

**DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE IMMUNOLOGICAL  
TEST FOR DETECTION OF HUMAN IGE, IGG AND IGG4  
SPECIFIC TO HOUSE DUST MITE ALLERGEN**

**NOPPARUT KEAWHANAM**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
SCIENCE  
(IMMUNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การพัฒนาวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อตรวจหาปริมาณแอนติบอดีชนิด IgE, IgG และ IgG4 ที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นในซีรัมผู้ป่วย (DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE IMMUNOLOGICAL TEST FOR DETECTION OF HUMAN IGE, IGG AND IGG4 SPECIFIC TO HOUSE DUST MITE ALLERGEN)

นพรัตน์ แก้วหานาม 4536747 SIIM/M

วท.ม (วิทยาภูมิคุ้มกัน )

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศันสนีย์ เสนะวงษ์ M.D., ปัทมา เอกโพธิ์ Ph.D., ฉัฐ มาลัยนวล Ph.D.

#### บทคัดย่อ

โรคภูมิแพ้จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญและพบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยมากขึ้นอย่างรวดเร็วและยังเป็นปัญหาทั่วโลก ไรฝุ่นเป็นสารก่อโรคภูมิแพ้ที่มีความสำคัญที่สุดในการก่อโรคนี้ ไรฝุ่นที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคทั่วโลกมีสองชนิด คือ *Dermatophagoides pteronyssinus* และ *Dermatophagoides farinae* และสารที่ก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้มากที่สุดคือสารก่อภูมิแพ้ชนิดที่ 1 ของไรฝุ่นทั้งสองชนิด (Der p 1 และ Der f 1) โดยสารดังกล่าวพบได้ในทางเดินอาหารของไรและจี้ไรที่ปล่อยออกมาสะสมจำนวนมากในสิ่งแวดล้อมและคงสภาพความเป็นสารก่อโรคภูมิแพ้ได้นานจึงสามารถที่จะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะชนิด IgE ในปริมาณมาก นอกจากนั้นยังมีการศึกษาว่านอกจากร่างกายจะมีปฏิกิริยาตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะชนิด IgE แล้ว ยังมีการสร้างแอนติบอดีชนิดอื่น ซึ่งได้แก่ แอนติบอดีชนิด IgG และ IgG4 ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี indirect ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะชนิด IgE IgG และ IgG4 ในซีรัมผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ต่อไรฝุ่นโดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจาก *Dermatophagoides pteronyssinus* ซึ่งเป็น secretory antigen เนื่องจากแอนติเจนชนิดนี้มีปริมาณของสารก่อภูมิแพ้ชนิดที่ 1 (Der p 1) ในปริมาณที่สูงและเตรียมได้ในปริมาณมากและโดยวิธีง่ายที่สามารถเตรียมได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ผลการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และการตรวจหาปริมาณ Der p 1 โดยวิธี double antibody sandwich ELISA พบว่าส่วนประกอบใหญ่ของแอนติเจนชนิดนี้คือสารก่อโรคภูมิแพ้ต่อไรฝุ่นชนิดที่ 1 ผลจากการตรวจโดยใช้วิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นมากับซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ต่อไรฝุ่นจำนวน 47 รายและคนปกติจำนวน 20 ราย การประเมินผลการตรวจโดยเทียบกับวิธีมาตรฐานในการตรวจ IgE จำเพาะโดยวิธี CAP system พบว่าความไวสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgE มีค่า 66% และความจำเพาะมีค่า 90% ค่าความไวสำหรับแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgG มีค่า 61.7% และความจำเพาะมีค่า 70.6% ค่าความไวสำหรับแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgG4 มีค่า 83.3% และความจำเพาะมีค่า 70% ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการหาความสัมพันธ์ของวิธี ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นมากับวิธี CAP System ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgE ในปัจจุบัน พบว่าวิธี ELISA มีความสัมพันธ์กับวิธีมาตรฐาน และได้ค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.688 ( $p < 0.001$ ) ผลจากการเปรียบเทียบความแตกต่างผลตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgE และ IgG4 ในผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ต่อไรฝุ่นและคนปกติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างของผลตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgG ในผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ต่อไรฝุ่นและคนปกติ ( $p > 0.05$ ) ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีจำเพาะต่อไรฝุ่นในผู้ป่วยได้

**DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE IMMUNOLOGICAL TEST FOR DETECTION OF HUMAN IGE, IGG AND IGG4 SPECIFIC TO HOUSE DUST MITE ALLERGEN.**

NOPPARUT KEAWHANAM 4536747 SIIM/M

M.Sc.(IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISOR: SANSNEE SENAWONG, M.D., PATTAMA EKPO, Ph.D.,  
NAT MALAINUAL, Ph.D.**ABSTRACT**

Allergic disease has increased as an important worldwide clinical problem. House dust mite (HDM) has been shown to be one of the most important and ubiquitous allergens involving in the pathogenesis of allergic disorders. The most dominant species that cause allergic disease are *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Dermatophagoides farinae* (Df). Among several mite allergens, Der p 1 and Der f 1 which are group 1 allergens of Dp and Df are strong immunogens that can stimulate the specific IgE production in allergic patients. The immune response to mite allergens have been studied in allergic disease and it has been found that IgE is regarded as the most important specific antibody, but other antibodies such as IgG and IgG4 have been reported to play some roles in allergic immune response.

In the present study, an indirect ELISA for detection of specific IgE, IgG and IgG4 in sera of HDM allergic patients by using secretory antigen prepared from *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp crude extract) was developed and evaluated. The advantages of secretory antigens are that they are mimic antigens that contain high concentrations of group 1 allergens, As demonstrated by SDS-PAGE and double antibody sandwich ELISAs, large amount of antigen could be obtained relatively easily. The specific IgE, IgG and IgG4 in sera obtained from 47 house dust mite allergic patients and 20 normal subjects were determined by the developed ELISA and the results were evaluated by comparison with the reference method, CAP system. The results showed 66% sensitivity and 90% specificity for specific IgE. For specific IgG, the calculated sensitivity and specificity were 61% and 70.6%, respectively. For specific IgG4, the calculated sensitivity and specificity were 83.3% and 70 %, respectively. There was a significant correlation between specific IgE to Dp crude extract measured by CAP system and ELISA method ( $r = 0.688$ ,  $p < 0.001$ ). There were significant differences of the specific IgE and IgG4 antibodies between the allergic group and the control group ( $p < 0.05$ ). Non significant differences in specific IgG antibodies were found between the allergic group and the control group ( $p > 0.05$ ). Thus, the developed ELISA will be useful for detection of a house dust mite specific antibody to patients' sera.

**KEY WORDS:** HOUSE DUST MITE/ Dp/ Df/ ELISA/ SPECIFIC IGE/ IGG/IGG4

90 P.