

**Thesis Title** Immunological Properties of Monoclonal Antibodies to Antigen 85 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* and Their Application for Rapid Tuberculosis Detection

**Author** Mr. Ponrut Phunpae

**Degree** Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

**Thesis Advisory Committee**

Prof. Dr. Watchara Kasinrerak

Advisor

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana

Co-advisor

Mr. Sakarin Chanwong

Co-advisor

**ABSTRACT**

Tuberculosis (TB) is one of Thailand critical national health problems. At the present, several TB diagnostic methods are available. However, the existing methods still hold its drawbacks. This makes TB diagnosis ineffectiveness. Since the diagnosis of TB is a key element in the efforts for TB treatment and control, an accurate and rapid diagnostic test for TB is urgently needed.

In this study, we aimed to develop a rapid immunodiagnosis for TB using a *Mycobacterium tuberculosis* major secreted protein, antigen 85B (Ag85B), as the target molecule. We aimed to produce antibodies to Ag85B, and employ the produced antibodies for development of immunodiagnostic kit for diagnosis of TB. In our study, by using an advanced molecular biology technique, biotinylated recombinant Ag85 protein was generated. The generated recombinant Ag85 protein was used as immunogen for monoclonal antibody production. Nine monoclonal antibody clones

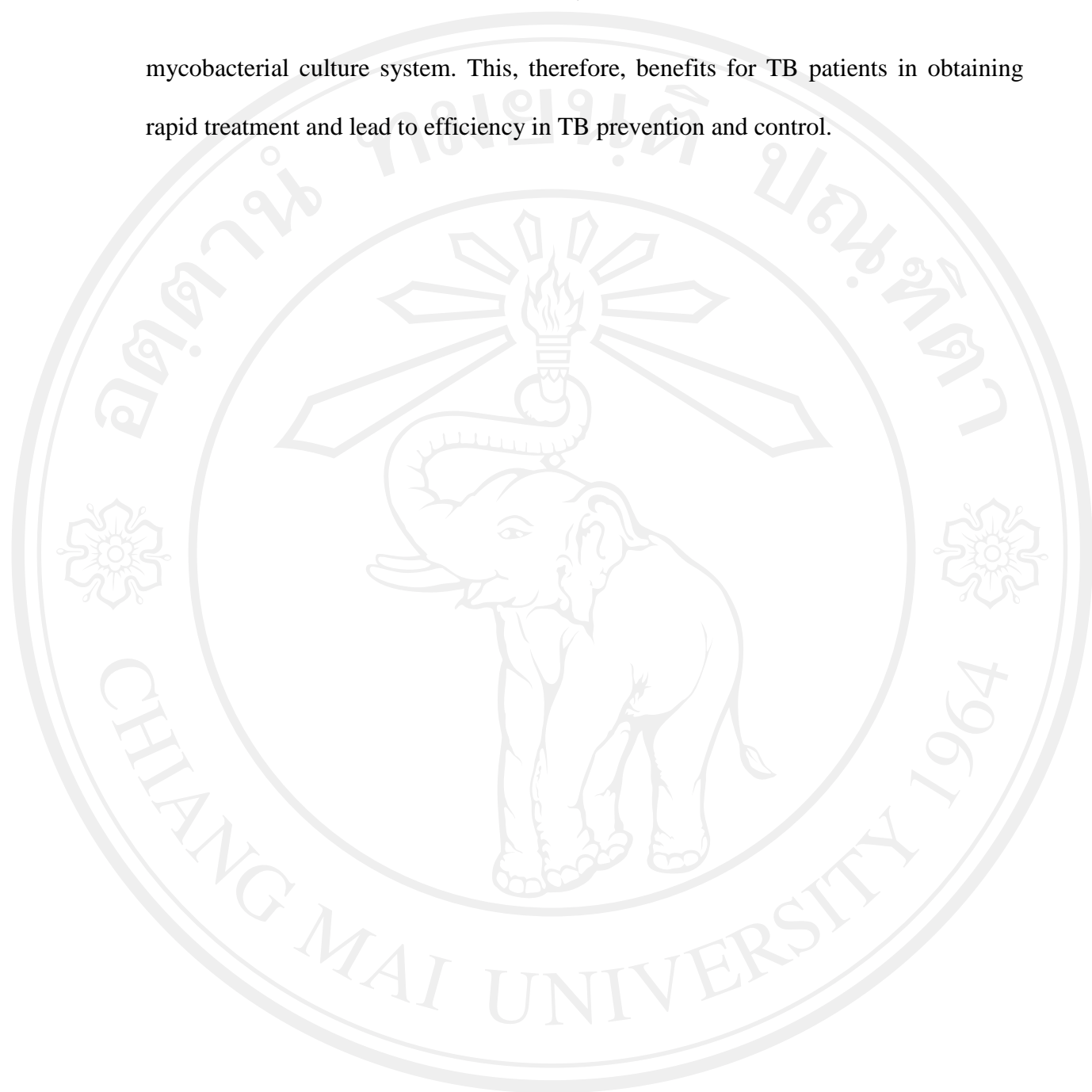
were produced. Some of them reacted to both recombinant Ag85 and native Ag85 protein which was secreted from *M. tuberculosis*. In addition, polyclonal antibodies that reacted to recombinant Ag85 and native Ag85 proteins were also produced. The produced anti-Ag85 antibodies were then employed for the development of ELISA and immunochromatographic strip test for detection of native Ag85 protein in culture filtrate of *M. tuberculosis* culture and in clinical specimens.

In applying of using the developed methods to detect Ag85 protein in the mycobacterial culture system, we found that the presence of Ag85 proteins in the culture filtrates could be used as diagnostic marker for TB diagnosis. By this Ag85 detection, rapid TB diagnosis was befallen compare to the TB diagnosis using routine standard mycobacterial culture system. From our results, we then suggested a new TB diagnosis strategy. The samples are inoculated and cultured in mycobacteria liquid culture medium. The culture filtrates are taken at day 3, 7, 14 and 28 for detection of Ag85 protein by ELISA. By this strategy, 25%, 50%, 80% and 90% of TB patients will be detected within day 3, week 1, weeks 2 and weeks 4, respectively. This rapid TB diagnosis will lead to the rapid treatment TB patients and TB control effectively.

The developed methods were also employed for the detection of Ag85 protein in serum and sputum for TB diagnosis. Unfortunately, by the developed methods both ELISA and immunochromatographic strip test, detection of Ag85 in the specimens could not be used for diagnosis of TB. We speculate that the presence of Ag85 protein in serum and sputum is too low to be detected by the developed methods.

Taken together, in this study, we have established a new TB diagnosis strategy by detecting Ag85 proteins in culture filtrate of mycobacterial culture. This strategy was demonstrated to overcome the delayed obtaining results of conventional standard

mycobacterial culture system. This, therefore, benefits for TB patients in obtaining rapid treatment and lead to efficiency in TB prevention and control.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนแอนติเจน 85 ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และการประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็ว

**ผู้เขียน** นาย พลรัตน์ พันธุ์แพ

**ปริญญา** วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ศ. ดร. วังระ กสิณฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
นายศักรินทร์ จันทรวงศ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

วัณโรคจัดเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทย ในปัจจุบันวิธีการวินิจฉัยวัณโรคมีอยู่หลายวิธี อย่างไรก็ตาม วิธีเหล่านี้ยังมีข้อด้อยอยู่หลายประการ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการวินิจฉัยวัณโรค เนื่องจากการวินิจฉัยวัณโรคอย่างถูกต้องและรวดเร็วเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษา ป้องกัน และควบคุมโรค ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยวัณโรคที่มีประสิทธิภาพและให้ผลการตรวจที่รวดเร็วจึงมีความจำเป็นและมีความต้องการอย่างเร่งด่วน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อการวินิจฉัยวัณโรคอย่างรวดเร็วโดยมุ่งเน้นการตรวจหาโปรตีน Antigen 85 (Ag85) ซึ่งสร้างและหลั่งโดยเชื้อวัณโรคโดยการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85 และนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยวัณโรค ในการศึกษาี้ โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ผู้วิจัยสามารถผลิต recombinant Ag85 protein ในระบบ *in vivo* biotinylation ได้ และโดยการใช้ recombinant Ag85 protein ที่ผลิตขึ้นเป็น immunogen ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85 ได้ 9 โคลน ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนหนึ่งทำปฏิกิริยาได้กับทั้ง recombinant Ag85 protein และ native Ag85 protein ที่สร้างและหลั่งจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังสามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับทั้ง recombinant Ag85 protein และ native Ag85 protein ได้สำเร็จ ผู้วิจัยได้นำแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาพัฒนาเป็นชุดตรวจชนิด ELISA และชุดตรวจชนิด Immunochromatographic strip test เพื่อตรวจหา native Ag85 protein ใน น้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และในตัวอย่างทางคลินิก

จากการนำวิธีการตรวจหาโปรตีน Ag85 ที่พัฒนาขึ้น มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาโปรตีน Ag85 ในระบบการเพาะเลี้ยงวัณโรค พบว่าการตรวจพบโปรตีน Ag85 ในน้ำเพาะเลี้ยงวัณโรค สามารถนำมาใช้วินิจฉัยวัณโรคได้ โดยพบว่าวิธีนี้สามารถลดระยะเวลาการวินิจฉัยวัณโรคได้อย่างมาก เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงวัณโรคมาตรฐานที่ใช้ในงานประจำวัน จากผลการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้นำเสนอระบบการวินิจฉัยวัณโรครูปแบบใหม่ โดยในการวินิจฉัยวัณโรคให้น้ำตัวอย่างตรวจไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จากนั้นเก็บน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อมาตรวจโปรตีน Ag85 โดยวิธี ELISA ในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 และโดยวิธีนี้สามารถออกผลการวินิจฉัยวัณโรคได้ 25% ในวันที่ 3, ได้ 50% ใน 1 สัปดาห์, ได้ 80% ใน 2 สัปดาห์ และได้ 90% ใน 4 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งการออกผลการวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็วนี้ จะทำให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการรักษาที่รวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพและยังจะนำสู่การควบคุมการแพร่ของวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย

ผู้วิจัยได้นำวิธีการตรวจหาโปรตีน Ag85 ที่พัฒนาขึ้น มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาโปรตีน Ag85 ในซีรัมและเสมหะเพื่อการวินิจฉัยวัณโรค อย่างไรก็ตาม พบว่าโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคโดยการตรวจซีรัมหรือเสมหะได้ ทั้งนี้จะเป็นเพราะในสิ่งส่งตรวจดังกล่าวมีโปรตีน Ag85 ในปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะตรวจได้โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำเสนอระบบการวินิจฉัยวัณโรครูปแบบใหม่โดยอาศัยการตรวจหาโปรตีน Ag85 ในน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค โดยระบบที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถแก้ปัญหาค่าได้รับผลการวินิจฉัยล่าช้าของระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบันลงได้ ระบบนี้ที่พัฒนาขึ้นมานี้จึงมีประโยชน์อย่างมากต่อผู้ป่วยวัณโรคที่สามารถเข้าถึงการรักษาได้อย่างรวดเร็ว และยังนำไปสู่การควบคุมการแพร่กระจายของวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย