LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

- 7 JUL 1993

IDENTIFICATION OF SPECIFIC ANTIGEN OF *PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI* AND MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION FOR THE DIAGNOSIS OF MELIOIDOSIS

PACHARIN RUGDECH

อภินันทนาการ
จาก
มหาวิทยาลัยมหิดล

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

23103

ชื่อวิทยานิพนธ์ แอนติเจนจำเพาะสำหรับเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* และการผลิตไมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสีส

ผู้วิจัย พัชรินทร์ รักเดช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สถิตย์ สิริสิงห D.M.D., Ph.D.

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ปร.ด.

วันที่สำเร็จการศึกษา 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันนี้ วิธีการทางอิมมูโนวิทยาที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสีสชนิดเฉียบพลัน ยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนัก ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่มีการนำแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคมาใช้ และทำให้วิธีการทางอิมมูโนวิทยาที่ใช้กันอยู่ทั่วไปต้องใช้แอนติเจนชนิดหยาบจากตัวเชื้อก่อโรคมาตรวจหาระดับของแอนติบอดีในน้ำเหลืองของผู้ป่วย จึงทำให้ได้ผลที่ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ผู้ทำจึงได้เตรียมโปรตีนจำเพาะขนาด 19.5 กิโลดาลตัน (fractionated 19.5-kDa antigen) จากแอนติเจนชนิดหยาบที่ได้จากตัวเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (unfractionated *P. pseudomallei* whole cell antigen) เพื่อใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสีสให้ได้ผลดีขึ้น แอนติเจนจำเพาะที่เตรียมขึ้นนี้ได้นำไปใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีในน้ำเหลืองของผู้ป่วยเมลิออยโดสีสชนิดเฉียบพลัน (acute septicemic melioidosis) โดยวิธี indirect ELISA โดยเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น และใช้ผลที่ได้จากการตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธีเดียวกันนี้ทั้งในกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีเชื้อแพร่ระบาด และในกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่แพร่ระบาด เป็นค่าปกติ (baseline) ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธีนี้จะต้องมีค่า (O.D. value) มากกว่าค่าเฉลี่ยของ O.D. ของกลุ่มคนปกติบวกด้วย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{x}$ + 2 S.D.) และการตรวจโดยวิธีนี้ใช้น้ำเหลืองที่เจือจางเป็น 1:250 จากผลการทดลองพบว่าแอนติเจนจำเพาะให้ผลเป็นที่น่าพอใจคือมีความไว 92%, ความจำเพาะ 91%, ค่าของคนเป็นโรคที่ตรวจได้ผลบวก 81% และค่าของคนปกติที่ตรวจได้ผลลบ 96% เมื่อคำนวนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ระบาด หรือมีความไว 82%, ความจำเพาะ 96% ค่าของคนเป็นโรคที่ตรวจได้ผลบวก 94% และค่าของคนปกติที่ตรวจได้ผลลบ 87% เมื่อคำนวนจากค่าเฉลี่ยของกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค

Copyright by Mahidol University

ในการศึกษานี้ ยังได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดหยาบของเชื้อก่อโรคขึ้น เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนในผู้ป่วยเมลิออยโดสิส จากผลการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5F8 ที่ผลิตขึ้นมานั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. pseudomallei* ทั้ง 56 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ 5F8 เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgM และสามารถทำให้ตัวเชื้อก่อโรคเกาะกลุ่ม (agglutinating antibody) จากการทดสอบคุณสมบัติโดยวิธี immunofluorescence test พบว่า 5F8 สามารถจับอย่างจำเพาะที่ผิวของเชื้อก่อโรค จากการนำ 5F8 ไปใช้ในการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี B-SA ELISA (Biotin-Streptavidin ELISA) พบว่าวิธีนี้จะสามารถตรวจหาระดับของแอนติเจนได้ต่ำสุดที่ความเข้มข้น 12.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และข้อมูลขั้นต้นที่ได้จากการตรวจหาระดับแอนติเจนในบัสสาวะของคนปกติที่ผสมแอนติเจนในปริมาณต่าง ๆ เชื่อว่าวิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาระดับแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจที่เป็นบัสสาวะได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะใช้ตรวจหาระดับแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดสิสชนิดเฉียบพลันได้ ผลดีหรือไม่จะต้องทำการทดลองโดยใช้สิ่งส่งตรวจเหล่านั้นมาทดสอบ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Identification of Specific Antigen of *Pseudomonas pseudomallei* and Monoclonal Antibody Production for the Diagnosis of Melioidosis.

Name Pacharin Rugdech

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Stitaya Sirisinha D.M.D., Ph.D.

Surasakdi Wongratanacheewin Ph.D.

Date of Graduation

May 28, B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

The currently used serodiagnostic methods for acute septicemic melioidosis are not yet reliable and satisfactory because of the unavailability of specific antigen. Most reports depend largely on the use of crude unfractionated bacterial extract for the detection of serum antibodies. In this study, fractionated 19.5-kDa antigen was prepared from unfractionated whole cell antigen of *P. pseudomallei* and evaluated for its potential usefulness in the diagnosis of acute septicemic melioidosis. The antigen was used for detecting antibody in sera from patients with acute septicemic melioidosis by indirect ELISA and the results were compared with those from patients with other bacterial infections, using normal human sera from either endemic or nonendemic areas of infection as a baseline. The results were considered positive if the O.D. value of a 1:250 serum dilution were higher than mean +2SD. The fractionated 19.5-kDa antigen exhibited

Copyright by Mahidol University

satisfactory results with 92% sensitivity, 91% specificity, 81% positive predictive value and 96% negative predictive value based on a background obtained with normal sera from the nonendemic area. These value were 82% sensitivity, 96% specificity, 94% positive predictive value and 87% negative predictive value based on normal sera from the endemic area.

Monoclonal antibodies were produced by immunizing BALB/c mice using unfractionated whole cell antigens with a purpose of developing specific reagent for antigen detection. Several specific clones were established and the 5F8 was selected for detailed study because it was highly specific for *P. pseudomallei* and could detect all 56 isolates currently available. It was IgM agglutinating antibody and could bind to the surface envelope of *P. pseudomallei* (detected by immunofluorescence test). This MoAb could be used successfully for detecting antigen based on B-SA ELISA method at the antigen concentration as low as 12.5 ng/ml. The preliminary data using an artificial mixture of antigen with urine or serum from normal individuals showed it to be promising for detecting antigen in the urine. However, whether or not this method will be useful in the diagnosis of acute melioidosis depends on further investigation when clinical specimens are available for analysis.

Copyright by Mahidol University