27 JUN 1990

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST METABOLIC PRODUCTS (EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS) OF THE LIVER FLUKE *(OPISTHORCHIS VIVERRINI)*

SORUJSIRI AMORNPUNT

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

อภินันทนาการ
จาก
.....
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1989

14669

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ metabolic products (excretory-secretory antigens) ของพยาธิใบไม้ตับ *(Opisthorchis viverrini)*

ผู้วิจัย โสรัจสิริ อมรพันธุ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สถิตย์ สิริสิงห D.M.D., Ph.D.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ พ.บ.

ปราณี สิทธิสาร วท.ม.

อารยา ชูสัตยานนท์ ปร.ด.

วันที่สำเร็จการศึกษา 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532

บทคัดย่อ

โรคพยาธิใบไม้ตับยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ การวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจากพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ในปัจจุบันใช้วิธีการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ, ของเหลวจากลำไส้ส่วนต้นหรือน้ำดี การวินิจฉัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นการวินิจฉัยที่ไม่สะดวกและให้ผลไม่แน่นอน ดังนั้นการวินิจฉัยโดยวิธีการทางอิมมิวโนวิทยาจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม โดยการตรวจหาปริมาณของแอนติบอดีในน้ำเหลืองและน้ำดีจากผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับและสัตว์ทดลอง การทำแอนติเจนให้บริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอ จึงมีความสำคัญในการที่จะนำมาใช้ในการทดสอบเพื่อเพิ่มความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) จึงเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงวิธีการวินิจฉัยดังกล่าว

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ metabolic products [excretory-secretory (ES) antigens] ซึ่งได้จากการเลี้ยงพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในหลอดทดลองที่มีไกลโคโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล 89 กิโลดาลตันเป็นองค์ประกอบหลัก วิธีที่ใช้ตรวจคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Copyright by Mahidol University

ในการทดลองคือ indirect ELISA และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการทดลองนี้มีทั้งที่จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ตับ *(O. viverrini)* และสามารถทำปฏิกริยาร่วมกับพยาธิอื่น ๆ เช่น พยาธิใบไม้ตับที่พบในประเทศจีนและญี่ปุ่น *(Clonorchis sinensis)*, พยาธิใบไม้เลือด *(Schistosoma mansoni)*, พยาธิใบไม้ตับของสัตว์ *(Fasciola gigantica)*, พยาธิใบไม้ลำไส้ในสัตว์ *(Gigantocotyl siamensis)* และพยาธิตัวจี๊ด *(Gnathostoma spinigerum)* ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7 โคลน (clones) มาทำการทดลองโดยวิธี radio-immunoprecipitation พบว่าทุกโคลนสามารถทำปฏิกริยากับไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 89 กิโลดาลตัน ทั้งที่มีใน ES และ somatic extract ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* แต่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียง 5 โคลนเท่านั้นที่สามารถทำปฏิกริยากับไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 89 กิโลดาลตันใน ES และ somatic extract โดยวิธี immunoblotting และเมื่อได้ศึกษาต่อโดยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 โคลน ให้ปฏิกริยาที่แตกต่างกันออกไป เช่น สามารถทำปฏิกริยาต่อไข่ ท่ออาหาร ผิวชั้นนอก และกล้ามเนื้อของพยาธิใบไม้ตับ ทำให้ผลสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแต่ละโคลนคงจะมีความจำเพาะต่อ epitope ที่อยู่บนโมเลกุลของไกลโคโปรตีนแอนติเจน 89 kD ที่แตกต่างกันออกไป จากผลการศึกษาครั้งนี้จะพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการทดลอง สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงความจำเพาะและความไวในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับโดยวิธีทางอิมมิวโนวิทยา

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Motabolic Products (Excretory-Secretory Antigens) of the Liver Fluke *(Opisthorchis viverrini)*

Name Sorujsiri Amornpunt

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

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

Suttipant Sarasombath M.D.

Pranee Sithisarn M.Sc.

Araya Chusattayanond Ph.D.

Date of Graduation 22 November B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Opisthorchiasis is still an important public health problem in Thailand, especially in the northeastern part of the country. Current methods for the diagnosis of human liver fluke infection caused by *Opisthorchis viverrini* are based on the demonstration of eggs in either stool, duodenal fluid or bile. In order to circumvent the tedious and frequently impractical protocol for microscopic examination, the immunodiagnostic tests have been developed. Immunodiagnostic tests based on analysis of antibody in serum and bile collected from man and animals with opisthorchiasis have been developed by several groups of investigators. However, the development of specific and sensitive tests is essential if one is to have a reliable diagnosis. Much attention has been given to the purification and production of sufficient quantities of antigens

Copyright by Mahidol University

for the test. The availability of monoclonal antibodies therefore play a significant role in this aspect.

In this study, the *in vitro* metabolic products [excretory-secretory (ES) antigen] of adult *Opisthorchis viverrini* which has the 89 kD glycoprotein as its prominent component was used as an immunogen for the production of monoclonal antibody. Mice were immunized with concentrated ES antigen. Antibody reactivity and specificity of the monoclonal antibodies produced were assessed by indirect ELISA. These monoclonal antibodies were subsequently found to be specific exclusively for *O. viverrini* itself but some other also cross reacted with other parasites (*Clonorchis sinensis, Schistosoma mansoni, Fasciola gigantica, Gigantocotyl siamensis* and *Gnathostoma spinigerum*). Seven monoclonal antibodies were studied in details. All immunoprecipitated an antigen of M_r 89 kD from both ¶odinated ES and somatic extract antigen of adults *O. viverrini*. However, only 5 of these 7 monoclonal antibodies were found to react with the 89 kD glycoprotein present in both ES and somatic compartments by immunoblotting. Indirect immunofluorescence of frozen thin sections of adult *O. viverrini* showed that the epitopes reacted with these monoclonal antibodies were present in eggs, cecal surface and its secretions, tegument and tegumental cell and muscle. These monoclonal antibodies can be very helpful for the development of more specific and sensitive immunodiagnostic methods for *O. viverrini* infection. Such an attempt is now being carried out in the laboratory.

Copyright by Mahidol University