

Abstract

Project Code : RSA6080071

Project Title : Development of direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal and polyclonal antibodies specifically against major surface proteins (MSPs) for diagnosis of anaplasmosis caused by *Anaplasma marginale*

Investigator : Dr. Panat Anuracpreeda, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University

E-mail Address : panat.anu@mahidol.ac.th, panat.anu@mahidol.edu

Project Period : 3 years

The aim of this study was to clone and characterize recombinant major surface protein of *Anaplasma marginale* (rAmMSP) in order to produce, characterize and purify the monoclonal antibody (MoAb) and polyclonal antibody (PoAb) specific against rAmMSP and use both antibodies to study the distribution of this antigen and application in immunodiagnosis of animal anaplasmosis. The rAmMSP were expressed. Hybridoma secreting MoAb reactive against rAmMSP was obtained from fusion of rAmMSP-immunized spleen cells of BALB/C mouse with mouse myeloma cells. All clones of hybridoma that produce MoAb specific to rAmMSP, as assayed by ELISA and immunoblotting analysis, were used for cross-reactivities studies and localization of the antigen by means of indirect immunofluorescence technique. Localization of *Anaplasma* parasites by immunofluorescence showed these parasites are distributed on both the membrane and the outside of infected erythrocytes. Purified specific antibodies against rAmMSP were used to develop both sandwich ELISA and tested for MSP in sera of naturally infected ruminants. The results showed that MoAbs showed stronger reaction with rAmMSP. In addition, these MoAbs also exhibited strong reaction with native MSP of *A. marginale*. Moreover, no cross-reaction was detected in the native antigens from other parasites as compared to that from *A. marginale*. Sandwich ELISA exhibited an accuracy of 98.9%.

Keywords: *Anaplasma marginale*; *msp* gene; recombinant protein; monoclonal antibody; cross-reaction; sandwich ELISA

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA6080071

ชื่อโครงการ : การพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค anaplasmosis จากการติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือด *Anaplasma marginale* แบบ sandwich ELISA โดยใช้โมโนโคลนัลและโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ major surface proteins (MSPs)

ชื่อนักวิจัย : นายปณัฐ อนุรักษ์ปรีดา กลุ่มสาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์การแพทย์ระดับโมเลกุล สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : panat.anu@mahidol.ac.th, panat.anu@mahidol.edu

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและศึกษาคุณลักษณะของ recombinant major surface protein ของเชื้อ *Anaplasma marginale* (rAmMSP) เพื่อผลิต ศึกษาคุณลักษณะ และการทำให้บริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) และโพลีโคลนัลแอนติบอดี (PoAb) ที่มีความจำเพาะต่อ rAmMSP ของเชื้อ *A. marginale* และใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีดังกล่าวในการศึกษาตำแหน่งการกระจายตัวของแอนติเจนชนิดนี้และใช้ประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อในสัตว์ที่เป็นโรค anaplasmosis จากการศึกษาพบว่าไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rAmMSP ได้มาจากการทำปฏิกิริยารวมตัวกันของเซลล์ myeloma และเซลล์จากม้ามของหนูทดลอง ซึ่งสามารถตรวจคุณสมบัติของโมโนโคลนัลแอนติบอดีดังกล่าวได้ด้วยวิธี indirect ELISA และ immunoblotting เพื่อนำมาศึกษา cross-reaction และการกระจายตัวของแอนติเจนในในตัวเชื้อศึกษาด้วยวิธี indirect immunofluorescence พบการกระจายตัวของเชื้อที่เยื่อหุ้มและนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง แอนติบอดีที่มีความบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในการใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อในสัตว์ที่ติดโรคตามธรรมชาติด้วยวิธี sandwich ELISA ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงต่อ rAmMSP รวมถึงมีความจำเพาะสูงต่อ native MSP นอกจากนี้แล้วจากการศึกษาไม่พบ cross-reaction กับแอนติเจนของเชื้อชนิดอื่น วิธี sandwich ELISA ค่าความแม่นยำในการตรวจสอบเท่ากับร้อยละ 98.9

คำหลัก: เชื้อพยาธิในเม็ดเลือด; *Anaplasma marginale*; ยีน *mosp*; recombinant protein; โมโนโคลนัลแอนติบอดี; cross-reaction; sandwich ELISA