Abstract

Project Code : MRG5580012

Project Title : Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal and polyclonal antibodies against Cathepsin L (CatL) for diagnosis of fasciolosis caused by *F. gigantica*

Investigator : Mr. Panat Anuracpreeda, Division of Agricultural Science, School of Interdisciplinary, Mahidol University, Kanchanaburi Campus

E-mail Address : panat.anu@mahidol.ac.th, Panat1@yahoo.com

Project Period : 2 years

The purpose of this research was to produce, characterize and purify the monoclonal antibody (MoAb) and polyclonal antibody (PoAb) specific against recombinant cathepsin L (rCatL) of *Fasciola gigantica* and use both antibodies to study the distribution of this antigen and application in immunodiagnosis of animal fasciolosis. Hybridoma secreting MoAb reactive against rCatL was obtained from fusion of rCatL-immunized spleen cells of BALB/C mouse with mouse myeloma cells. All clones of hybridoma that produce MoAb specific to rCatL, as assayed by ELISA and EITB analysis, were used for cross-reactivities studies and localization of the antigen in tissues of each developmental stage of *F. gigantica* by mean of indirect immunoperoxidase technique. Purified specific antibodies rCatL of *F. gigantica* were used to develop both sandwich ELISA and tested for CatL in sera of experimentally infected mice as well as naturally infected ruminants. Results showed that MoAbs showed stronger reaction with rCatL. In addition, these MoAbs also exhibited strong reaction with native CatL in whole body (WB) fraction, and excretory-secretory (ES) fraction of *F. gigantica*. Moreover, no cross-reaction was detected in the WB antigens from other parasites as compared to that from *F. gigantica*. Immunoperoxidase staining of frozen sections of adult parasites by using these MoAbs indicated that CatL was detected in both caecal epithelium and in the lumen of the caecum of metacercariae, NEJ, 1, 3, 5-week-old juveniles and adult *F. gigantica*, while the tegument, tegumental cells, and parenchymal cells were not stained. Sandwich ELISA showed the number of sera examined and the number and percentages designated positive for day 1 to 35 of infection. The mean optical density (OD) from infected mice sera were significantly different from those of control sera at day 1, 4, 7 ($p < 0.05$), 21 and 35 ($p < 0.01$) post infection. Detectable antigen levels in sera peaked at day 35 post infection. Therefore, this method exhibited an accuracy of 98.5% of experimently infected mice and of 98.9% of naturally infected ruminants.

Keywords: *Fasciola gigantica*; cathepsin L; monoclonal antibody; cross-reaction; sandwich ELISA

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580012

ชื่อโครงการ : การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจวินิจฉัยโรค fasciolosis จากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *Fasciola gigantica* แบบ sandwich ELISA โดยใช้โมโนโคลนัลและโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน Cathepsin L

ชื่อนักวิจัย : นายปณัฐ อนุรักษ์ปรีดา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร สำนักวิชาสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี

E-mail Address : panat.anu@mahidol.ac.th, Panat1@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต ศึกษาคุณลักษณะ และการทำให้บริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)และโพลีโคลนัลแอนติบอดี (PoAb) ที่มีความจำเพาะต่อ recombinant cathepsin L (rCatL) ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* และใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีดังกล่าวในการศึกษาตำแหน่งการกระจายตัวของแอนติเจนชนิดนี้และใช้ประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อในสัตว์ที่เป็นโรค Fasciolosis ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rCatL ได้มาจากการทำปฏิกิริยารวมตัวกันของเซลล์ myeloma และเซลล์จากม้ามของหนูทดลอง ซึ่งสามารถตรวจคุณสมบัติของโมโนโคลนัลแอนติบอดีดังกล่าวได้ด้วยวิธี indirect ELISA และ EITB เพื่อนำมาศึกษา cross-reaction และ การกระจายตัวของแอนติเจนในเนื้อเยื่อระยะต่างๆของพยาธิใบไม้ตับโดยใช้วิธี indirect immunoperoxidase แอนติบอดีที่มีความบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในการใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อในสัตว์ที่ติดโรคทั้งในห้องทดลองและ ติดโรคตามธรรมชาติด้วยวิธี sandwich ELISA ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงต่อ rCatL รวมถึงมีความจำเพาะสูงต่อ native CatL ในสารที่สกัดได้จากทั้งตัวพยาธิและสารคัดหลั่งจากพยาธิ และมีความจำเพาะสูงต่อ native CatL นอกจากนี้แล้วจากการศึกษาไม่พบ cross-reaction กับแอนติเจนของพยาธิใบไม้ พยาธิตัวตืด และพยาธิตัวกลมชนิดอื่นๆ จากการศึกษาพบว่า CatL มีการกระจายตัวมากอยู่ที่บริเวณเยื่อบุผิว caeca และ lumen ของ caeca ของเมตาเซอร์คาเรีย ตัวอ่อนระยะแรก ตัวอ่อนอายุ 1, 3 ,5 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* จากการศึกษาด้วยวิธี sandwich ELISA พบว่าสามารถตรวจพบ CatL จากซีรัมของหนูทดลองตั้งแต่วันที่ 1 - 35 ของการติดโรค ค่า OD เฉลี่ยของหนูทดลองที่ติดโรคมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า OD เฉลี่ยของหนูทดลองที่ไม่ติดโรคหรือกลุ่มควบคุม ดังนี้ วันที่ 1, 4, 7 ($p < 0.05$), 21 และ 35 ($p < 0.01$) ระดับของแอนติเจนในซีรัมขึ้น peak ณ วันที่ 35 หลังการติดโรค ค่าความแม่นยำในการตรวจสอบเท่ากับ 98.5% ในหนูทดลองและ 98.9% ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ติดโรคจากธรรมชาติ

คำหลัก: พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*; cathepsin L; โมโนโคลนัลแอนติบอดี; cross-reaction; sandwich ELISA