Cairo University
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Microbiology

Name: **Elham Fadl Abdel-Hamid Hussein El-Sergany**(Egyptian)
Birth of date: 13-11-1976 (Giza)
The Degree: Doctor of Philosophy in Veterinary Science.
Specialization: Microbiology (Bacteriology-Mycology-Immunology).
Title of Thesis : Production and characterization of monoclonal antibody against tuberculosis

Supervisors : Prof. Dr. Kamelia Mahmoud Osman Ahmed (Faculty of Veterinary Medicine - Cairo University).

Prof. Dr. Roukaya Mohamed Osman Mohamed (Veterinary Serum and Vaccine Research Institute - Abbassia – Cairo).

Key words : *(M. bovis* - tuberculosis - monoclonal antibodies).

Abstract

Tuberculosis considered as a major disease problem in human and veterinary medicine. In this study one monoclonal antibody (MAb) was produced against purified protein derivative of *Mycobacterium bovis* reacted in Western blot test with a single band of 66 kDa. This MAb was used in competitive ELISA as a diagnostic tool and by comparing the results of competitive ELISA and indirect ELISA it revealed high specificity and sensitivity of competitive ELISA than indirect ELISA which make it a good diagnostic tool for diagnosis of tuberculosis. From the results of this study it is recommend that the development of such a diagnostic tool for diagnosis of bovine tuberculosis for better control of the disease spread and ultimately eradication of the disease with minimum cost.

جامعة القاهرة
كلية الطب البيطري
قسم الميكروبيولوجي

الاسم : إلهام فضل عبد الحميد حسين السرجاني (مصرية)

تاريخ الميلاد : ١٩٧٦/١١/١٣ م (الجيزة)

الدرجة: دكتوراه الفلسفة في العلوم الطبية البيطرية

التخصص: ميكروبيولوجيا (بكتيريولوجيا – أميونولوجيا – ميكولوجيا) ٢٠٠٧

عنوان الرسالة : تحضير أجسام مناعية وحيدة النوع والصفة ضد مرض السل

السادة المشرفين :

ا. د. كامليا محمود عثمان (كلية الطب البيطري – جامعة القاهرة) .

ا.د. رقية محمد عثمان (معهد بحوث الأمصال واللقاحات البيطرية – العباسية – القاهرة)

الكلمات الدالة : (ميكوبكتيريم بوفيس- مرض السل - الأجسام المناعية وحيدة النوع والصفة)

المستخلص

مرض السل يعتبر من أهم الأمراض التي تسبب مشاكل كبيرة علي المستويين البشري والبيطري. في هذه الدراسة تم تحضير واحد من الأجسام المناعية وحيدة النوع والصفة للتيوبركلين النقي (ال ب. ب. د) البقري والذي تفاعل مع طبقة واحدة عند الوزن الجزيئي ٦٦ كيلو دالتون في اختبار التحليل الكهربي اللطعي المناعي. وباستخدام هذا الجسم المناعي وحيد النوع والصفة في اختبار الأليزا التنافسي كوسيلة تشخيصية وبمقارنة نتائج اختبار الأليزا التنافسي و اختبار الأليزا غير المباشر اتضح زيادة حساسية و خصوصية اختبار الأليزا التنافسي عن اختبار الأليزا غير المباشر. ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة ينصح باستخدام هذه الوسيلة التشخيصية لتشخيص مرض السل البقري للحد من انتشار المرض والتخلص من هذا المرض بأقل التكاليف.

List of contents

1 Introduction ---------- 1

2 Review of literature ---------- 5

2.1.Prevalence of tuberculosis among animals and its Control. --------- 5

2.2.Diagnosis of tuberculosis in animals. ---------- 15

2.3.Monoclonal antibodies basic principles and their application in tuberculosis. ---------- 44

3 Materials and methods ---------- 83

3.1.Materials ---------- 83

3.1.1.Antigens. ---------- 83

3.1.2.Laboratory animals. ---------- 83

3.1.3.Cells. ---------- 84

3.1.4.Serum samples. ---------- 84

3.1.5.Biological materials. ---------- 85

3.1.6.Stains. ---------- 85

3.1.7.Chemicals. ---------- 85

3.1.8.Plastic wares. ---------- 86

3.1.9.Tools and equipment. ---------- 87

3.1.10.Media ---------- 89

3.1.10.1.Media and media additives for preparation of monoclonal antibody. ---------- 89

3.1.11.Indirect ELISA buffers and reagents. ---------- 91

3.1.12.SDS-PAGE and Western blotting reagents. ---------- 93

3.2.Methods 96

3.2.1.Characterization of *M. bovis* PPD by sodium doddecyle sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). --- 96

3.2.2.Monoclonal antibodies production. ---------- 98
3.2.2.1.BALB/C mice immunization. ---------- 98
3.2.2.2.Poly ethylene glycol fusion protocol. ---------- 98
3.2.2.3.Cloning by limiting dilution of hybridoma cell line. ---- 102
3.2.2.4.Production of monoclonal antibodies in vivo. ---------- 105
3.2.2.5.Indirect ELISA screening. ---------- 105
3.2.2.6.Cryopreservation. ---------- 106
3.2.2.7.Purification of monoclonal antibody. ---------- 107
3.2.3.Characterization of the produced monoclonal antibodies. ------ 108
3.2.3.1.Titration of the produced monoclonal antibodies in the ascites fluid. ---------- 108
3.2.3.2.Evaluation of the specificity of the produced monoclonal antibodies. ---------- 108
3.2.3.3.Characterization by SDS-PAGE and Western blotting. 108
3.2.4.Field applications of the produced monoclonal antibody. ------- 110
3.2.4.1.Competitive ELISA. ---------- 110
3.2.4.2.Indirect ELISA. ---------- 111
4 Results ---------- 112
5 Discussion ---------- 137
6 Summary ---------- 150
7 References ---------- 153

LIST OF ABBREVIATIONS

BALB/c	: Bagg albinos /color locus
BSA	: bovine serum albumin
C-RPMI 1640	: complete RPMI 1640
DDW	: double distilled water
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: dimehtyle sulfoxide
EDTA	: ethelyene diamine tetra acetic acid
ELISA	: enzyme linked immunosorbent assay
FCS	: fetal calf serum
g	: gram
HAT	: hypoxanthine, aminopetrin and thymidine
HGPRT	: hypoxanthine-guanine phosphoribosyle-tansferase
HRPO	: horseradish peroxidase
HT	: hypoxanthine and thimidine
I-RPMI 1640	: incomplete RPMI 1640
I/P	: intraperitoneal injection
kDa	: kilo Dalton
Kg	: kilogram
M	: Moles per litre
mA	: milliamper
MAbs	: monoclonal antibodies
M. avium	: *M. avium*
M. bovis	: *Mycobacterium bovis*
mg	: milligram
ml	: milliliter
mM	: millimoles per litre
M.tuberculosis	: *Mycobacterium tuberculosis*
NAMRU-3	: naval medical research unit no. 3
nm	: nanometer
OD	: optical density
OPD	: orthophenyle diamine
OPI	: oxalacetate, pyruvate and insulin
PBS	: phosphate buffered saline
PEG	: polyethylene glycol
pH	: hydrogen ion concentration
PPD	: purified protein derivative

RBCs	: red blood corpuscles (erythrocytes)
rpm	: revolution per minute
RPMI	: Rosewell park memorial institute
S/C	: subcutaneous injection
SDS	: sodium dodecyle sulphate
SDS-PAGE	: sodium dodecyle sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TB	: tuberculosis
TC	: tissue culture
TU	: tuberculin unit
TEMED	: N,N,N$^{\backslash}$,N$^{\backslash}$ - tetramethylethylene diamine
µg	: microgram
µm	: micrometer
µl	: microlitre