตรวจซีรั่มหรือพลาสม่า, เม็ดเลือดขาว และน้ำหล่อสมองไขสันหลังผู้ป่วยไข้สมองอักเสบจำนวน ๑๒ คน ที่เก็บแช่แข็งไว้โดยวิธีพีซีอาร์และการเลี้ยงเชื้อไม่พบว่ามีเชื้อไวรัสเจอี โดยสรุปวิธีพีซีอาร์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง มีความไวเทียบได้กับวิธีที่ดีที่สุดของการเลี้ยงเชื้อ แต่การใช้วิธีการนี้เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคในคนจะต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงต่อไป

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Characterization of a Nucleic Acid Hybridization Procedure and a Polymerase Chain Reaction Amplification Procedure for Detection of Japanese Encephalitis Virus in Serum and Cerebrospinal Fluid

Name Mala Chutinaswangporn

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Chareonsri Mungkornkarn, M.S. (Biochemistry)

LTC. Bruce L. Innis, M.D.

Date of Graduation 21 May B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

Japanese encephalitis (JE) is an acute infection of the central nervous system caused by Japanese encephalitis virus (JEV). JE is the most prevalent form of viral encephalitis in Southeast Asia. Diagnosis of anti-JEV IgM in cerebrospinal fluid of patients is a sensitive and practical method. However, the etiology of 15-30% of encephalitis cases in Thailand remains unknown after this test is performed. Therefore, nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction amplification (PCR) procedures for detection of JEV RNA were investigated. Detection of JEV by hybridization with 2.4 Kb RNA probe was found to be 3-10 times more sensitive than hybridization with

Copyright by Mahidol University

similar DNA probe. The endpoint of detection was $10^{1.5}$ - $10^{2.7}$ 50% mosquito infective doses (MID_{50}'s) of JEV. The RNA probe did react with other flaviviruses, including all serotypes of dengue. Given the high homology of all flavivirus genomes, only a short probe selected from a JEV unique sequence is likely to be specific diagnostic probe.

PCR was found to be approximately 10-30 times more sensitive than RNA probe hybridization. It could amplify $<10^{-1}$ - 10^{3} MID_{50}'s of JEV to levels detectable by non-isotopic methods, depending on the virus strain. The only cross-reaction was with dengue type 3. The primers used for JEV PCR appeared to be broadly homologous with reference strains and Thai isolates of JEV. Of 28 JEV isolates tested, 24 could be amplified by PCR.

In order to further evaluate the potential of the PCR method, serial specimens of sera and leukocytes taken from a monkey infected with JEV were analyzed. Day 1 and 2 sera contained low levels of virus recovered by culture. However, these and all other specimens were negative by PCR. A limited number of clinical specimens taken from human encephalitis cases were also tested for the presence of JEV by PCR and virus culture. No specimen was positive in either assay system.

It was concluded that PCR amplification is a powerful tool for detection of JEV, it approaches or exceeds the sensitivity of the best culture technique, but its utility for diagnosis of human disease remains to be established.

Copyright by Mahidol University