

ซาบิตา ประจําพะติ: การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อไวรัสไข้เลือดออก และการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงผลโปรตีนบนผิวเฟจ ในการศึกษาวิจัยโรคไข้เลือดออก
(INVESTIGATION OF HUMAN IMMUNE RESPONSES TO DENGUE VIRUS AND THE APPLICATION OF PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY IN DENGUE RESEARCH)
อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 145 หน้า

คำสำคัญ: ไวรัสเดงกี/ฟลาวิไวรัส/ปฏิกิริยาข้าม/การวินิจฉัย/การบำบัด/การเพิ่มประสิทธิภาพที่ขึ้นอยู่กับแอนติบอดี/การแสดงผลออกของฟาจ/โดเมนของฉันทามติ III (cEDIII)/แอนติบอดีสลับลำดับ/อิมมูโนเซนเซอร์

ไวรัสเดงกี (DENV) เป็นไวรัสตระกูลฟลาวิวิรีเดที่มีอยู่เป็นพาหะ ซึ่งเป็นภัยคุกคามด้านสาธารณสุขระดับโลกโดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อน โดยก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยในระดับต่างๆ ตั้งแต่ไข้เล็กน้อยไปจนถึงไข้เลือดออกและภาวะช็อกที่รุนแรง ไวรัสเดงกีมี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เดงกี 1 ถึง เดงกี 4 การติดเชื้อสายพันธุ์หนึ่งจะให้ภูมิคุ้มกันแบบชั่วคราวต่อสายพันธุ์อื่น และอาจเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรครุนแรงขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำซ้อนจากสายพันธุ์อื่นเนื่องจากมีกลไกการเสริมฤทธิ์ของแอนติบอดี การที่ยังไม่มีวัคซีนที่สามารถป้องกันได้ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ ประกอบกับการแพร่กระจายของไวรัสเดงกีและยุงพาหะไปในวงกว้าง จึงมีความจำเป็นในการทำวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อพัฒนาการวินิจฉัย, ยาต้านไวรัส, วัคซีนที่ให้การป้องกันได้อย่างครอบคลุม และแนวทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การศึกษานี้มุ่งเน้นการวิเคราะห์ลักษณะทางโมเลกุลของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศเนปาลและประเทศไทย การประเมินรูปแบบการเกิดภูมิคุ้มกันข้ามกับฟลาวิไวรัสชนิดอื่น ๆ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงผลโปรตีนบนผิวเฟจ โดยใช้โปรตีนโดเมน III ส่วน envelope (cEDIII) เพื่อพัฒนาแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งไวรัสและพัฒนาวิธีการวินิจฉัยใหม่ที่สามารถตรวจจับแอนติบอดีต่อเดงกีได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำโดยใช้ cEDIII ในการศึกษาใช้วิธีการที่หลากหลายและเสริมกันในกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน ในประเทศเนปาลมีผู้ป่วยต้องสงสัยติดเชื้อเดงกีจำนวน 49 ราย ในฤดูระบาดปี 2017 โดยใช้การวิเคราะห์ทางซีรัมและพันธุกรรม ส่วนในประเทศไทยมีการเก็บตัวอย่างเลือดในระยะเฉียบพลัน จำนวน 60 ตัวอย่าง ตัวอย่างระยะพักฟื้น 25 ตัวอย่าง (28 - 45 วัน) และตัวอย่างในการติดตามระยะยาวจำนวน 6 ตัวอย่าง (1 ปี) จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและโรงพยาบาลสิคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันทางโมเลกุลประกอบด้วย การตรวจหาแอนติเจน NS1 การตรวจหาแอนติบอดี IgM/IgG โดยวิธีอีไลซ่า การตรวจหาและแยกสายพันธุ์ของไวรัสด้วยเทคนิค qRT-PCR การเพาะเลี้ยงและแยกไวรัส การหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไวรัสต่อฟลาวิไวรัสหลายชนิด (PRNT) สำหรับการพัฒนาแอนติบอดี ใช้เทคโนโลยีการแสดงผลโปรตีนบนผิวเฟจ โดยใช้โปรตีนโดเมน III ส่วน envelope เป็นเป้าหมายในการคัดกรองจากคลังเฟจเอชซีเอฟวี (scFv) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์ชนิด impedimetric แบบไม่ต้องใช้สารติดฉลาก โดยใช้ขั้วไฟฟ้าทองคำที่เคลือบด้วยแอนติเจน cEDIII สำหรับตรวจแอนติบอดีได้อย่างรวดเร็ว

จากกลุ่มตัวอย่างในประเทศเนปาล พบว่าผู้เข้าร่วมการศึกษา 21 ราย จากทั้งหมด 49 ราย (43%) ตรวจพบแอนติเจน NS1 โดยมีลักษณะโปรไฟล์ของ IgM/IgG ที่หลากหลายซึ่งบ่งชี้ถึงการติดเชื้อทั้งแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ มีตัวอย่าง 7 รายที่ตรวจพบอาร์เอ็นเอ (RNA) ของไวรัสเดงกีด้วยเทคนิค RT-PCR (DENV-2 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ DENV-3 จำนวน 1 ตัวอย่าง) โดย DENV-2 เป็นสายพันธุ์หลักที่พบ การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนมพบความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศสิงคโปร์ (ปี 2016) และอินเดีย (ปี 2017) โดยพบแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งไวรัสในซีรัมร้อยละ 66 และร้อยละ 58 มีภูมิคุ้มกันข้ามกับหลายสายพันธุ์ สำหรับกลุ่มตัวอย่างจากประเทศไทย ตัวอย่างในระยะเฉียบพลันจำนวน 34 รายจาก 60 ราย แสดงผลเป็นบวกต่อแอนติเจน NS1 21 ราย แสดงผลบวกต่อแอนติบอดี IgM ต่อไวรัสเดงกี 44 รายแสดงผลบวกต่อแอนติบอดี IgG และ 25 รายเป็นแสดงผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี qRT-PCR ตรวจพบไวรัสเดงกีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (DENV-1 2 และ 4) โดยสามารถแยกไวรัส DENV-1 และ DENV-2 จากการเพาะเชื้อได้สำเร็จ พบการติดเชื้อทุติยภูมิมากกว่าการติดเชื้อปฐมภูมิ การทดสอบการยับยั้งไวรัส พบว่ามีแอนติบอดีต่อ DENV-1 และ DENV-3 ในระดับสูง อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าประหลาดใจที่พบว่าแอนติบอดีต่อไวรัสซิกา (ZIKV) และไวรัสสมองอักเสบญี่ปุ่น (JEV) มากกว่าแอนติบอดีต่อ DENV-2 และ DENV-4 นอกจากนี้ยังพบแอนติบอดีที่ยับยั้งไวรัสไข้เหลือง (YFV) ซึ่งไม่ได้ระบาดในประเทศไทย แสดงถึงความคล้ายคลึงกันของแอนติเจนของไวรัสเดงกี อีกทั้งการคัดแยกด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ สามารถระบุแอนติบอดี IgG ชนิด cross-reactive ได้ 4 ชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งไวรัส DENV-1 ถึง DENV-4 ได้ในระดับที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ภูมิโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกแยะตัวอย่างผู้ป่วยได้อย่างชัดเจน มีศักยภาพสูงในด้านการวินิจฉัย ณ จุดให้บริการ

โดยสรุปการศึกษานี้เผยให้เห็นถึงรูปแบบการเกิดภูมิคุ้มกันข้ามระหว่างฟลาวิไวรัสในผู้ป่วยต้องสงสัยติดเชื้อเดงกีในพื้นที่ระบาดต่างๆซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับความรุนแรงของโรคและความท้าทายในการวินิจฉัย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการเกิดภูมิคุ้มกันข้ามในระดับสูงระหว่างเดงกีและฟลาวิไวรัสชนิดอื่นๆที่ระบาดร่วมกันในพื้นที่ เน้นย้ำถึงข้อจำกัดของวิธีการวินิจฉัยเพียงวิธีเดียวในพื้นที่ที่มีการระบาดของฟลาวิไวรัสหลายชนิดร่วมกัน ความสำเร็จในการใช้ cEDIII ทั้งในเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจเพื่อพัฒนาแอนติบอดี และในอุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์สำหรับการวินิจฉัย แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของวิธีในงานวิจัยเดงกีอย่างครอบคลุม งานวิจัยนี้แสดงหลักฐานของการสัมผัสกับเดงกีหลายสายพันธุ์และฟลาวิไวรัสอื่นๆ ทั้งในอดีตและปัจจุบัน ซึ่งเน้นย้ำถึงความสำคัญของการผสมผสานการตรวจทางโมเลกุล, ซีรัม และการทดสอบ neutralization เพื่อให้การวินิจฉัยมีแม่นยำมากขึ้น เมื่อพิจารณาร่วมกันข้อมูลที่หลากหลายนี้เน้นถึงความจำเป็นเร่งด่วนในเพิ่มประสิทธิภาพในการเฝ้าระวังโรค การพัฒนาเครื่องมือวินิจฉัยที่ดีขึ้น และการคิดค้นแนวทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพอย่างครอบคลุม พร้อมทั้งเน้นย้ำความเข้าใจในเรื่องภูมิคุ้มกันข้ามระหว่างฟลาวิไวรัส เพื่อการพัฒนาวัคซีนและตอบสนองทางด้านสาธารณสุขต่อการระบาดของเดงกีอย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

SABITA PRAJAPATI: INVESTIGATION OF HUMAN IMMUNE RESPONSES TO DENGUE VIRUS AND THE APPLICATION OF PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY IN DENGUE RESEARCH. THESIS ADVISOR: PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D. 145 PP.

Keywords: Dengue virus/ flaviviruses/ cross-reactivity/ diagnostics/ therapeutics/ antibody-dependent enhancement/ phage display/ consensus envelope domain III (cEDIII)/ neutralizing antibodies/ immunosensor

Dengue virus (DENV), a mosquito-borne pathogen belonging to the *Flaviviridae* family, is a major global public health threat that is mostly found to be endemic in tropical and subtropical regions. It can cause a spectrum of illnesses from mild fever to severe hemorrhagic fever and shock syndrome. DENV exists as four distinct serotypes, namely DENV1 to DENV4. Infection by one provides only temporary cross-protection against others, while potentially increases the risk of severe disease upon subsequent infection from the phenomenon known as antibody-dependent enhancement. The lack of a universal vaccine, with expanding geographic distribution of DENV and its mosquito vectors necessitate ongoing research for improved diagnostics, antivirals, broadly protective vaccines and therapeutics.

This comprehensive study aimed to characterize the molecular profile of immunity to dengue virus infections in Nepal and Thailand, to evaluate cross-reactivity patterns with other flaviviruses, to explore the application of phage display technology utilizing consensus envelope domain III (cEDIII) for developing neutralizing antibodies, and to develop novel diagnostic approaches for rapid and sensitive detection of anti-dengue antibodies based on the reactivity to cEDIII. Multiple complementary approaches were employed across different study populations. In Nepal, 49 patients presenting suspected DENV infection during the 2017 dengue season were assessed using serological and genetic analyses. In Thailand, 60 acute samples, 25 convalescent samples (28-45 days), and 6 long-term follow-up samples (1 year) were collected from Suranaree University of Technology Hospital and Sikhio Hospital in the Nakhon Ratchasima province. The comprehensive immunomolecular analysis methods including: NS1 antigen detection, IgM/IgG enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), real time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) for serotyping, virus culture and isolation, whole genome sequencing, and plaque reduction neutralization tests (PRNT) against multiple flaviviruses. For antibody development, phage display was applied using consensus envelope domain III as a target to screen on the single-chain variable fragment (scFv) libraries. Additionally, a label-free impedimetric immunosensor was developed using gold electrodes modified with self-assembled monolayers of cEDIII antigen for rapid antibody detection.

In the Nepalese cohort, 21 of 49 subjects (43%) were positive for DENV NS1 antigen, with varying IgM/IgG profiles, indicating both primary and secondary infections. Seven samples were RNA-positive by RT-PCR (six DENV-2, one DENV-3), with DENV-2 being the dominant serotype. Whole genome sequencing revealed similarity with strains circulating in Singapore (2016) and India (2017). Neutralizing antibodies were present in 66% of sera tested, with 58% showing cross-reactivity against multiple serotypes. In the Thai cohort, 34 of 60 acute samples were NS1-positive, 21 were anti-DENV IgM-positive, 44 were anti-DENV IgG-positive, and 25 were positive by qRT-PCR. Three serotypes (DENV-1, 2, and 4) were detected, with successful isolation of DENV-1 and DENV-2 from virus culture. Secondary infections were predominant over primary infections. Neutralization assays revealed high neutralizing antibodies against DENV-1 and DENV-3, while surprisingly, antibodies against ZIKV and JEV were higher than those against DENV-2 and DENV-4. Neutralizing antibodies against YFV were also detected despite its non-endemic status in Thailand, suggesting shared antigenic similarity with DENV. Phage display successfully identified four different cross-reactive IgGs capable of neutralizing DENV-1 to DENV-4 to varying extents. The impedimetric immunosensor demonstrated significant analytical differences between patient samples, showing promising potential for point-of-care diagnostics.

Conclusively, the study reveals complex flavivirus cross-reactivity patterns in dengue-suspected cases across different endemic regions, with direct correlations to disease severity and diagnostic challenges. The findings demonstrated substantial serological cross-reactivity between dengue and other co-circulating flaviviruses, emphasizing the limitations of single diagnostic approaches in flavivirus-endemic areas. The successful application of consensus envelope domain III in both phage display for antibody development and biosensor platforms for diagnostics highlights the versatility of this approach for comprehensive DENV research. The study provided evidence for current and past exposure to multiple DENV serotypes and other flaviviruses, underscoring the importance of integrating molecular, serological, and neutralization-based assays for accurate diagnosis. Collectively, these multidisciplinary findings emphasize the urgent need for enhanced surveillance, improved diagnostic tools, and broadly effective therapeutic strategies. They also underline the importance of understanding immune cross-reactivity among flaviviruses to refine vaccine development and public health responses to DENV outbreaks.

School of Biotechnology
Academic Year 2024

Student's Signature.....
Advisor's Signature.....
Co-Advisor's Signature.....