Thesis Title Development of Immunoassay for Detecting Vector Control Insecticides in Human Milk Samples from Malaria Endemic Area

Author Mr. Surat Hongsibsong

Degree Doctor of Philosophy (Environmental Science)

Thesis Advisory Committee

Dr. Tippawan Prapamontol	Advisor
Asst. Prof. Dr. Somporn Chantara	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Mookda Pattarawarapan	Co-advisor
Dr. Jiraprapa Wipasa	Co-advisor

ABSTRACT

The objectives of the present study composed of two parts as follows. The objective of part one were to develop an immunoassay for detecting DDT and its metabolites, and to apply the method in analysis of human milk samples from malaria endemic area and part two was to develop an immunoassay for detecting cypermethrin.

In part one, four haptens with similar structure to DDT were prepared and were used to produce antibody to DDT. Briefly, haptens were prepared by using dichlorobenzhydrol (DCBH) and dichlorodiphenylethanol (DDOH) as precursors using succinic and glutaric anhydride as spacer arms. The immunogens were prepared by conjugating haptens with bovine serum albumin (BSA) were named hapten I-BSA (DCBH-succinic-BSA), hapten II-BSA (DCBH-glutaric-BSA), and hapten III-BSA (DDOH-glutaric-BSA) which had hapten density of 15, 14, and 8, respectively. The coating antigens were prepared by using the same haptens conjugated with oval albumin (OVA) were named hapten I-OVA (DCBH-succinic-OVA), hapten II-OVA (DCBH-glutaric-OVA), and hapten III-OVA (DDOH-glutaric-OVA) which had hapten density of 13, 13, and 9, respectively. The immunogens were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

used for producing antibodies. The polyclonal antibody (pAb) from hapten III-BSA showed the best binding activity with *p,p'*-DDE. Then, this antibody was used for developing an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) for detecting *p,p'*-DDE in human milk samples. The ic-ELISA was validated and optimized using spiked skimmed milk. The obtained pAb was specific to *p,p'*-DDE and the IC_{50} was 22.5 ng/mL with cross-reactivity to DDT and metabolites between 0.2 - 112 %. In the process of optimization of ic-ELISA, DMSO at 20% in 0.05% tween-20-PBS was suitable to be used as diluent and had no effect on activity of antibody. The hapten from DCBH conjugated to OVA was found to be the best coating antigen in ic-ELISA system. The average recovery of *p,p'*-DDE was 99.7% (ranging from 88.8-116.8 %). The intra-assay coefficient variations (CV) were 5.7- 10.4 % and the inter-assay CV were 10.6-19.6 %. Limit of detection (LOD) of ic-ELISA was 3.5 ng/mL and limit of quantitation (LOQ) was 10.5 ng/mL. The developed ic-ELISA was applied to detect *p,p'*-DDE in individual human milk samples collected from 245 mothers living in malaria endemic area in Maesot district, Tak province, Thailand. The results from the developed ic-ELISA were compared with the results obtained from GC-ECD. The sensitivity of ic-ELISA was 86.1 % of GC-ECD and their was a significant correlation between the results from the two methods (Pearson correlation: $r = 0.766$, $p<0.05$)

In part two objective was to produce an antibodies to cypermethrin. Two haptens containing major parts, cyclopropane moiety (H1) and aromatic moiety (H2), similar structure to cypermethrin were synthesized. Three immunogens were prepared, two immunogens with each hapten were named H1-BSA, H2-BSA and one immunogen with two haptens was H12-BSA. The hapten densities of H1-BSA, H2-BSA were 8 and 13, respectively. The antibody from H1-BSA immunized mice showed high titers to the hapten. The antibody from H1 immunized mice gave IC_{50} to cypermethrin at 52 μg/mL, the lowest quantification limit of detection of the ELISA was 1.8 μg/mL at 85% B/B0, and the detection limit was 0.39 μg/mL at 90% B/B0. The antibody from H12-BSA immunized mice show high titers of antibody to cypermethrin with IC_{50} of 0.32 ug/mL and LOD was 0.02 ng/mL

In conclusion, an ic-ELISA for detection of insecticides, especially the major DDT metabolite *p,p'*-DDE which is still abundantly contaminated in the environment

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and human has been developed. In addition, the process of happens, immunogens and antibody production of DDT and cypermethrin demonstrated in this study could be employed for further development of this research area.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาอิมมิวโนแอสเซย์สำหรับการตรวจวัดสารฆ่าแมลงควบคุมพาหะนำโรคในตัวอย่างน้ำนมมนุษย์จากพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรีย

ผู้เขียน นายสุรัตน์ หงษ์สิบสอง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.ทิพวรรณ ประภามณฑล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ.ดร.สมพร จันทระ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร.มุกดา ภัทราวราพันธ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร.จิรประภา วิภาษา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นการพัฒนาวิธีอิมมิวโนเอสเซย์ สำหรับการตรวจหาสารดีดีทีและการประยุกต์ใช้ในตัวอย่างนมจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย ในส่วนที่ 2 เป็นการพัฒนาวิธีอิมมิวโนเอสเซย์สำหรับการตรวจสอบไซเปอร์เมทริน โดยในส่วนที่ 1 เตรียมสารแฮปเทน 4 ตัว ที่มีโครงสร้างคล้ายกับดีดีที และใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อดีดีที โดยเตรียมสารแฮปเทนจาก สารไดคลอโรเบนซ์ไฮดรอล (ดีซีบีเอช) และสารไดคลอโรไดฟีนิวเอทานอล (ดีดีโอเอช) เป็นสารตั้งต้น และมีสารซักซินิก และ กลูลตาริก เอซิดแอนไฮไดร์เป็นแขน อิมมิวโนเจนเตรียมจากการต่อสารแฮปเทนด้วยบีเอสเอ ชื่อว่า แฮปเทน1-บีเอสเอ (ดีซีบีเอช-ซักซินิก -บีเอสเอ) แฮปเทน2-บีเอสเอ (ดีซีบีเอช-กลูตาริก -บีเอสเอ) แฮปเทน3-บีเอสเอ (ดีดีโอเอช-กลูตาริก -บีเอสเอ) ซึ่งมีความหนาแน่นของสารแฮปเทนต่อโปรตีน ที่ 15 14 และ 8 ตามลำดับ ตัวเคลือบแอนติเจน เตรียมจาก สารแฮปเทนเดียวกันกับอิมมิวโนเจน ชื่อว่า ว่า แฮปเทน 1-โอวีเอ (ดีซีบีเอช-ซักซินิก -โอวีเอ) แฮปเทน2-โอวีเอ (ดีซีบีเอช-กลูลตาริก -โอวีเอ) แฮปเทน3-โอวีเอ (ดีดีโอเอช-กลูลตาริก -โอวีเอ) ซึ่งมีความหนาแน่น สารแฮปเทนต่อโปรตีน ที่ 13, 13 และ 9 ตามลำดับ อิมมิวโนเจนถูกนำไปใช้ในการผลิตแอนติบอดี โพลีโคลนอลแอนติบอดี (พีเอบี) ที่จับกับพีพี-ดีดีอี ได้ดีที่สุด แอนติบอดีจึงถูกนำไปพัฒนาเพื่อตรวจหา พีพี-ดีดีอี โดยวิธีอินไดเรกคอมเพททิทีพ อีไลซ่า สำหรับการตรวจหา พีพี-ดีดีอี ในตัวอย่างนมของมนุษย์ ซึ่งได้มีการตรวจสอบและปรับให้เหมาะสมโดยใช้นมไขมันต่ำ โพลีโคลนอลที่ได้ มีความจำเพาะเจาะจงกับพีพี-ดีดีอี และ มีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งเท่ากับ 22.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้ามกัน กับสารดีดีทีและเมตาบอไลท์ ที่ร้อยละ 2-112 ในกระบวนการของการเพิ่มประสิทธิภาพ วิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า ดีเอ็มเอสโอที่ระดับ ร้อยละ 20 ใน พีบีเอสที่มี ทวีน- 20 ร้อยละ 0.05 มีความเหมาะสมและไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของแอนติบอดี แฮปเทน1-โอวีเอ เป็นตัวเคลือบเพลทที่ดีที่สุด ของ วิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า การศึกษาการกลับคืนของพีพี-ดีดีอี เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 99.7 การทดสอบความแม่นยำภายในการวิเคราะห์ตัวอย่างภายในวันเดียวกัน มีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เท่ากับ 5.7 – 10.4 และ ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนระหว่างการวิเคราะห์แต่ละวัน เท่ากับ 10.6-19.6 ค่าขีดจำกัดของการวัดของวิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า คือ 3.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ 10.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า ที่ได้พัฒนาแล้วนี้ ได้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพีพี-ดีดีอี ในตัวอย่างนมจากมารดาที่อาศัยอยู่ในพื้นที่แพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในเขตอำเภอแม่สอดจังหวัดตาก จำนวน 245 ตัวอย่าง ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจพบโดยวิธี จีซี-อีซีดี ผลคือ วิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่าตรวจพบร้อยละ 86.1 ของ วิธี จีซี-อีซีดี และให้ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญเพียร์สันกับผลที่ได้จาก วิธี จีซี-อีซีดี ที่ระดับ 0.05 (อาร์ = 0.766)

ส่วนที่ 2 พัฒนา แอนติบอดีต่อ ไซเปอร์เมทริน โดยการสังเคราะห์สารแฮปเทน ที่มีส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนไซโคลโพรเพน (เอช 1) และ ส่วน อะโรมาติก (เอช2) เตรียม 3 อิมมิวโนเจนจากสารแฮปเทนที่ได้แต่ละตัว ชื่อว่า เอช1-บีเอสเอ เอช2-บีเอสเอ และอิมมิวโนเจนจาก 2 แฮปเทนรวมกัน คือ เอช12-บีเอสเอ ความหนาแน่นเอช1-บีเอสเอ และเอช2-บีเอสเอ คือ 8 และ 13 ตามลำดับ ความไวและความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ จากเอช1-บีเอสเอ มีค่า ร้อยละ 50 ของการยับยั้งของไซเปร์เมทริน ที่ 52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าขีดจำกัดของ การวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ 1.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ ร้อยละ 85 ของการยับยั้งด้วยไซเปอร์เมทริน และ ค่าขีดจำกัดของการวัด ของวิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า คือ 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ร้อยละ 90 ของการยับยั้งด้วยไซเปอร์เมทริน แอนติบอดีจาก เอช12-บีเอสเอมีการตอบสนองที่ดีที่จะมีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งด้วยไซเปอร์เมทรินเท่ากับ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าขีดจำกัดของการวัดของวิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า คือ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสรุปคือ ได้มีการพัฒนาวิธีอินไดเรก คอมเพททิทีพ อีไลซ่า สารเมตาบอไลท์หลักของดีดีที โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดีดีอี ที่มีการปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมและมนุษย์ นอกจากนี้ กระบวนการของสารแฮปเทน อิมมิวโนเจน และการผลิตแอนติบอดีต่อดีดีทีและไซเปอร์เมทรินสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยในทีทีลักษณะคล้ายกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved