

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

“การดำเนินงานวิจัยในขั้นแรกของการประยุกต์ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี

เพื่อการวิจัยเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*”

66	รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	616.0793 ส839ร	
----	---------------------------	----------------	--

สุภิญญา พงษ์สังข์

ปัทมา เอกโพธิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

616.0793
ส839ร

616.0793

ศ 8395

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

“การดำเนินงานวิจัยในขั้นแรกของการประยุกต์ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี
เพื่อการวิจัยเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*”

14 ก.ค. 2540

สุภิญญา พงษ์สังข์

ปัทมา เอกโพธิ์



ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

67445

บทนำ

โรค Melioidosis เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียชนิด *Burkholderia pseudomallei* โรคนี้พบชุกชุมในแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางตอนเหนือของ ทวีปออสเตรเลีย (1) ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้พบได้ทุกวัย และมีลักษณะอาการได้หลายแบบคือ เชื้อแพร่เข้าสู่กระแสเลือด (septicemia) และเชื้อจะอยู่เฉพาะที่ (localized infection) ซึ่งพบได้เกือบทุกอวัยวะในร่างกาย การวินิจฉัยโรคโดยดูลักษณะอาการอย่างเดียวไม่สามารถแยกจากโรคติดเชื้อชนิดอื่นได้ นอกจากนั้นการติดเชื้อที่มีการแพร่เข้าสู่กระแสเลือดเป็นอันตรายและอาจทำให้คนไข้เสียชีวิตได้ภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง หลังจากคนไข้ได้รับเชื้อ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคนี้จึงต้องการการทดสอบที่ถูกต้องและรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ในการรักษาคนไข้ได้อย่างถูกต้องและทันท่วงที

การวินิจฉัยโรค Melioidosis ทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันทำได้โดยวิธีเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ และทำการพิสูจน์เชื้อที่ได้โดยวิธีทางชีวเคมี โดยวิธีดังกล่าวจะใช้เวลาอย่างน้อย 3-4 วัน จึงจะสามารถทราบผลซึ่งเข้าเกินไปสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาคนไข้ นอกจากนี้วิธีดังกล่าวข้างต้นยังมีการตรวจวินิจฉัยโรค Melioidosis โดยวิธีทางอิมมูโน โดยตรวจหาแอนติบอดี (1-11) หรือตรวจหาแอนติเจน (12, 13) ซึ่งผลจากการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีนี้จะรวดเร็วกว่าวิธีเพาะเชื้อ โดยใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีทางอิมมูโนโดยเฉพาะการตรวจหาแอนติบอดี ยังคงมีปัญหาในแง่ความจำเพาะของวิธีทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวินิจฉัยในแหล่งที่มีโรคนี้ชุกชุม ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนที่นำมาใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่นั้นเป็นแอนติเจนที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (crude antigen) (1-9) จึงมีแอนติเจนคาบเกี่ยวกับแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้มีผู้พยายามตรวจสอบหาแอนติบอดีในผู้ป่วยโดยใช้แอนติเจนที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified antigen) (10, 11) ซึ่งผลการทดสอบทำให้สามารถลดปัญหาการเกิดผลบวกปลอมได้ แต่อย่างไรก็ตามประชากรที่อยู่ในดินแดนที่มีโรคชุกชุมจะมีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรีนี้อยู่ในน้ำเหลืองอยู่แล้ว (14, 15) ทำให้รบกวนการแปลผลการตรวจได้ นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์ ต้องเตรียมจากแบคทีเรียจำนวนมาก ซึ่งเป็นอันตรายเนื่องจากการติดต่อของแบคทีเรียชนิดนี้ติดต่อโดยทางเดินหายใจและโรคนี้เป็นโรคที่รุนแรง จึงเป็นการไม่ปลอดภัยที่จะเตรียมแอนติเจน ดังกล่าวนำมาใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค ส่วนการตรวจหา

แอนติเจนนั้นยังไม่ได้ผลดีนัก เนื่องจากยังมีผลลบปลอม (false negative) เนื่องจากเชื้อในเลือดมีจำนวนน้อย หรือคนไข้ได้รับยาปฏิชีวนะมาแล้ว

ดังนั้นการตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นการตรวจหาแอนติบอดี หรือตรวจหาแอนติเจน ซึ่งมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่รวดเร็วเพื่อเป็นประโยชน์ในการรักษาคนไข้ได้ทันทั่วทั้งนั้น ยังต้องทำการตรวจวินิจฉัยโดยการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และพิสูจน์เชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องอีกครั้ง (14, 15)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า การแก้ไขปัญหานี้จำเป็นต้องมีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยวินิจฉัยโรค Melioidosis ให้ได้ผลถูกต้องรวดเร็วและแม่นยำขึ้น คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตเซลล์ลูกผสมที่หลั่งโมโนโคลนัลแอนติบอดี ที่สามารถทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มอย่างจำเพาะกับแบคทีเรียชนิด *Burkholderia pseudomallei* เท่านั้น เพื่อนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรค Melioidosis ต่อไป เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรค Melioidosis ในปัจจุบันทำโดยการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจและต้องพิสูจน์เชื้อต่อด้วยวิธีทางชีวเคมี ซึ่งใช้เวลาอย่างน้อย 3-4 วัน และคณะผู้วิจัยจะนำโมโนโคลนัลที่ผลิตได้ไปใช้ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจ เพื่อให้ทราบผลการตรวจที่รวดเร็วกว่าการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี ซึ่งจะทำให้สามารถทราบผลการตรวจวินิจฉัยได้ภายใน 24 ชั่วโมง

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ขอรับทุนสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยในขั้นแรกของการประยุกต์ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี เพื่อการวินิจฉัยเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในการดำเนินงานวิจัยในขั้นแรกมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี และการเลี้ยง Myeloma cell line เพื่อใช้ในขบวนการผลิตเซลล์ลูกผสมที่หลั่งโมโนโคลนัลแอนติบอดี

วัสดุและอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ชนิดที่ไม่มีส่วนประกอบของโปรตีน ประกอบด้วย
 - glycine
 - dextose
 - disodium phosphate
 - sodium chloride
 - Distilled water
2. อาหารเลี้ยงเซลล์ (Myeloma cell line)
 - RPMI 1640
 - Fetal bovine serum
 - L-Glutamine
 - 2-Mercaptoethanol
 - Penicillin - Streptomycin
3. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* (petri disc)
4. ขวดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (Sterile flask) สำหรับเลี้ยง Myeloma cell line
5. หลอดพลาสติกใส่ Myeloma cell line สำหรับแช่แข็ง (Biofreeze vial)
6. ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ 37°C
7. ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ 37°C ที่ปรับปริมาณความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator)
8. ตู้เก็บ Myeloma cell line ที่อุณหภูมิ -196°C (Liquid Nitrogen Tank)
9. เครื่องปั่นความเร็วรอบสูง และปรับอุณหภูมิได้
10. เครื่องกรองและกระดาศกรองที่มีรูขนาด 0.45 μ เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์
11. ชุดน้ำยาตรวจหาปริมาณโปรตีน

วิธีการ

1. การผลิตแอนติเจนจากเชื้อ *B. pseudomallei*

ทำการเพาะเลี้ยง *B. pseudomallei* ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย โดยสูตรที่ไม่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ ประกอบด้วย glycine 1 กรัม, disodium phosphate 0.25 กรัม, sodium chloride 0.5 กรัม และ dextose 0.2 กรัม ทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้ *B. pseudomallei* พักตัวที่ 37°C ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมนี้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำไปปั่นแยกเอาเชื้อแบคทีเรียออกที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวหลังจากการปั่น นำไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง (membrane filter) ที่มีรูขนาด 0.45 μ หลังจากนั้นจะทำให้แอนติเจนที่ปะปนอยู่ในส่วนของเหลวเข้มข้นขึ้นโดยขบวนการทำให้แห้ง (Lyophilization)

2. การเลี้ยง Myeloma cell line

ในขั้นตอนการเลี้ยง Myeloma cell line จะต้องใช้วิธีการทำที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ในทุกขั้นตอน (Sterile technique) ตั้งแต่การเตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเซลล์ โดยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.22 μ อุปกรณ์ทุกชนิดที่ใช้ต้องผ่านขั้นตอนทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ (Sterilization)

เลี้ยง Myeloma cell line ในขวดพลาสติกที่ปราศจากจุลินทรีย์ ขนาด 25 เซนติเมตร อาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย RPMI 1640, 20% Fetal bovine serum, 2mM L-Glutamine, 50 mM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin และ 0.1 mg/ml Streptomycin เลี้ยงไว้ใน CO₂ incubator ในขณะที่ต้องการใช้ Myeloma cell line ในขบวนการผลิตเซลล์ลูกผสมที่หลังโมโนโคลนัลแอนติบอดี วันถัดมาจะถ่ายเซลล์ครึ่งหนึ่งลงในขวดพลาสติกใบใหม่ และเติมอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาตรเท่าเดิม ลงในขวดพลาสติกทั้ง 2 เป็นการเพิ่มจำนวน Myeloma cell ทำเช่นนี้จนกว่าจะได้จำนวน Myeloma cell ตามต้องการ ในขณะที่ยังไม่ต้องการใช้ Myeloma cell line สามารถจะเก็บเซลล์ดังกล่าวแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -196°C โดยเก็บไว้ใน Liquid Nitrogen tank วิธีการคือ นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในขวดพลาสติกใส่ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไป

ปั่นที่ 1,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เทส่วนของเหลวข้างบนทิ้ง นำเซลล์ที่ตกตะกอนละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้สำหรับแช่แข็งเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย RPMI 1640, 50% Fetal bovine serum, 10% DMSO จำนวน 1 มิลลิลิตร และใส่ลงในหลอดพลาสติกที่ใช้ในการแช่แข็ง จากนั้นนำหลอดไปแช่ใน Liquid Nitrogen Tank และเมื่อต้องการใช้ก็สามารถละลายเอา Myeloma cell line นี้ออกมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิตแอนติเจน

คณะผู้วิจัยเตรียมแอนติเจนที่มีปริมาณโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตร ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร แอนติเจนที่ได้ เป็นแอนติเจนที่ถูกปล่อยออกจากตัวเชื้อ *B. pseudomallei* ในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยละลายผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากปั่นและแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ออกไปแล้ว จึงพบว่าปริมาณแอนติเจนที่เตรียมมีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถึงอย่างไรก็ตามแอนติเจนที่เตรียมได้นี้มีความเป็นอิมมูโนเจนสูง กล่าวคือสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดีโดยพบว่าเมื่อทดลองฉีดแอนติเจนนี้เข้าไปในหนูทดลอง และทดสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เตรียมได้ พบว่าสามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูง ซึ่งแอนติเจนที่เตรียมได้นี้ได้นำไปใช้ฉีดกระตุ้นหนู และนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากหนูตัวนั้นมาผสมกับ Myeloma cell line ผลิตเป็นเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อไป

2. การเลี้ยง Myeloma cell line

คณะผู้วิจัยได้เก็บ Myeloma cell line แข็งแรงไว้ใน Liquid Nitrogen tank และสามารถนำออกมาเลี้ยงเพื่อใช้งานต่อไปได้เมื่อต้องการ โดยผู้วิจัยได้เติมไนโตรเจนเหลวลงในถัง เพื่อรักษาอุณหภูมิ -196°C อยู่ตลอดเวลา

3. นอกจากการดำเนินงานวิจัยในขั้นแรกที่คณะผู้วิจัยได้เสนอขอทุนไปแล้วนั้น คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมโดยใช้แอนติเจนที่เตรียมขึ้นได้นี้ ศึกษาความเป็นไปได้ของแอนติเจนนี้ในการวิจัยโรคแมลลิออยโดสิส ดังรายละเอียดในนิพนธ์ต้นฉบับที่ดีพิมพ์ในเวชสาร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่แนบไว้ท้ายรายงานการวิจัยฉบับนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Alexander AD, Huxdoll DL, Warner AR Jr, Shepler V, Dorsey A. Serological diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination and complement fixation tests. Appl Microbiol 1970 ; 20, 825-833.
2. Appassakij H, Silpapojakul KR, Wansit R, Pornpakul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area. Am J Trop Med Hyg 1990 ; 42, 248-253.
3. Kunaphun P, Thirawattanasuk N, Suputtamonkol P, Naigowit P, Dance DAB, Smith MD, White NJ. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei* : a prospective in 1000 hospitalized children in northeast Thailand. J Infect Dis 1993 ; 167, 230-233.
4. Ashdown LR. Demonstration of human antibodies to *Pseudomonas psedomallei* by indirect fluorescent antibody staining. Pathology 1981 ; 13, 579-601.
5. Ashdown LR. Relationship and Significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and subclinical melioidosis. J Clin Microbiol 1981 ; 14, 361-364.
6. Khupulsup K, Petchelai B. Application of indirect fluorescent antibody test for IgM antibody for diagnosis of melioidosis in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1986 ; 35, 366-369.
7. Ashdown LR, Johnson RW, Koehler JM, Cooney CA. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. J Infect Dis 1989 ; 160, 253-260.
8. Kunakorn M, Boonma P, Khupulsup K, Petchelai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 1990 ; 28, 1249-1253.

9. Kunakorn M, Petchclai B, Khupulsup K, Naigowit P. Gold blot for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG specific antibodies for rapid serodiagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 1991 ; 29. 2065-2067.
10. Anuntagool N, Rugdech P, Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficiency for diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 1993 ; 31, 1232-1236.
11. Petkanchanapong V, Naigowit P, Kondo E, Kanai K. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infection (Melioidosis). Asian Pacific J Allergy Immunol 1992 ; 10, 145-150.
12. Ismail G, Noor Embi M, Omar O, Allen JC, Smith CJ. A comparative immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. J Med Microbiol 1987 ; 23, 353-357.
13. Wongratanacheewin S, Tattawasart U, Lulitanond V. An avidinbiotin-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Pseudomonas pseudomallei* antigens. Trans R Soc Trop Med Hyg 1990 ; 84 : 429-430.
14. Dance DAB. Melioidosis : the tip of the iceberg. Clin Microbiol Rev 1991 ; 4, 52-60.
15. Kanai K, Kondo E. Recent advances in biochemical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (*Pseudomonas pseudomallei*). Jpn J Med Sci Biol 1994 ; 47, 1-45.

การเตรียมโปรตีนแอนติเจนจากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และความเป็นไปได้ในการวินิจฉัยโรค แมลลิออยโดสิส

สุกัญญา พงษ์สังข์, วทม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)*
ปัทมา เอกโพธิ์, ปร.ด. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)*

บทคัดย่อ

โปรตีนแอนติเจนที่ถูกปล่อยออกนอกตัวเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมให้ปราศจากโปรตีน ซึ่งใช้ศึกษาในการทดสอบนี้ เรียกว่า culture filtrate แอนติเจนที่เตรียมได้ มีความเข้มข้นของโปรตีน วัดได้ 2 มก/มล เมื่อนำโปรตีนแอนติเจนนี้มาใช้ทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในน้ำเหลืองของคนไข้แมลลิออยโดสิส และในคนปกติที่มีถิ่นพำนักอยู่ในบริเวณชุกชุมของโรค พบว่ามีความไว 80 % และความจำเพาะ 90.6 % จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแอนติเจนที่เตรียมได้จากการทดสอบนี้ มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการวินิจฉัยโรคแมลลิออยโดสิส

Abstract

Evaluation the possibility of culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei* for diagnosis of melioidosis

Supinya Pongsunk, M.Sc. (Microbiology)*

Pattama Ekpo, Ph.D. (Microbiology)*

The protein concentration of culture filtrate antigen (CF antigen) of *Burkholderia pseudomallei* prepared in this study was 2 mg/ml. The CF antigen was used for detecting the antibody level of melioidosis patients and normal sera from endemic area. The sensitivity and specificity was found to be 80 % and 90.6 % respectively. The study showed that the CF antigen has a potential used in diagnosis of melioidosis.

(MJS 1996 ; 3 : 22 - 25)

Introduction

Melioidosis is the infection caused by the bacterium *Burkholderia pseudomallei*¹. *Burkholderia pseudomallei* (formerly called *Pseudomonas*

pseudomallei) is endemic in northeastern region of Thailand². The organisms are inhabitants in soil, streams and stagnant water³. The clinical manifestation of melioidosis is vary from localized to septicemic infection⁴. Early diagnosis is necessary for proper

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

management because death may occur within 24 to 48 hours after the onset of infection⁵.

Definitive diagnosis of melioidosis are based on bacteriological culture and identification. Because the method is time-consuming (at least 3-4 days) and the result is often too late to be useful, a number of serological tests have been developed to provide rapid and presumptive evidence of the infection^{2, 5-8}. However, a number of serological tests currently available are lack of specificity in areas of high melioidosis prevalence. The problem is most likely related to the use of crude antigens which cross-react with other bacteria.

The purposes of present study were to prepare the antigen more specific for *Burkholderia pseudomallei* and to explore its potential used in the diagnosis of melioidosis.

Materials and Methods

Preparation of antigen

Crude culture filtrate CF antigen of *B. pseudomallei* was prepared by culture *B. pseudomallei* in protein-free broth (glycine 1 gram, disodium phosphate 0.25 gram, sodium chloride 0.5 gram and dextrose 0.2 gram made to 100 milliliters by distilled water) incubated at 37°C for 2 weeks. The antigen, which solubilized in supernatant was separated by centrifugation at 10000 xg for 30 minutes at 4°C, then filtered through 0.45 µm membrane filter. The preparation was concentrated by lyophilized and stored at 4°C. Protein concentration of crude culture filtrate antigen was determined by commercial protein assay and using bovine serum albumin as a standard.

Clinical specimens

Serum specimens were collected from 20 patients with hemoculture positive for *B. pseudomallei* and 32 normal sera from endemic area (Khon Kaen Province).

Antibody production

Ten micrograms of crude culture filtrate of *B. pseudomallei* in 100 µl of normal saline solution (NSS) mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant were injected intraperitoneally into mice. Booster by intravenous injection with the same dose of antigen in NSS. One week later serum samples were collected and stored at -20°C until required for used.

Screening anti-CF antigen antibody of *B. pseudomallei*

Indirect enzyme linked immunosorbent assay (Indirect ELISA) employing crude culture filtrate antigen of *B. pseudomallei* coated microelisa plate was used. Two micrograms per millilitre of CF antigen were diluted in 0.05 M Carbonate buffer (pH 9.6) at 4°C overnight. After washing the plate with 0.05 % V/V Tween 20 in NSS (Tween saline), blocked with 1 % BSA-Tween saline at 37 °C for 1 hour then washed. Patient's sera or normal sera at dilution of 1:200 (in 1 % BSA-Tween saline) was added to the plate and incubated at 37 °C for 1 hour. The plate was washed again and biotinylated anti human immunoglobulin at dilution of 1:40000 was added and incubated at 37 °C for 1 hour, then washed. The 1:40000 avidin conjugated with horseradish peroxidase was added. The plate was incubated at 37 °C for 1 hour and washed. Then the substrate TMB was added and the absorbance value was read at 450 nm. Each sample was performed in duplicate.

Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli⁹. The antigen was subjected to SDS-PAGE in 10 % acrylamide gel and 3.5 % stacking gel. After electrophoresis the gel was stained with Coomassie blue for detection of protein.

Results

Characterization of *B. pseudomallei* culture filtrate antigen

The culture filtrate of *B. pseudomallei* was prepared from 500 millilitres of protein-free culture broth. After lyophilization, the CF antigen was resuspended with distilled water to protein concentration of 2 mg/ml. A total volume of this preparation was 2 millilitres. Then, the characteristic pattern of CF antigen was performed by running in SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The results showed only 3 faint bands (too faint to be photographed). Even the little amount of protein antigen presented in the preparation but the immunoreactivity of the antigen with specific antibody raised in mice was strong enough for further study.

Evaluation of the diagnostic potential of *B. pseudomallei* culture filtrate antigen

Mouse polyclonal antiserum raised against CF antigen was used as a positive control in the test system (used anti-mouse immunoglobulin as secondary antibody instead of antihuman immunoglobulin in materials and methods). The results of indirect ELISA are shown in Figure 1. The scattergram presented in fig. 1 shows that cutoff limit at OD 0.2 a large majority of 20 specimens of patients with septicemic melioidosis were positive. On the other hand, only 3 from 32 samples had OD over cutoff value. The sensitivity of the test system was 80 % and the specificity was 90.6 %.

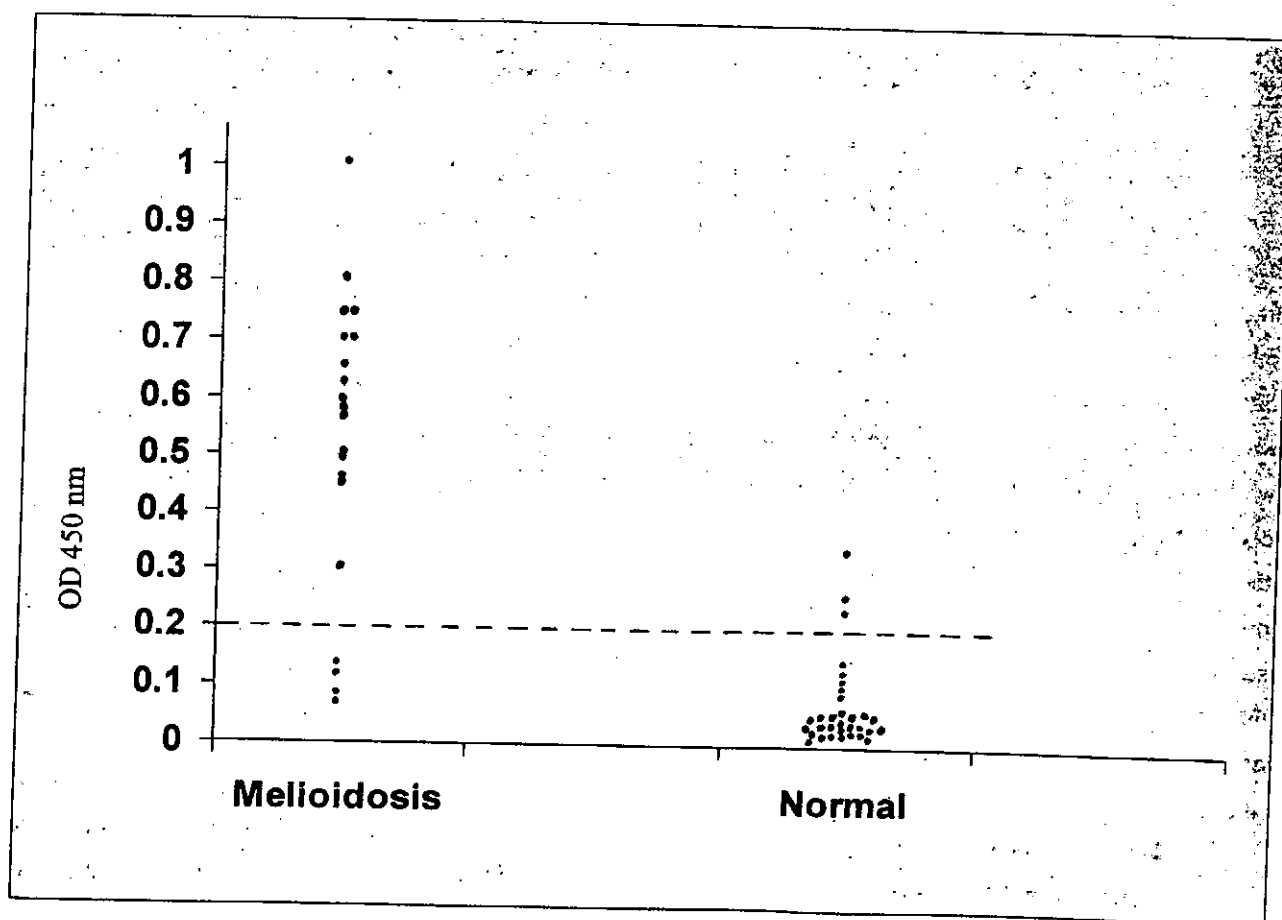


Figure 1 : Scattergram of ELISA. Sera were collected from patients with septicemic melioidosis (20 samples) and normal sera from endemic area (32 samples). Cutoff value is OD 0.2 OD 450 nm ; optical density at 450 nm.

Discussion

The expectation of culture filtrate antigen which shed from the organisms during culture will composed of less complex mixture than crude extract antigen. Thus, this antigen may be more specific. The results presented in this study showed that CF antigen was specific to *B. pseudomallei*, since the preliminary study showed a satisfactory specificity.

Even the CF antigen has a potential used as an antigen for detection of specific antibody in patient's sera, for diagnosis of melioidosis, but bacterium are an hazardous agent (the mode of transmission is by inhalation). The specific component purified by the recombinant DNA technology will be safer than the culture methods and a large quantity of the specific antigen can be purified more easily without variation from lot to lot. Thus, the specific protein component will be purified by using the combination of the MAbs and recombinant DNA technology should be explored for the further study.

Acknowledgement

This work was partial supported by a grant from Srinakharinwirot University. Thanks to Ms. Nuanchan Piyasangthong, Khon Kaen Hospital, for providing the sera from endemic area using in this study.

References

1. Stanton AT, Fletcher W. Melioidosis, a new disease of the tropics. Trans Fourth Congr Far East Assoc Trop Med 1921;2:196-8.
2. Chaowagul W, White NJ, Dance DAB et al. Melioidosis: a major cause of community acquired septicemia in northeastern Thailand. J Infect Dis 1989; 159:890-9.
3. Leelarasamee A. Epidemiology of melioidosis. Infect Dis Antimicrob Agents 1986;3:84-93.
4. Howe C, Sampath A, Spotnitz M. The pseudomallei group, a review. J Infect Dis 1971;124:589-606.
5. Ashdown LR, Johnson RW, Kochler JM, Cooney CA. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. J Infect Dis 1989;160:253-60.
6. Ashdown LR. Relationship and significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and subclinical melioidosis. J Clin Microbiol 1981;14:361-4.
7. Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Pornpatkul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area. Am J trop Med Hyg 1990;42:248-53.
8. Kunakorn M, Boonma P, Khupulsup K, Petchclai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 1990;28:1249-53.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.