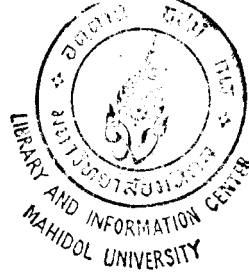


14 MAY 1993

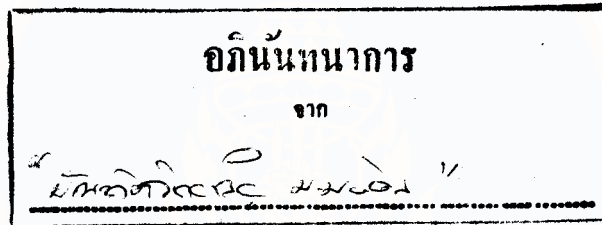


DETECTION OF LEGIONELLA INFECTION BY USING
BROAD-SPECTRUM ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

ORN-ANONG RATCHTRACHENCHAI

อภินันท์นภากร

๑๓๓



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1993

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ <u>Legionella</u> โดยวิธี Broad-Spectrum	
	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	
ผู้วิจัย	อรอนงค์ รัชตราเสนชัย	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์		
	วิบูลย์ศรี พิมลพันธ์	พบ.
	ภาธร บานชื่น	พบ., Ph.D.
	ไพรัช ศรีไสว	พบ.
	สุทธิพันธ์ สารสมบัติ	พบ.
วันที่สำเร็จการศึกษา	26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2536	

บทคัดย่อ

ผู้ติดเชื้อ Legionella อาจจะมีอาการของโรคแตกต่างกันได้ 2 ลักษณะ คือ อาการของโรคปอดอักเสบที่เรียกว่า Legionnaires' disease (โรคลีเจียนแนร์) และอาการไข้สูงโดยไม่มีอาการปอดอักเสบที่เรียกว่าโรค Pontiac fever อาการปอดอักเสบเนื่องจากโรคลีเจียนแนร์ไม่แตกต่างจากโรคปอดอักเสบเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น แต่ต้องการยาปฏิชีวนะที่แตกต่างออกไป การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่สามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่เริ่มป่วย จะช่วยให้แพทย์สามารถเลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม มีรายงานว่า การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ Legionella ในปัสสาวะของผู้ป่วยสามารถให้การวินิจฉัยโรคได้ถูกต้องแม่นยำตั้งแต่ระยะแรกของโรค การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้วิธี broad-spectrum double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ Legionella ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าเป็นโรคนี้ และในตัวอย่างน้ำ

Broad-spectrum ELISA ที่ศึกษาครั้งนี้ ใช้แอนติบอดีของกระด้ายที่เตรียมขึ้นให้มีความจำเพาะต่อเชื้อ Legionella 2 ชนิดคือ L. pneumophila serogroup 1 (Knoxville) และ serogroup 3 (Bloomington-2) เป็นตัวจับแอนติเจนและใช้ติดจลากับเอ็นไซม์ alkaline phosphatase พบว่า ELISA ที่ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ serogroup 1 สามารถตรวจพบแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อเดียวกัน (homologous antigen) โดยแอนติเจนมีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (มีน้ำหนักแห้ง 68 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และยังสามารถตรวจพบแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ L. pneumophila ชนิดอื่น (heterologous antigen) เช่น serogroup 2, 3,

4 และ 5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ serogroup 6 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วน ELISA ที่ใช้แอนติบอดีต่อ L. pneumophila serogroup 3 สามารถตรวจพบแอนติเจนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อเดียวกันที่มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (มีน้ำหนักแห้ง 23 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และสามารถตรวจพบแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ serogroup 6 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, serogroup 4 และ 5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจาก serogroup 1 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 7.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่สามารถตรวจแอนติเจนจาก serogroup 2 ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ELISA ทั้งสองสามารถตรวจ homologous bacterial suspension ที่ผ่านคลื่นความถี่สูง หรือผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อมีปริมาณเชื้อ L. pneumophila serogroup 1 $> 3 \times 10^5$ เซล/มิลลิลิตร และปริมาณเชื้อ serogroup 3 $> 3 \times 10^6$ เซล/มิลลิลิตรตามลำดับ

การตรวจหาแอนติเจนในผู้ป่วยโรค Legionnaires ที่วินิจฉัยโดยวิธี microagglutination ว่ามีสาเหตุจากเชื้อ L. pneumophila serogroup 3 จำนวน 1 ราย พบว่าตัวอย่างตรวจซึ่งประกอบด้วยซีรัม 3 ตัวอย่างและปัสสาวะ 1 ตัวอย่าง ให้ผลการทดสอบเป็นลบโดยวิธี ELISA ทั้งสอง อย่างไรก็ตามไม่สามารถประเมินความไวในการทดสอบได้ เนื่องจากตลอดระยะเวลา 4 ปีที่ทำการศึกษาพบผู้ป่วยนี้เพียงรายเดียว

ได้ทดลองตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ Legionella ในตัวอย่างน้ำจาก cooling tower และน้ำจากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำบ่อ น้ำพุ ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ Legionella ตั้งแต่ < 10 โคโลนี/100 มิลลิลิตร ถึง 3.3×10^4 โคโลนี/100 มิลลิลิตร จำนวน 55 ตัวอย่างโดยวิธีดังกล่าว ทุกตัวอย่างให้ผลการทดสอบเป็นลบ แสดงว่า ELISA ทั้งสองมีความไวในการทดสอบไม่สูงพอที่จะนำมาใช้ตรวจหาแอนติเจนปริมาณน้อยๆดังที่พบในน้ำได้ อย่างไรก็ตามความจำเพาะในการทดสอบของ ELISA ทั้งสองมีค่าสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากพบว่า การตรวจซีรัม 205 ตัวอย่างและปัสสาวะ 94 ตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้ออื่น ปัสสาวะ 109 ตัวอย่างจากผู้บริโภคทางเดินปัสสาวะอักเสบ ซีรัมและปัสสาวะรวม 30 ตัวอย่างจากคนปกติ น้ำจาก cooling tower 125 ตัวอย่างและจากสิ่งแวดล้อม 99 ตัวอย่างที่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ Legionella ทุกตัวอย่างให้ผลเป็นลบ

เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ Legionella โดยวิธี ELISA ทั้งสองกับวิธี passive staphylococcal agglutination พบว่าวิธี ELISA สามารถตรวจพบแอนติเจน (homologous antigen) ได้ในปริมาณที่น้อยกว่าที่ตรวจพบโดยวิธี passive staphy-

lococcal agglutination ซึ่งสามารถตรวจพบ homologous antigen ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนได้ตั้งแต่ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นเฉพาะ passive staphylococcal agglutination ที่ให้แอนติบอดีจำเพาะต่อ serogroup 3 ซึ่งสามารถตรวจพบ homologous antigen ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนได้ไม่ต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้วิธี passive staphylococcal agglutination ไม่สามารถตรวจหา heterologous antigen ได้ ยกเว้นเฉพาะการทดสอบที่ใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ serogroup 6 ซึ่งสามารถตรวจแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ serogroup 3 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความจำเพาะในการทดสอบของ ELISA และ passive staphylococcal agglutination เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถประเมินค่าความไวในการทดสอบ เนื่องจากมีตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยโรคลี้นแนร์เพียงรายเดียว

Thesis Title Detection of Legionella Infection by using Broad-Spectrum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Name Orn-Anong Ratchtrachenchai

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

 Vibulsri Pimolpan , M.D.

 Napatawn Banchuin , M.D.,Ph.D.

 Pairat Srisawai , M.D.

 Suttipant Sarasombath , M.D.

Date of Graduation 26 February B.E. 2536 (1993)

Abstract

Legionella infection causes two distinct clinical syndromes , a fulminating pneumonic illness known as Legionnaires' disease and an acute self-limited febrile non-pneumonia termed as Pontiac fever. The clinical symptoms of Legionnaires' disease cannot be differentiated from pneumonia caused by other organisms. Since legionellae resist to the antibiotics commonly used in most pneumonic patient, an early diagnosis of Legionnaires' disease is required in order to apply suitable therapy. The detection of Legionella antigen in urine specimen have been reported as an effective tool for diagnosis of Legionnaires' disease in the early stage of the illness. In this study , broad-spectrum double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay have been established for the detection of Legionella soluble antigen in clinical specimens and water samples. Rabbit anti-L. pneumophila serogroup 1(Knoxville) and serogroup3 (Bloomington-2) IgG have been raised and used as the capture antibodies and for preparing antibodies alkaline phosphatase conjugats. The established ELISA using L.pneumophila

serogroup 1 IgG could detect homologous antigen prepared from culture extract at a concentration of $> 0.1 \mu\text{g/ml}$ of protein which dry weight was 68 ng/ml and could also detect antigens of other serogroups including that of serogroup 2, 3, 4 and 5 at concentrations of $> 2.5 \mu\text{g/ml}$ protein, of serogroup 6 at concentrations of $> 5.0 \mu\text{g/ml}$ protein. The serogroup 3 ELISA could detect homologous antigen prepared from culture extract as little as $0.05 \mu\text{g/ml}$ of protein which dry weight was 23 ng/ml and also could detect antigens of serogroup 6 at $> 2.5 \mu\text{g/ml}$ of protein, of serogroup 4 and 5 at $> 5.0 \mu\text{g/ml}$ of protein and of serogroup 1 at $> 7.5 \mu\text{g/ml}$ of protein but could not detect serogroup 2 antigen at the protein concentration less than $20 \mu\text{g/ml}$. The established serogroup 1 and serogroup 3 ELISAs could detect homologous sonicated or heated L. pneumophila cell suspensions at the concentration $> 3 \times 10^5$ and 3×10^6 cells/ml, respectively.

Clinical specimens obtained from a patient with serological diagnosis proven having Legionnaires' disease caused by L. pneumophila serogroup 3 were detected for Legionella antigen by using the ELISAs. The specimens included 3 sera and 1 urine samples but all gave negative results by both ELISAs. However, the sensitivity of the tests in detection of Legionella antigen in clinical samples cannot be evaluated as the samples from only 1 patient with Legionnaires' disease was available in this study. Fifty-five water samples from cooling towers and environmental sources, containing < 10 CFU /100 ml to 3.3×10^4 CFU/100ml of Legionella spp, gave negative results for the detection of Legionella antigen by using the ELISAs. The results indicated that the tests were not sensitive enough in detection of small amount of antigen in water samples. The specificity of the tests were found to be 100 percent since 205 serum samples and 94 urine samples obtained from patients with non-Legionella pneumonia, 109 urine samples obtained from patients with urinary tract infections and sera and urine obtained from 30 normal individuals, did not give positive

results by them.

In comparison of the established ELISAs to the passive staphylococcal agglutination tests, the homologous antigen detection ability of the ELISAs were higher than that of the passive staphylococcal agglutination which could detect homologous antigen at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of protein except serogroup 3 antibody coated staphylococcal cells which could detect the antigen at 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of protein. Moreover, the ELISAs could detect heterologous antigens while the passive staphylococcal agglutination tests could not, except the test which used serogroup 6 antibody sensitized cells could detect soluble antigen of serogroup 3 at a concentration of 0.5 $\mu\text{g/ml}$. The specificity of both the ELISAs and the passive staphylococcal agglutination tests were as high as 100 percent but the sensitivity of them could not be evaluated since the lack of Legionnaires' disease patients during this study.