20 JUL 1999

DETECTION OF ANTIBODY AGAINST *ASPERGILLUS FUMIGATUS* BY ELISA AND POSSIBLE ROLE IN THE DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS

NITTAYA TRIPINYOPAP

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

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

TH
N733d
1991
c.2

310504

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาแอนติบอดีต่อ แอสเปอร์จิลัส ฟูมิกาตัส โดยวิธีอิไลซา และบทบาทในการวินิจฉัยแอสเปอร์จิโลซิส

ผู้วิจัย นิตยา ไตรภัญโญภาพ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อังคณา ฉายประเสริฐ, Dr.rer.nat.

นภาธร บานชื่น, พ.บ., Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

Aspergillosis เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งเป็น filamentous fungi ที่พบบ่อยเป็นอันดับหนึ่ง ในการก่อโรคกับระบบอวัยวะภายใน อีกทั้งก่อโรคได้หลายรูปแบบ เช่น extrinsic asthma, extrinsic alveolitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), invasive aspergillosis, aspergilloma และ chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA) Aspergillosis พบบ่อยที่สุดในระบบทางเดินหายใจ

การให้การวินิจฉัยที่จำเพาะ โดยวิธีการเพาะแยกเชื้อหรือย้อมสีโดยตรง จากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากรอยโรค มักจะกระทำไม่ค่อยได้ในทางปฏิบัติ และผลที่ได้จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะ ก็มักจะไม่สัมพันธ์กับอาการของโรค เพราะฉะนั้นในการวินิจฉัย จึงต้องอาศัยข้อมูลต่างๆประกอบกันนอกเหนือไปจากผลการเพาะแยกเชื้อ เช่น ภาพถ่ายรังสีทรวงอก รวมทั้งวิธีการตรวจนำเหลือง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีชนิดตกตะกอนได้ ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อในสกุล *Aspergillus* ในสิ่งส่งตรวจที่เป็น serum โดยวิธี double immunodiffusion โดยการเตรียม reference reagents ไว้ใช้เองเป็นชุด อันประกอบด้วย culture filtrate (CF) antigens และ homologous rabbit antisera ที่เตรียมจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* B-1172, *A. flavus* B-15, *A. niger* 107, *A. nidulans* B-1390 และ *A. terreus* B-985 และใช้ในการทดสอบ serum จำนวน 349 ตัวอย่างตรวจ ซึ่งได้จากผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ อันประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรค aspergillosis กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด กลุ่มผู้ป่วย

Copyright © by Chulalongkorn University

โรคติดเชื้อราของระบบอวัยวะภายใน กลุ่มผู้ป่วยโรค melioidosis กลุ่มผู้ป่วยวัณโรค จำนวน 129 30 18 34 และ 17 ตัวอย่างตรวจตามลำดับ และกลุ่มคนปรกติ 121 ตัวอย่างตรวจ จากการศึกษาพบผลบวกโดยวิธีตรวจหาแอนติบอดีที่ตกตะกอนได้ ใน serum ของผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรค aspergillosis 27.13% (35/129) และพบผลบวกเท็จ 1.81% (4/220)

เนื่องจากวิธี double immunodiffusion มีความไวที่ต่ำ แม้จะมีความจำเพาะที่สูงก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนา วิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ซึ่งมีความไวมากกว่า เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะใน serum ขึ้นมาอีกระบบหนึ่ง โดยการเตรียม AS75 antigen จากเชื้อ *A. fumigatus* B-1172 สำหรับใช้เคลือบ plate และศึกษาในตัวอย่างตรวจกลุ่มต่างๆกลุ่มเดิม โดยใช้ผลบวกจากการตรวจหา แอนติบอดีชนิดตกตะกอนได้ใน serum ประกอบร่วม/หรือ ผลบวกจากการเพาะแยกเชื้อได้ $\geq$ 2 ครั้ง เป็น gold standard ของการวินิจฉัย aspergillosis จากการตรวจหา anti-AS75 IgG และเลือกใช้ค่า cut-off level ที่ titer $\geq$ 1:3 500 พบว่าระบบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นมามีความไว 73.46% (23/56) และมีความจำเพาะ 91.28% (21/220) และยังสามารถตรวจพบผลบวกเพิ่มขึ้น 21.50% (20/93) ในตัวอย่างตรวจจากกลุ่มผู้ป่วยที่สงสัยโรค aspergillosis แต่ให้ผลลบในการตรวจหาแอนติบอดีชนิดตกตะกอนได้ โดยวิธี double immunodiffusion ในขณะเดียวกัน การตรวจโดยวิธี ELISA จะทำให้ได้ผลลบเทียม 34.28% (12/35) ในกลุ่มผู้ป่วย aspergillosis ที่ให้ผลบวกในการตรวจหาแอนติบอดีชนิดตกตะกอนได้โดยวิธี double immunodiffusion และผลบวกเทียมในผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ รวมทั้งในคนปรกติ 9.54% (21/220)

อย่างไรก็ตาม วิธีการตรวจน้ำเหลืองที่พัฒนาขึ้นมา ทั้งวิธี double immunodiffusion และวิธี ELISA นับว่ามีประโยชน์ใช้ช่วยในการวินิจฉัย aspergillosis โดยมีข้อจำกัดคือ การให้การวินิจฉัยจำเป็นจะต้อง ประกอบกับอาการของผู้ป่วยร่วมด้วยเสมอ เพื่อผลประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

Copyright by Mahidol University

Thesis Title DETECTION OF ANTIBODY AGAINST
ASPERGILLUS FUMIGATUS BY ELISA AND
POSSIBLE ROLE IN THE DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS

Name Nittaya Tripinyopap

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee
Angkana Chaiprasert, Dr.rer.nat.
Napatawn Banchuin, M.D.,Ph.D.

Date of Graduation 27 May B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Aspergillosis is a disease caused by ubiquitous filamentous fungus belonging to the genus *Aspergillus*. It is one of the most common systemic mycoses reported from autopsy cases. Aspergillosis frequently affects respiratory tract and can be defined according to its different forms as extrinsic asthma, extrinsic alveolitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), invasive aspergillosis, aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA).

The definitive diagnosis by demonstration of the fungus either by culture or staining methods performed on the specimens taken from the affected lesions is difficult and not practical. Besides this, the results from cultures of sputum are usually not reliable. Therefore, the diagnosis needs information from clinical pictures, chest roentgenogram together with culture and serological results.

Copyright by Mahidol University

In this study, double immunodiffusion method was developed for detection of precipitating antibodies to *Aspergillus* species in patients' sera. A home-made battery of reagents, composed of culture filtrate (CF) antigens and their homologous rabbit antisera of *A. fumigatus* B-1172, *A. flavus* B-15, *A. niger* 107, *A. nidulans* B-1390 and *A. terreus* B-985. Three hundred and fourty nine sera which comprised of 129 from patients with suspected aspergillosis, 30 from patients with lung cancer, 18 from patients with other systemic mycotic infections, 34 from patients with melioidosis, 17 from patients with active pulmonary tuberculosis and 121 from normal individuals were tested. Positive precipitating antibodies by double immunodiffusion method were found in 27.13% (35/129) of patients with suspected aspergillosis while false positive results were found in 1.81% (4/220) in control groups.

Because of the rather low sensitivity of the double immunodiffusion method , we have developed an ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) which is more sensitive technique to detect specific antibodies in patients' sera. AS75 antigen from *A. fumigatus* B-1172 was prepared for coating the plates and the assay was performed with the same groups of sera tested by double immunodiffusion. The positive results by double immunodiffusion method and/or positive cultures of *Aspergillus* $\geq$ 2 times was used as the gold standard for the diagnosis of proved cases of aspergillosis. The sensitivity and specificity of the ELISA system, when the cut-off level was used at anti-AS75 IgG titers $\geq$ 1: 3 500, were 73.46% (23/36) and 91.28% (21/220) respectively.

Copyright by Mahidol University

Additional positive results of 21.50% (20/93) were found in sera of patients with suspected aspergillosis which had negative precipitating antibodies by double immunodiffusion method. On the other hand, false negative results by ELISA method were found in 34.28% (12/35) of the aspergillosis patients who had positive precipitating antibodies by double immunodiffusion method. False positive results by ELISA method were also found in 9.54% (21/220) of the control groups.

In conclusion, both serologic methods, the double immunodiffusion and the ELISA are useful laboratory methods that can be encountered as aid for antemortem diagnosis of aspergillosis when considered along with the clinical informations from the patients.

Copyright by Mahidol University