การศึกษาอมีบไซล์ไลเสทของแมงดาจาน และแมงดาถ้วย เพื่อตรวจสอบเอ็นโดท็อกซิน : การเตรียม และคุณสมบัติบางประการ

นาย พอ บุญยรัตพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-962-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015983

THE STUDIES OF AMOEBOCYTE LYSATE FROM THAI HORSESHOE CRABS (TACHYPLEUS GIGAS AND CARCINOSCORPIUS ROTUNDICAUDA) FOR DETECTION OF ENDOTOXIN : PREPARATION AND SOME PROPERTIES.

Mr. Por Punyaratabandhu

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1989

ISBN 974-576-962-2

Thesis Title: The Studies of Amoebocyte Lysate from Thai Horseshoe Crabs (Tachypleus gigas and Carcinoscorpius rotundicauda) for Detection of endotoxin:Preparation and Some Properties.

By Mr. Por Punyaratabandhu

Inter-Department Medical Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. Med. Vet.

Co-Advisors Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D.

Instructor Kreingsak Saitanu, Ph.D.

Accepted by Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.

.....Thavorn Vajrabhya.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Somjai Reinprayoon.....Chairman

(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

.....Somatat Wongsawang.....Thesis Advisor

(Associate Professor Somatat Wongsawang, D.V.M. ,Dr.Med.Vet.)

.....Nikom Chaisiri.....Co-Advisor

(Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D.)

.....Kreingsak Saitanu.....Co-Advisor

(Instructor Kreingsak Saitanu, D.V.M., Ph.D.)

.....Bruce L. Reynolds.....member

(Professor Bruce L. Reynolds, Ph.D.)

Good Luck!

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้แต่เพียงแผ่นเดียว

พอ บุญยรัตพันธุ์: การศึกษาอะมีโบไซล์ไลเสทของแมงดาจาน และแมงดาถ้วย เพื่อตรวจสอบเอ็นโดท็อกซิน:การเตรียม และคุณสมบัติบางประการ [THE STUDIES OF AMOEBOCYTE LYSATE FROM THAI HORSESHOE CRABS (TACHYPLEUS GIGAS AND CARCINOSCORPIUS ROTUNDICAUDA) FOR DETECTION OF ENDOTOXIN : PREPARATION AND SOME PROPERTIES.] อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. นสพ.ดร. ไสมหัต วงศ์สว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.นิคม ชัยศิริ, อ.นสพ.ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู, 98 หน้า.

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาการเตรียมอะมีโบไซล์ไลเสทจากแมงดาทะเล พบว่าสามารถตรวจพิษในตัวเอง (endotoxin) ได้ในระดับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่าย เพื่อใช้ในการตรวจสอบพิษในตัวเองมีความไว 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ศึกษาการเตรียมอะมีโบไซล์ไลเสทจากแมงดาจาน และแมงดาถ้วย เพื่อตรวจสอบพิษในตัวเอง พร้อมทั้งคุณสมบัติบางประการของอะมีโบไซล์ไลเสท โดยเฉพาะความไวในการตรวจหาพิษในตัวเอง

จากการศึกษาการเตรียมอะมีโบไซล์ไลเสทพบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 0.025 M ใน เกลือ 3% และวิธีการทำให้อะมีโบไซล์แตกโดยการแช่แข็งและละลาย (freeze and thaw) นั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมและพบว่าสามารถตรวจหาพิษในตัวเองได้ในระดับ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แม้ว่าปริมาณโปรตีนของอะมีโบไซล์ไลเสทที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้ง มีความแตกต่างกัน แต่ความไวในการตรวจสอบไม่เปลี่ยนแปลง

การตรวจหาพิษในตัวเองด้วยวิธี tube method พบว่าระยะเวลาของปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเกิด gelation คือ 60 นาที และของวิธี micro test method คือ 30 นาที โดยมีความเข้มข้นของแมกนีเซียม 50 มิลลิโมลา เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้พบว่าวิธี tube method มีความสะดวกและเหมาะสมในการตรวจหาพิษในตัวเอง

ในการทดสอบหาความจำเพาะของอะมีโบไซล์ไลเสทต่อบักเตรี ที่ถูกฆ่าด้วยการนึ่งความร้อน (autoclave-killed bacteria) พบว่าสามารถตรวจหาพิษในตัวเองของบักเตรีแกรมลบที่มีระดับปริมาณเซลจำนวนน้อยส่วนบักเตรีแกรมบวกและยีสต์ ต้องใช้ในระดับปริมาณเซลสูงกว่า

การตรวจสอบพิษในตัวเองของยาฉีดที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่า 2 ตัวอย่างมีระดับพิษในตัวเองต่ำกว่า 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2 ตัวอย่างมีระดับพิษในตัวเองอย่างน้อย 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีอะมีโบไซล์ไลเสท เนื่องจากมีสารยับยั้งปฏิกิริยา

อะมีโบไซล์ไลเสทที่เตรียมขึ้นนี้มีอายุการใช้งานได้นานประมาณ 60 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ แต่ไม่สามารถใช้งานได้เมื่อทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilization)

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2532 .....

นิพนธ์ต้นฉบับเหล่านี้เป็นวิทยานิพนธ์ในการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POR PUNYARATABANDHU: THE STUDIES OF AMOEBOCYTE LYSATE FROM THAI HORSESHOE CRABS (TACHYPLEUS GIGAS AND CARCINOSCORPIUS ROTUNDICAUDA) FOR DETECTION OF ENDOTOXIN: PREPARATION AND SOME PROPERTIES. THESIS ADVISOR: SOMATAT WONGSAWANG, D.V.M., Dr. Med. Vet., CO-ADVISORS: NIKOM CHAISIRI, Ph.D. AND KREINGSAK SAITANU, D.V.M., Ph.D., 98 PP.

There were two reports in Thailand concerning preparation of amoebocyte lysate from Thai horseshoe crabs and the lysate could detect endotoxin in the level of 0.1 mg/mL and 0.625 ug/mL which was nearly 200 times difference in their sensitivity. This lysate was far less sensitive than that of commercial ones (0.1 ng/mL). Therefore, the aim of this thesis was to prepare amoebocyte lysate from Thai horseshoe crabs (*Tachypleus gigas* and *Carcinoscorpius rotundiccauda*) and evaluate some of their properties, especially sensitivity of the lysate.

The preparation of the lysate was carried out by varying EDTA concentration and techniques of cell lysis, and was concluded that 0.025 M EDTA in 3% sodium chloride and freeze and thaw technique were the most suitable. The sensitivity of the prepared lysate from both species of the horseshoe crabs was found to be 0.1 ng/mL of endotoxin. The protein content of the lysate was variable, whereas the sensitivity was uniform.

The optimal incubation period for gelation reaction was found to be 60 minutes for the tube method and 30 minutes for the micro test method. The optimal magnesium ions concentration added to enhance the gelation reaction was found to be 50 mM. For the method for detection of end-point of gelation between tube method and micro test method it was concluded that tube method was more practical.

For the specificity of the lysate to autoclave killed bacteria it was found that gram negative bacteria gave good gelation reaction at low concentration, and gram positive bacteria and yeast gave gelation reaction at higher concentration of killed organisms.

The detection of endotoxin was also carried out in twenty-five parenteral products. It was found that 2 samples had endotoxin below 0.1 ng/mL, other 2 samples contained endotoxin higher than 0.1 ng/mL. Endotoxin in 3 samples could not be determined by this amoebocyte lysate test since there was a inhibiting factor in the samples.

The detection level of the lysate after lyophilization was higher than 100 ng/mL and could not be used for the assay. The frozen lysate at -20°C remained active at least for 60 days.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต P. Punyaratabandhu

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somatat Wongsawang

Nikom Chaisiri

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGMENT

I wish to convey my sincere gratitude to the following persons or institutions who have helped, supported and advised me in this work.

My obligatory appreciation to:

My advisor, Associated Professor Somatat Wongsawang, D.V.M., Dr. Med. Vet., Microbiology unit, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, my co-advisor Associate Professor Nikom Chaisiri, Ph.D., and Instructor Kriengsak Saitanu, D.V.M., Ph.D. for their, kindness, devotion, valuable suggestion, attention, and encouragements throughout my work. I thank you and am most grateful.

Associate Professor Suprawat Chutiwonge, M.D., Director of Queen Soavabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, for his encouragement and support of my study.

Instructor Anan Chongthaleong, M.D. and Associate Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D. for their valuable help, friendly suggestion and encouragement.

Associate Professor Dirok Yenbutra, M.D., for his valuable suggestion and understanding.

Khun Unchalee Chancham, librarian of Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her valuable assisting of the facility.

We are indebted to committee of Marine life Resource for

partial funding of this work and to committee of Graduate School for research grant.

The staff of Queen Soavabha Memorial Institute, especially Rabies Production Unit and Microbiology Unit of Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for providing necessary facilities of this work.

The staff of QSMI-Diatech, especially Khun Doungchan and staff of Antimicrobial Susceptibility Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for providing computer and necessary facility in preparation of this thesis.

Finally but the most grateful to my father and mother for their encouragement and understanding, and to my wife for her patiently encouragement, understanding, and partial help in typing of the thesis. And to all those persons, who cannot be named individually, have given support and considerations.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

		Page
THAI ABSTRACT		iv
ENGLISH ABSTRACT		v
ACKNOWLEDGMENT		vi
CONTENTS		viii
LIST OF TABLES		xi
LIST OF FIGURES		xiii
ABBREVIATIONS		xiv
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
	OBJECTIVE OF THE THESIS	2
	LITERATURE REVIEW	3
	ENDOTOXIN	3
	PYROGEN TEST	9
	Rabbit pyrogen test	10
	Amoebocyte lysate test	13
	History of Amoebocyte lysate	16
	Endotoxin standard	17
	Identification of Pyrogenic Level	18
	Biochemistry of Amoebocyte Lysate	20
	Preparation of Amoebocyte Lysate	24

Methods of endotoxin detection..... 26

Application of Amoebocyte lysate test... 28

II MATERIALS AND METHODS..... 33

1. Horseshoe crabs..... 33

2. Treatment of glassware and plasticware..... 33

3. Preparation of amoebocyte lysate..... 34

3.1 Haemolymph collection..... 34

3.2 Preparation of Amoebocyte..... 37

3.3 Test of osmolarity..... 37

3.4 Lysis of the amoebocyte..... 37

4. Protein content determination..... 38

5. Endotoxins..... 40

5.1 Working standard endotoxin (WSE).... 40

5.2 Reference endotoxin (RE)..... 40

5.3 Standard endotoxin (SE)..... 41

6. Commercial Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)..... 41

7. Performance of the amoebocyte lysate endotoxin assay. 42

7.1 Tube method..... 42

7.1.1 Interpretation of result.. 42

7.2 Micro test method..... 43

7.2.1 Interpretation of result.. 43

8. Addition of magnesium ions..... 44

9. Optimal incubation period of the lysate assay..... 44

10. Specificity of the lysate..... 45

11. Lyophilization of the lysate..... 49

12. Shelf life test..... 49

13. Detection of endotoxin in parenteral fluid or drugs.. 50

III **RESULTS**..... 52

Preparation of amoebocyte lysate..... 52

Preliminary trials..... 52

Actual preparation of amoebocyte lysate. 53

Osmolarity test..... 55

Protein content of amoebocyte lysate..... 55

Sensitivity of amoebocyte lysate..... 58

Optimal incubation period..... 61

Specificity of endotoxin test..... 62

Detection of endotoxin in commercial parenteral products 64

Shelf life of the lysate..... 64

IV **DISCUSSION**..... 67

REFERENCES..... 77

APPENDIX..... 91

BIOGRAPHY..... 98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Biological activities of LPS.....	5
2.	Pyrogenicity of whole gram negative bacteria.....	7
3.	Comparative characters of four species of horseshoe crabs	15
4.	Partial amino acids sequencing.....	22
5.	Grading of positive gelation from Jorgensen 1973.....	28
6.	Types of the crabs, sex, lot no., and sources.....	36
7.	Details of preliminary experiments.....	38
8.	Preparation of magnesium chloride concentration.....	44
9.	Bacterial organisms, sources, and media used in culture.	46
10.	Types and codes of unknown samples.....	50
11.	Arrangement of the unknown sample testing.....	51
12.	Volume of pack cell and lysate per crab with their ratio	53
13.	Volume of pack cell and lysate per crab with their ratio	54
14.	Protein content of amoebocyte lysate.....	57
15.	Sensitivity test of GAL.....	58
16.	Sensitivity test of CAL.....	59
17.	Optimal concentration of magnesium ions.....	59
18.	Optimal incubation period of tube method.....	61
19.	Optimal incubation period of micro test method.....	61
20.	Bacterial organism cells per mL with their dilution.....	62
21.	Reactions of amoebocyte lysate, TF-03 with killed organisms.....	63
22.	Reactions of amoebocyte lysate, CF-04 with killed	

organisms..... 63

23. Amoebocyte lysate test with unknown samples..... 64

24. The activity of the lysate in different period..... 66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	General outer appearance of horseshoe crabs.....	14
2.	Transverse section of horseshoe crabs.....	15
3.	General schematic of gelation.....	23
4.	Endotoxin-mediated proteolytic conversion of coagulogen.	23
5.	Haemolymph collection.....	35
6.	Experimental design of LPS. preparation.....	48
7.	Standard protein curve.....	56
8.	Arrangement of sensitivity test.....	60
9.	Firm gelation reaction of tube method.....	60
10.	Protocol procedure for amoebocyte lysate preparation....	70
	Schematic diagram of LPS.....	96
	Amoebocyte under microscope (400x).....	97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

BSA	=	bovine serum albumin
CAL	=	*C. rotundicauda* Amoebocyte Lysate
CF	=	female *C. rotundicauda*
CM	=	male *C. rotundicauda*
Co.	=	company
EDTA	=	sodium ethylenediaminetetraacetate
e.g.	=	example gratia (Latin), for example
ELISA	=	Enzyme Linked Immunoadsorbant Assay
et al	=	et alli (Latin), and other
g.	=	gram(s)
g	=	gravity force
GAL	=	*T. gigas* Amoebocyte Lysate
GNB	=	Gram-negative bacteria
HIMA	=	Health Industry Manufacturing Association
hr(s).	=	hour(s)
IgG	=	Immunoglobulin G
Kg.	=	kilogram
L	=	litre
LAL	=	Limulus Amoebocyte Lysate
LPS.	=	Lipopolysaccharide
Ltd.	=	limited
M	=	molar
mbar	=	millibar

mg	=	milligram
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
min.	=	minute(s)
mL	=	milliliter(s)
mM	=	millimolar
mm.	=	millimeter(s)
M.W.	=	molecular weight
NaCl	=	sodium chloride
NEM	=	N-ethylmaleimide
ng	=	nanogram(s) = 10^{-9} g.
ng/mL	=	nanogram(s) per milliliter
nm.	=	nanometer(s)
NO.	=	number(s)
PBS	=	Phosphate buffer saline
PDA	=	Parenteral Drug Association
pg	=	picogram(s) = 10^{-10} g.
R.P.M.	=	round per minute
r.p.m.	=	round per minute
RIA	=	Radio Immunoassay
S.N.	=	serial number
TF	=	female *T. gigas*
TM	=	male *T. gigas*
TPD	=	Threshold pyrogenic dose
USP	=	United States Pharmacopiea
ug	=	microgram(s) = 10^{-6} g.
ug/mL	=	microgram(s) per milliliter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

uL	=	microliter(s)
∝	=	alpha
B	=	beta
°C	=	degree celsius
mOsm	=	milliosmolarity

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย