

50303205: MAJOR : BIOLOGY

KEY WORDS : DER F 2/IGE/TIME-RESOLVED FLUOROIMMUNOASSAY

RATCHANOO PHIPHATCHAIPAISARN : DETECTION OF IGE AGAINST MITE ALLERGENS USING TIME-RESOLVED FLUOROIMMUNOASSAY. THESIS ADVISORS : JUNDEE RABABLERT, Ph.D., ASST. PROF. TITIYA CHITTIHUNSA, Ph.D., AND ASST. PROF. NAT MALAINUAL, Ph.D. 79 pp.

*Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* are the prevalent house dust mites (HDM) in tropical countries and are associated with allergic diseases. This investigation developed a sandwich time-resolved fluoroimmunoassay (sandwichTRF) for the first time to detect specific IgE antibody in patients with skin prick test positive to HDM but no detectable IgE by other means. Levels of IgE to native and recombinant HDM allergens were measured by TRF in 50 HDM-allergic patients and 19 healthy subjects compared to sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwichELISA). A recombinant allergen, rDer f 2, showed a 14 kDa band corresponding to broad range proteins of native HDM. sandwichTRF employing of Df, rDer f 2 and Dp showed good correlations with sandwichELISA at  $r^2$  0.93-0.96. HDM IgE of Df, rDer f 2 and Dp detected from sandwichTRF are 62 %, 62 % and 50 % of allergic patient serum sample compared to 26 %, 32 % and 22 % detected from sandwichELISA, respectively. Sandwich TRF also detected 26.3 %, 31.6 % and 5.3 % positive samples from 19 healthy subjects while sandwichELISA showed 0 %, 5.3 % and 0 % IgE positive samples. The use of rDer f 2 as an HDM allergen for the assay was verified with no statistically different from other HDM allergens. Although with lower detection limit than sandwichELISA but sandwichTRF yielded higher sensitivity for patient sera with allergic symptoms but no detectable HDM IgE. It is indicated that TRF for HDM-specific IgE detection could play an important role in future diagnosis of HDM allergy.

---

Department of Biology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2010

Student's signature .....

Thesis Advisors' signature 1. .... 2. .... 3. ....

50303205 : สาขาวิชาชีววิทยา

คำสำคัญ : Der f 2/IgE/Time-Resolved Fluoroimmunoassay

รัชนี พัฒนชัยไพศาล : การตรวจวัดระดับ IgE ต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นด้วย time resolved fluoroimmunoassay. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ. ดร. จันทร์ดี ระแบบเลิศ, ผศ. ดร. ทติยา จิตติหรรษา และ ผศ. ดร. ณัฐ มาลัยนวล. 79 หน้า.

ไรฝุ่น *Dermatophagoides farinae* และ *D. pteronyssinus* เป็นไรฝุ่นบ้านที่พบเห็นได้บ่อย ๆ ในประเทศเขตร้อนชื้น และเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ ในการศึกษารังนี้เป็นการพัฒนาวิธี sandwich time-resolved fluoroimmunoassay (sandwichTRF) เพื่อตรวจวัดแอนติบอดี IgE ในผู้ป่วยที่ให้ผลบวกด้วยวิธี skin prick test แต่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีอื่น ๆ โดยใช้ซีรัมจากผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ 50 คน และจากผู้ที่สุขภาพแข็งแรง 19 คน แล้วเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwichELISA) ผลการศึกษาปรากฏว่า โปรตีนสังเคราะห์ rDer f 2 มีขนาดโปรตีน 14 kDa เท่ากับโปรตีนสารก่อภูมิแพ้ในธรรมชาติ ระดับแอนติบอดี IgE ที่วัดด้วยวิธี sandwichTRF ต่อโปรตีนสารก่อภูมิแพ้ของไรฝุ่น Df, rDer f 2 และ Dp มีค่าความสัมพันธ์กับวิธี sandwichELISA ( $r^2$  0.93-0.96) จากการเปรียบเทียบพบว่า วิธี sandwichTRF สามารถหาค่าแอนติบอดี IgE ต่อ Df, rDer f 2 และ Dp ได้ที่ระดับ 62, 62 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ ส่วนวิธี sandwichELISA วัดได้เพียง 28, 32 และ 22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง 19 คน วิธี sandwichTRF สามารถตรวจหาค่าแอนติบอดี IgE ต่อ Df, rDer f 2 และ Dp ได้ที่ระดับ 26.3, 31.6 และ 5.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธี sandwichELISA วัดได้ 0, 5.3 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลการใช้ rDer f 2 และสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นในการศึกษานี้ผลการตรวจแอนติบอดี IgE ด้วยวิธี sandwichELISA และ sandwichTRF ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าวิธี sandwichTRF สามารถตรวจพบแอนติบอดี IgE ได้ในระดับที่ต่ำและให้ผลที่ดีกว่าวิธี sandwichELISA ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าวิธีตรวจวัดระดับแอนติบอดี IgE ด้วยวิธี sandwichTRF เป็นวิธีการทางห้องปฏิบัติการวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคภูมิแพ้

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. .... 2. .... 3. ....

## ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere gratitude and deep appreciation to Dr. Jundee Rabablert, my advisor, for her guidance, invaluable advice, supervision and encouragement throughout this study. I am also grateful to Assistant Professor Dr. Nat Malainual, Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for his suggestion and guidance. I would like to thank Assistant Professor Dr. Surapon Piboonpocanun, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University for providing native and recombinant house dust mites.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Dr. Kornkarn Bramarapravati, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University for reviews and recommendations and Dr. Naowarut Meejung, Department of Statistic, Faculty of Science, Silpakorn University and Assistant Professor Dr. Junya Pattaraarchachai, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University for statistics on this thesis. I would like to express to Associate Professor Dr. Renu Vejaratpimol, Assistant Professor, Dr. Titiya Chittihunsa for recommendation on my thesis. This study was supported by Thailand Research Fund No. MRG-WII505S061, partial fund from Thailand Research Fund No. MRG-WII525S092 and Thailand Research Fund No. DIG5180004.

Special thanks are also expressed to Dr. Nares Wongpitoon and Dr. Worawan Durongpisitkul, Department of Pediatric, Police General Hospital for kindly providing blood samples of allergic Thai donors. My special thank for their kindness in providing blood samples of patients and the donors from Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand. My appreciation is also extended to Mr. Duangthep Thongdee and Miss Sasipa Thanyaratsrisakul for their friendship and support. I am also indebted to all my friends, staff members of Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital for their friendships, generosity and sharing the happy time throughout my studying.

Finally, I am grateful to my beloved parents and family for their love, kindness support, encouragement and understanding throughout my study.

Ratchanoo Phiphatchaipaisarn