การตรวจแอนติบอดีต่อเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ไวรัส ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนสอเบนท์ โดยใช้แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง

นางสาวศิริมา ปัทมดิลก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-587-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016123
i 10301252

DETECTION OF ANTIBODY TO HERPES SIMPLEX VIRUS BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIC USING LOCALLY PREPARED ANTIGEN

Miss Sirima Pattamadilok

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
1988

ISBN 974-569-587-4

Thesis Title	Detection of Antibody to Herpes Simplex Virus by Enzyme linked Immunosorbent Assay Technic Using Locally Prepared Antigen
By	Miss Sirima Pattamadilok
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya .....Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee :

Dilok Yenbutra .....Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Vanna Punnarugsa .....Thesis Advisor

(Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.)

Pornthep Tiensiwakul .....Co-Advisor

(Assistant Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.)

Petcharin Srivatanakul .....Member

(Petcharin Srivatanakul, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คิริมา ปัทมดิลก : การตรวจแอนติบอดีต่อเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ ไวรัสด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนล่อเบนท์ โดยใช้แอนติเจนที่ผลิตขึ้นเอง (DETECTION OF ANTIBODY TO HERPES SIMPLEX VIRUS BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIC USING LOCALLY PREPARED ANTIGEN) อ. ที่ปรึกษา : รศ.พญ. วรรณา พรรณรักษา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. พรเทพ เทียนลิวากุล, 108 หน้า.

การตรวจหาแอนติบอดีมีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัย และศึกษาระบาดวิทยาของโรค ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจที่ทำได้ง่าย และราคาไม่แพงโดยเร่งด่วน เพื่อสามารถใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ได้ วิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนล่อเบนท์ (Enzyme linked immunosorbent assay) ได้ถูกพัฒนาขึ้นและจากรายงานอื่น ๆ ยอมรับว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ในการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนล่อเบนท์เพื่อหาแอนติบอดีต่อเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ (Herpes simplex virus) โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง (HeLa cells) ทำควบคู่ไปกับ แอนติเจนที่เตรียมจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีไวรัส นำไปเคลือบบนผิวในหลุมของถาดโพลีสไตรีน (polystyrene plate) อิมมูโนโกบูลิน จี (IgG) ในตัวอย่างตรวจที่สามารถจับกับแอนติเจนของไวรัสนี้ จะถูกตรวจหาได้โดยการใช้ เอนไซม์ที่จับอยู่กับแอนติ อิมมูโนโกบูลิน จี (peroxidase conjugated anti-human IgG)

ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนล่อเบนท์ที่พัฒนาขึ้นกับน้ำยาสำเร็จรูป (commercial ELISA kit) และวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescence) โดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ ไวรัส ในน้ำเหลืองของหญิงตั้งครรภ์ปกติจำนวน 92 ราย ผลการทดลองพบว่า วิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนล่อเบนท์ที่พัฒนาขึ้นมีความไวร้อยละ 92.5 และความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดล่อบด้วยน้ำยาสำเร็จรูป นอกจากนั้นแล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน พบว่า มีความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 93.75 แอนติเจนที่เตรียมขึ้นนี้ ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติบอดี ต่อไวรัสงูสวัด (Varicella zoster virus) และไซโตเมกะโลไวรัส (Cytomegalovirus) การศึกษาอายุการใช้งานของแอนติเจนนี้พบว่ายังมีประสิทธิภาพดีในช่วงเวลา 6 เดือน

จากผลการทดลองนี้ให้เห็นว่า วิธีเอนไซม์ลิงก์ อิมมูโนล่อเบนท์ ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ ไวรัส

ภาควิชา -

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2531

ลายมือชื่อนิสิต คิริมา ปัทมดิลก

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วรรณา พรรณรักษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SIRIMA PATTAMADILOK : DETECTION OF ANTIBODY TO HERPES SIMPLEX VIRUS BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIC USING LOCALLY PREPARED ANTIGEN. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. VANNA PUNNARUGSA, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. PORNTHEP TIENSIWAKUL, Ph.D., 108 PP.

Serological methods are playing an increasingly important role in the diagnosis and epidemiological assessment of diseases. Simple and inexpensive methods for large-scale application are urgently needed. The enzyme linked immunoassay (ELISA) developed recently and reviewed elsewhere holds great promise in a wide variety of applications. In this study, an ELISA was developed for detecting antibody to herpes simplex virus (HSV). A crude extract of HSV-infected HeLa cells and non-infected cells were used to coat wells of polystyrene microtiter plates. Human-IgG bound to the coated viral antigen was detected by peroxidase conjugated anti-human IgG.

In this study, the sensitivity and specificity of developed ELISA was compared with those of commercial ELISA kit and immunofluorescence assay. With these technic 92 sera of healthy pregnant women were tested for the presence of HSV antibodies. The results showed that the sensitivity and specificity of the developed ELISA were 92.5 % and 100 %, respectively when compared with those of commercial ELISA kit and 100 % and 93.75 %, respectively when compared with those of immunofluorescence assay. This local-HSV antigen did not show cross reaction with commercial antibody to varicella zoster virus and cytomegalovirus. The prepared antigen was stable upon storage for at least 6 months.

The results indicated that the developed ELISA was easy, rapid, sensitive, and specific and therefore, suitable for routine assay of HSV antibody.

ภาควิชา -

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2531

ลายมือชื่อนิสิต ศิริมา ปัทมดิลก

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep gratitude to the following, who had helped in making this thesis possible.

Dr. Vanna Punnarugsa, Associate Professor of the Virology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for her helpful guidance, keen interest, encouragement and valuable suggestions throughout the course of this thesis.

Dr. Pornthep Tiensiwakul, Assistant Professor of the Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for his grateful guidance, kindness, interest, and constructive criticism.

Dr. Dilok Yenbutra, Associate Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kindness, guidance, and criticism of this thesis.

Dr. Petcharin Srivatanakul, Chief of Research Division, Research Division, National Cancer Institute, Ministry of Public Health, for her valuable advice and constructive criticism.

Mrs. Pranee Thawatsupha, Chief of Respiratory virus section, National Institute of Health, Thailand, for her valuable helps, encouragement and kindness in permitting to study for the Master degree.

Mrs. Suranga Saguanwongse, Chief of Electron Microscopy Section, National Institute of Health, Thailand, for her kindness and helps in the photography.

Mr. Wattana Auwanit, Chief of Immunology Section, National institute of Health, Thailand, for his valuable helps in the art-work.

Staffs of Virology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their enthusiastic cooperation in assisting and the access for equipments needed.

The committee of the Graduate school, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Sincere thanks are also given to all my friends for their helps, encouragement and understanding.

Finally, I am deeply indebted to my family, for their kindly support and encouragememt throughout this study.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

LIST OF TABLES..... xiii

LIST OF FIGURES..... xiv

ABBREVIATIONS..... xv

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

II. LITERATURE REVIEW..... 5

1. Historical Background..... 5

2. Structures and Compositions of the Virus.... 7

3. Animal Susceptibility and Growth of Virus..... 9

4. Viral Replication..... 10

5. Pathogenesis of HSV-Infection..... 12

6. Clinical Spectrums of HSV-Infection..... 13

7. The Epidemiology of HSV-Infection..... 15

8. Laboratory Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection..... 17

8.1 Immunofluorescent antibody technic (IFA)..... 18

8.2 Radioimmunoassay (RIA)..... 20

8.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... 21
9. Preparations of Antigen for the Detection of Antibody by Solid-Phase Immunoassay..... 24
9.1 Purified and partially purified antigen..... 24
9.2 Crude antigen..... 25
III. MATERIALS AND METHODS
MATERIALS..... 26
1. Cell Culture..... 26
2. Virus..... 26
3. Tested Samples..... 26
4. ELISA Kit..... 27
4.1 Test-plate..... 27
4.2 Test-sample..... 27
4.3 Conjugate..... 27
METHODS..... 28
1. Preparation of Antigen for ELISA..... 28
1.1 Preparation of cell culture..... 28
1.2 Propagation of stock virus..... 28
1.3 Titration of stock virus..... 29
1.4 Virus inactivation assay..... 30
1.5 Selection of antigen..... 31
1.6 Verification of viral antigen..... 33
2. Determination of Factors Affecting the ELISA System..... 34

2.1 Determination for optimal concentration of the reagent used..... 35
2.2 Temperature and time-course for coating antigen on the plate..... 37
2.3 Determination of time-course for:
2.3.1 HSV-antigen and antibody reaction..... 37
2.3.2 Peroxidase conjugated antiserum of rabbit immunoglobulin to human IgG reaction..... 38
2.3.3 Color development..... 38
3. Standardization of the ELISA Test..... 38
3.1 Precision study..... 38
3.2 Specificity of HSV-antigen in ELISA test..... 39
4. Comparative study of HSV-antibody by ELISA (local-made), Commercial ELISA Kit, and IFA (local-made)..... 39
4.1 Procedure of ELISA (local-made)..... 40
4.2 Procedure of commercial ELISA kit..... 41
4.3 Indirect immunofluorescent antibody technic (IFA) for HSV-antibody..... 42
4.4 Statistical analysis..... 42
5. Study of the Stability of the ELISA Antigen in various conditions..... 43
5.1 Freezing..... 43
5.2 Lyophilization..... 43

5.3 Coating on solid-phase (microtiter plate)..... 44

5.4 Coating on solid-phase (microtiter plate) and washed before kept at -20 °C..... 44

IV. RESULTS

1. Results of Preparation of Viral antigen.... 50

1.1 Preparation of cell culture..... 50

1.2 Preparation of stock virus..... 50

1.3 Titration of stock virus..... 50

1.4 Comparison in the methods of viral inactivation..... 50

1.5 Selection of antigen..... 51

2. Determination of Factors Affecting the ELISA System..... 52

2.1 Optimal conditions of ELISA assay for the detection of HSV antibody..... 52

2.2 Determination for optimum of time and temperature for antigen-coating antigen..... 54

2.3 Determination for optimum of time-course for:

2.3.1 HSV antigen and antibody reaction..... 54

2.3.2 Antibody and Conjugate reaction 55

2.3.3 Color development..... 55

3. Standardization of the Assay..... 56
3.1 Precision analysis of ELISA test..... 56
3.2 Specificity of HSV-antigen in ELISA test..... 56
4. Study the Sensitivity and Specificity of the ELISA (local-made) by Comparing to ELISA Kit and IFA..... 57
4.1 Comparison between ELISA (local-made) and ELISA kit..... 57
4.2 Comparison between ELISA (local-made) and IFA..... 57
5. Preservation and stability of HSV-Antigen for ELISA..... 58
V. DISCUSSION..... 79
REFERENCES..... 85
APPENDIX I..... 100
APPENDIX II..... 103
VITA..... 108

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Inactivation of HSV by ultraviolet light.....	59
2	Inactivation of HSV by heat.....	60
3	Comparison of HSV-antigen preparations in MEM and PBS.....	61
4	Comparison of HSV-antigen preparations from HeLa and Vero Cells.....	62
5	Checkerboard titration to determine optimal conditions.....	63
6	Optimal conditions of time and temperature in the coating of antigen.....	64
7	Optimal conditions of ELISA test for the detection of HSV antibody.....	65
8	Precision analysis of ELISA for detection of HSV antibody.....	66
9	Specificity test of HSV antigen in ELISA.....	67
10	Comparison between ELISA (local-made) and ELISA kit.....	68
11	Comparison between ELISA (local-made) and IFA...	69
12	Preservation and stability of HSV-antigen for ELISA by:.....	70
	12.1 Freezing at -20 °C.....	70
	12.2 Lyophilization.....	71
	12.3 Coating on plate and kept at -20 °C.....	72
	12.4 Coating on plate and washed before kept...	73

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Completed monolayer of HeLa cells.....	45
2	Cytopathogenic effect of HSV-2 in HeLa cells..	45
3	Staining of plaque assay.....	46
4	A greenish-yellow fluorescence of HSV-2 infected cells.....	47
5	The red background without fluorescence of uninfected cells.....	47
6	Checker board titration.....	48
7	Illustration of ELISA-plate.....	49
8	Determination for the optimal concentration of antigen.....	74
9	Determination for the optimal dilution of conjugate.....	75
10	Optimum of time for antigen and antibody reaction.....	76
11	Optimum of time for antibody and conjugate reaction.....	77
12	Determination of time course for color development.....	78

ABBREVIATIONS

°C	=	degree celsius (centrigrade)
CPE	=	Cytopathogenic effect
CMV	=	Cytomegalovirus
CV	=	Coefficient of Variation
EBV	=	Epstein-Barr virus
ed.	=	editor
e.g.	=	exempli gratia
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	=	et alii
FBS	=	Fetal bovine serum
Fig.	=	Figure
gm	=	gram
h	=	hour
HSV	=	Herpes simplex virus
i.e.	=	id est
IFA	=	Indirect immunofluorescent antibody technic
Ig	=	Immunoglobulin
L	=	liter
MEM	=	Minimal essential medium
mg	=	milligram
µg	=	microgram
min	=	minutes
ml	=	milliliter

µl	=	microliter
N	=	Normality
no.	=	number
O.D.	=	optical density
OPD	=	O-phenylenediamine
PBS	=	Phosphate buffer saline
PFU	=	Plaque forming unit
RIA	=	Radioimmunoassay
r.p.m.	=	revolution per minute
SD	=	Standard Deviation
vol.	=	Volume
VZV	=	Varicella zoster virus