LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

02 JUN 1992

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROTEIN ANTIGENS OF *PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI*

อภินันทนาการ
จาก
.....

RATCHANEE ATTHI

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

18998

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแอนติเยนของเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei*

ผู้วิจัย รัชนี อัคถิ

บริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สถิตย์ สิริสิงห D.M.D., Ph.D.

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน Ph.D.

ปราณี สิทธิสาร วท.ม.

วันที่สำเร็จการศึกษา ๑๒ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๓๔

บทคัดย่อ

เมลิออยโดสิส เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei*ในประเทศไทย ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันมีรายงานอัตราป่วยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อาการของโรคมีได้หลายแบบตั้งแต่อาการไม่รุนแรงจนถึงมีอาการรุนแรงเฉียบพลันที่มีอัตราการตายสูง ๘๐ ถึง ๙๐ เปอร์เซนต์ ผู้ป่วยยังอาจแสดงอาการคล้ายโรคอื่นๆได้ การวินิจฉัยโรคโดยการแยกเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเป็นวิธีเดียวที่จะวินิจฉัยโรคได้แน่นอนแต่เสียเวลา จึงได้มีการพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาเพื่อการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดี แต่วิธีนี้เป็นปัญหาสำหรับการวินิจฉัยโรคในเขตท้องที่ที่มีการระบาดของโรค เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่จะมีระดับแอนติบอดีอยู่แล้ว ดังนั้นวิธีที่จะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำก็คือ การตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

Copyright© by Mahidol University

การศึกษาครั้งนี้ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ โปรตีนแอนติเจนซึ่งได้จากการสกัดเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* ด้วย veronal buffer แล้วตกตะกอนด้วย Trichloroacetic acid จากนั้น ทดสอบคุณภาพโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี indirect ELISA วิธี immunoblotting และวิธี radioimmunoprecipitation จากการทดลองนี้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* จำนวน ๑๐ โคลน ซึ่งไม่ทำปฏิกริยาคาบเกี่ยวกับโปรตีนแอนติเจนของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆได้แก่ *Ps. aeruginosa, Ps. cepacia, Ps. stuzeri, K. pneumoniae, S.typhi, E. coli* และ *L. pneumophila* แต่เฉพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7B6 ที่ทำปฏิกริยารุนแรงต่อแอนติเจนที่ใช้ในการทดลอง โดยการทดสอบคุณสมบัติทั้งสามวิธี จึงได้นำมาใช้ในการทดลองตรวจหาแอนติเจน พบว่าโดยวิธี B-SA ELISA สามารถตรวจสอบโปรตีนแอนติเจนในสภาพสารละลายได้โดยมีความไวถึง 15 ng/ml แต่เมื่อนำวิธีดังกล่าวมาตรวจหาแอนติเจนในซีรั่มผู้ป่วยพบว่าผลที่ได้เป็นลบทั้งสิ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การเกิด immune complexes ในซีรั่มผู้ป่วย อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีก็อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค โดยการตรวจหาแอนติเจนได้ หากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะที่แตกต่างไปจากแอนติบอดีที่พบในซีรั่มผู้ป่วย ดังนั้นยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ epitope mapping เพื่อแก้ไขอุปสรรคในการตรวจหาแอนติเจนในสภาวะที่มี immune complex

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Protein Antigens of *Pseudomonas pseudomallei*

Name Ratchanee Atthi

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

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

Surasak Wongratanacheewin Ph.D.

Pranee Sithisarn M.Sc.

Date of Graduation 12 November B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Melioidosis is a disease caused by *Pseudomonas pseudomallei*. In Thailand, most of the patients lived in the northeast. At present, melioidosis cases were increasingly reported. The clinical manifestations are variable ranging from chronic to acute fatal septicemia which the mortality rate is 80 - 90 %. Moreover,signs and symptoms of melioidosis can mimic many diseases. Isolation and identification of cultures from patients specimens is the only available confirmatory method for melioidosis but it is time consuming. Serological tests have been

Copyright by Mahidol University

developed and modified for the rapid diagnosis. Most of them are concerned with the detection of antibody. However, these tests are of limited value because of the high background antibody titer in normal individuals, particularly in those resided in the endemic areas of infection . Thus, the antigen detection approach should be the method of choice for a rapid diagnosis.

In the present study, the monoclonal antibodies specific to the protein antigen of *Pseudomonas pseudomallei* (prepared by extracting with veronal buffer and followed by precipitation with trichloroacetic acid) were produced and characterized by indirect ELISA, immunoblotting and radioimmunoprecipitation. Ten specific clones were obtained. They did not cross react with the protein antigens prepared from *Ps. aeruginosa, Ps. cepacia, Ps. stuzeri, K. pneumoniae, S. typhi , E. coli* and *L. pneumophila.* Clone 7B6 was the only one that gave strong reactivity by all three tests in this study and was evaluated for its potential in detecting the *Ps. pseudomallei* antigen. It was found that this clone could detect the protein antigenof *Ps. pseudomallei* in aqueous solution at a concentration as low as 15 ng/ml by B-SA ELISA. However , this clone failed to detect the antigen

Copyright by Mahidol University

in the serum specimens from melioidosis patients. This failure may be due to the presence of immune complexes in the patients sera . Therefore, if the antigen was present in any of the specimen, it must be present at a concentration below 15 ng/ml which was the limit of the sensitivity of the test.

However, it is possible to use MoAb for the detection of antigen in the patients specimens if the MoAb used has specificity that is different from the antibody found in the patient serum. Further studies on the epitope mapping are needed if one wants to overcome the interference by immune complexes

Copyright by Mahidol University