# การศึกษา เพื่อพัฒนาวิธีการศิค เชื้อรรคพิษสุนัชบัา รคยวิธี อิมมูรนบล็อท

นางสาวอัญชลี วิศวรุกคา

# ศูนย์วิทยทรัพยากร

ว็ทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษากามหลักสูกรบริญญาวิทยาศาสกรมหาบัณฑิก สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิกวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2531

> ISBN 974 - 569 - 614 - 5 ลิซสิทธิ์ของบัณฑิทวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

> > 015799

T1915118268

DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTIC TEST OF
RABIES INFECTION BY IMMUNOBLOT

Miss Unchalee Vishawapoka

# คนยวิทยทรพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Thesis title Development of New Diagnostic Test of Rabies Infection by Immunoblot. Ву Miss. Unchalee Vishawapoka Inter-Department Medical Microbiology Associate Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D Thesis Advisor Co - Advisor Assistant Professor Thiravat Hemachudha , M.D. Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the requirment for the Master's Degree. wown.... Vajrab. Lay. a... Dean of the Graduate School (Professor Thavorn Vajrabhaya , Ph.D.) Thesis committee :

Dilok fundation ... Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Prophen Phonephole, M.D.
Thesis Advisor

(Associate Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.)

Thinwal Hemachalus ... Co - Advisor

(Assistant Professor Thiravat Hemachadha, M.D.)

Chantarry ... Wasi ... ... Member

(Associate Professor Chantapong Wasi, M.D.)

Wella T. ... ... Member

(Weera Tepsumethanon , B.Sc., D.V.M.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

อัญชลี วิศวโกคา : การศึกษา เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยการคิด เชื้อโรคพิษสุนัขบ้า โดยวิธี อิมมูโนบล๊อท (DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTIC TEST OF RABIES INFECTION BY IMMUNOBLOT) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นพ.ประพันธ์ ภาบุภาค, ๑๖ หน้า.

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยการติด เชื้อไรคพิษสุนัขบ้า ไดยวิธี dotimmunoblot ไดยการนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาหยดลงขนแผ่น nitrocellulose filler และตรวจ
สอบโดยใช้ rabbit antirabies IgG (RRIG) ที่เตรียมได้จากการใช้ Purified Vero Cell
Rabies Vaccine ฉีดกระคุ้น เข้าไปในกระค่าย ขยายปฏิกิริยาระหว่าง antigen และ antibody
โดยใช้ avidin-biotin system ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย enzyme peroxidase และมี 4-chloro
-1-napthol เป็น substrate

ด้วอย่างตรวจที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ ต่อมน้ำลาย (parotid gland) และน้ำลายของสุนัขที่ นำมาตรวจทางชื่อพิษสุนัขบ้า โดยใช้ผลของ Fluorescent antibody test (FAT) mouse inoculation test (MIT)ของสมองเป็นเกพท์ พบว่าในตัวอย่างสิ่งตรวจที่เป็น parotid gland suspension ที่เครียบขึ้นใหม่ ๆ จะมีความไวและความจำเพาะสูงถึง 100% และในตัวอย่างตรวจที่เป็น น้ำลายที่เก็บบาใหม่ ๆ จะมีความไว 94.7% และความจำเพาะ 91.6%

ความไวและความจำเพาะนี้จะลดลงเมื่อตรวจในตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 3 เดือน โดยจะมีความไว 96.5% และความจำเพาะ 84% ในตัวอย่างตรวจที่เป็น parotid gland และมีความไว 89.6% ความจำเพาะ 73% ในน้ำลาย จากการนำสมองมาตรวจไดยวิธีนี้พบว่า stored brain suspension จะมีความไว 61.9% และความจำเพาะ 95.2% ซึ่งความไวและความจำเพาะที่ลดลงนี้อาจ เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลง (denaturation) ของ antigen แต่เมื่อนำส่วนของ fresh brainstem guspension มาตรวจ พบว่าจะมีความไวสูงขึ้นถึง 94.7% และความจำเพาะ 88.8%

จากการศึกษาโดยนำน้ำยาสำเร็จรูปที่เตรียมจากม้า (ERIG-BBL) มาใช้เป็น primany antibody และตรวจด้วยวิธี dot-immunoblot พบว่าให้ผลเหมือนกับการใช้ RRIG คือใน stored parotid gland suspension จะมีความไว 88.8% และความจำเพาะ 85.7% ส่วนใน stored saliva และ stored brain suspension จะมีความไว 72.7%, 75% และความจำเพาะ 85.7%. 100% ตามลำดับ ผลการตรวจโดยใช้ fresh brainstem suspension พบว่ามีความไวสูงถึง 100% และมีความจำเพาะ 88.8% ซึ่งจากการใช้น้ำยาสำเร็จรูป (ERIG-BBL) นี้พบว่ามีข้อดีคือเห็นความ แตกต่างของผลบวกและลบได้ชัดเจน รวมทั้งเป็นการสะดวกที่จะนำมาใช้ในการตรวจด้วยวิธี dot-immunoblot เนื่องจากเป็นน้ำยาที่มีใช้อยู่แล้วในงานประจำ

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อพิษสุนัชบ้า โดยใช้ dot-immunoblot กับวิธีที่ตรวจอยู่เป็น งานประจำ (Sellers'stain, MIT, FAT) พบว่าวิธี SS เป็นวิธีที่มีความไวต่ำสุดคือ 59% โดยมี ความจำเพาะ 100% และวิธี dot-immunoblot ในตัวอย่างตรวจที่เป็น fresh parotid gland suspension จะมีความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับ FAT และ MIT

ภาควิชา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	
ปีการศึกษา2531	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประจับอั

UNCHALEE VISHAWAPOKA: DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTIC TEST OF RABIES INFECTION BY IMMUNOBLOT. THESIS ADVISOR: ASSO. PROF. PRAPHAN PHANUPHAK, Ph.D., 85 PP.

Dot-immunoblot was developed as a new diagnostic test for rabies in dogs submitted for examination at the Queen Saovabha Memorial Institute of Thai Red Cross Society. The test specimens were applied on a piece of cut nitrocellulose membrane and stained with locally prepared rabbit antirabies immunoglobulin G (RRIG) and amplified by avidinbiotin peroxidase complex. The whole staining procedure took about 6 hours and the positive test appeared as blue dot on the nitrocellulose membrane.

The results obtained with the freshly prepared parotid gland suspension were 100% sensitive and 100% specific as compared to fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test (MIT) of the brain. With fresh saliva, the sensitivity and specificity of the dot-immunoblot were 94.7% and 91.6% respectively. However, the sensitivity and specificity were diminished when stored specimens were used, i.e., 96.5% and 84% respectively for parotid gland suspension and 89.6% and 73% respectively for saliva.

In order to make the test more widely applicable, the commercial primary antibody (Equine rabies immunoglobulin or ERIG from BBL) was also studied. As compared to RRIG, ERIG-BBL gave a more clearout distinction between positive and negative specimens. With ERIG-BBL, the sensitivity and specificity of stored parotid gland suspension were 81.8% and 85.7% respectively and of saliva were 72% and 85.7% respectively.

We extented our dot immunoblot study to the brain tissue. Similar to the results with stored salivary gland suspension and saliva, stored brain suspension was also less sensitive than FAT and MIT, i.e., only 75% and 61.9% sensitivity with ERIG-BBL and RRIG respectively but the specificity was 100% and 95.2% respectively. However, when freshly prepared brainstem suspensions were used, the sensitivity and specificity increased to 100% and 88.8% respectively with ERIG-BBL and 94.7% and 88.8% respectively with RRIG. The reason for this improved sensitivity and specificity may be due either to non degraded state of the brain or to the viral predilection in the brainstem.

The dot immunoblot technique was further applied for antemortem diagnosis of rabies in with quarantined animals. The results were very satisfactory with an excellent correlation with the other standard diagnostic methods and with clinical pictures of both rabid and nonrabid quarantined dogs.

Our results indicated that dot-immunoblot technique, when property performed, could be of great diagnostic value in both antemortem and postmortem diagnosis of rabies. After a larger scale of study, it may replace the time-consuming MIT and be used as the confirmatory test for FAT or even replace FAT in small laboratories where fluorescent microscope is not available.

ภาควิชา	1111		
สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต		
ปีการศึกษา2531	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประเบีย์ เกษ แก		

### ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deep gratitute to the following persons who have helped, supported and advised me. This thesis would never have been successed without all of these persons.

My deepest appreciation to

Dr. Praphan phanuphak, M.D. Ph.D., Associate Professor of Medicine, Division of clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine. Chulalongkorn University, my advisor, for his kindness, helpful suggestion, constructive criticisms and review of manuscript.

Dr. Thiravat Hemachudha, M.D., Assistant Professor of Medicine, Division of Neurology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his advice, attention, suggestion, encouragement, devotion and his kindness.

Dr. Weera Tepsumethanon, D.V.M., and Dr. Chaiyaporn Polsuwan, D.V.M., staffs and personnels in Rabies Diagnostic Unit, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Sociaty, for their great help in specimen collection, observation of quarantined animals and rabies diagnosis by Sellers' stain, FAT and MIT.

I would like to thank my colleagues in the Division of Immunology, Department of Microbiology for their advice, support and being good friends.

Finally, I am deeply indepted to my family for their help, encouragement and understanding.

This work was supported in part by grants from Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society and Chulalongkorn University Hospital and by the Committee of the graduate school, Chulalongkorn university.

# CONTENT

THAI ABSTRACT	
ENGLISH ABSTRACT	
ACKNOWLEDGEMENT	vi
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xii
OBJECTIVES	xv
CHAPTER	1
I. INTRODUCTION	5
II. REVIEW OF LITERATURES	5
RABIES VIRUS	
1. Morphology	5
2. Biochemical constituents	5
VIRAL REPLICATION	8
TRANSMISSION	9
PATHOGENESIS	11
INCUBATION PERIOD	15
PREVENTION AND TREATMENT	15
DIAGNOSIS	16
<ol> <li>Detection of Negri body (by Sellers'stain)</li> </ol>	18
<ol><li>The fluorescent antibody test (FAT)</li></ol>	19
<ol><li>The mouse inoculation test (MIT)</li></ol>	20
III. MATERIALS AND METHODS	
1. MATERIALS	
1.1 Dogs	23
1.2 Collection of saliva, parotid gland	23
and brain from the deceased dogs	

	2.	Sellers' stain for Negri body	25
	3.	FAT (direct immunofluorescent antibody test)	25
	4.	Mouse inoculation test	26
	5.	Dot - immunoblot assay	26
	6.	Test procedures	30
100	7.	Determination of factor affecting the dot	31
		immunoblot assay	
	8.	Specificity and sensitivity of RRIG and ERIG	32
		by dot - immunoblot	
9	9.	Method of quantitation	32
1	10.	Analysis of data	33
IV. RESU	JLTS		
	1.	Preparation and purification of rabbit	34
		antirables IgG	
	2.	Study of factors affecting the dot immunoblot	34
		system	
	3.	Dot - immunoblot results	37
V. DISCU	JSSI	TON	41
(	conc	clusion	47
REFERENCE	ss .		65
APPENDIX	Ι.		78
APPENDIX	II		81
CIRRICULU	JM V	VITAE	85

#### LIST OF TABLES

Table			page
	1 A.	Checkerboard titration to determine the optimal	55
		dilution of antibodies	
		between primary Ab : rabbit antibodies IgG and	
		secondary Ab : biotin - conjugated goat	
		antirabbit IgG	
	1 B.	Checkerboard titration to determine the optimal	56
		dilution of antibodies	
		between primary Ab : Equine antirables globulin	
		and secondary Ab : biotin - conjugated rabbit	
		antihorse IgG	
	2 A.	The specificity and sensitivity of rabbit	57
		antirables IgG	
	2 B.	The specificity and sensitivity of equine	58
		antirables globulin	
	3.	Determination of working dilution of ABC	59
	4.	The results of dot immunoblot on freshly prepared	60
		salivary gland and saliva from suspected dogs	
	5.	The results of dot immunoblot examination on	61
		stored salivary gland, saliva, and brain from	
		suspected dogs using RRIG	
	6.	The results of dot immunoblot examination on	62
		stored salivary gland, saliva, and brain from	
		suspected dogs using ERIG	
	7.	Results of dot immunoblot of, freshly prepared	63
		brainstem using RRIG and ERIG	

 Results of study of viral excretion in the 64 saliva of quarantined dogs.



ศูนย์วิทยทรัพยากร จหาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### LIST OF FIGURES

	page
Diagrammatic representation of rabies virus.	49
Negri bodies demonstration by Sellers' stain.	50
Fluorescent antibody test (FAT) on brain	51
impression smear.	
Affinity chromatography of rabbit antirables	52
antibody on protein A Sepharose CL-4B	
TEP of rabbit antirables LgG.	53
Dot-immunoblot for detection of rabies virus	54
antigen.	
	Negri bodies demonstration by Sellers' stain.  Fluorescent antibody test (FAT) on brain impression smear.  Affinity chromatography of rabbit antirables antibody on protein A Sepharose CL-4B  IEP of rabbit antirables LgG.  Dot-immunoblot for detection of rabies virus

์ ศูนย์วิทยทรัพยากร สาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATIONS

C celsius (centigrade) ed editor exempli gratia e.g. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay ELISA et al et alii et cetera etc. fig. figure gm gramme hr hour HRPO Horseradish peroxidase i.e. id est IEP Immunoelectrophoresis IgG Immunoglobulin G IM. intramuscular kg kilogramme 1 litre mg milligramme microgramme ug min minutes PBS Phosphate Buffer Saline sec second ml millilitre ul microlitre mol molar Molecular Weight MW normal

ng = nanogramme

no. = number

RIA = Radio Immuno Assay

r.p.m. = revolutions per minute

Ab = Antibody

Ag = Antigen

RRIG = Rabbit antirabies Immunoglobulin G

ERIG = Equine antirables globulin

vol = volume

คูนยวิทยทรพยากร กาลงกรณ์มหาวิทยาลั

# Objectives

- To develop diagnostic test, dot-immunoblot, for detection of rabies antigen in canine salivary gland and saliva specimens.
- To compare the efficacy between dot-immunoblot and routine diagnostic tests (SS, FAT, MIT)
- 3. To study the time at which the virus can be detected in the saliva of dogs observed at QSMI by dot-immunoblot technique in relation to the clinical symptoms.

ศูนย์วิทยุทรัพยากร