LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

DETECTION OF RHEUMATOID FACTORS BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

KRITSANA JANYAPOON

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย ม. มหิดล

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจรูมาตอยด์แฟคเตอร์ โดยวิธี ELISA

ผู้วิจัย กฤษณา จรรยาพูน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นภาธร บานชื่น, พ.บ., Ph.D.

เล็ก ปริวิสุทธิ์, พ.บ.

สุพรรณี ศานติวิจัย, วท.ม.

วันที่สำเร็จการศึกษา 17 ตุลาคม พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

การตรวจหา rheumatoid factors (RF) ใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการวินิจฉัยโรค rheumatoid arthritis (RA) ซึ่งกำหนดโดย American Rheumatism Association (ARA) วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปคือ latex agglutination ซึ่งเป็นวิธีที่เชื่อว่าเป็นการตรวจหาปริมาณของ IgM RF เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจาก IgM มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดปฏิกิริยา agglutination ได้ดีกว่า immunoglobulin class อื่น ๆ การตรวจหา RF โดยวิธีนี้มีรายงานว่า ให้ผลบวกในผู้ป่วย RA เพียง 60-70% ในระยะหลังนี้การศึกษาของผู้วิจัยหลายกลุ่ม พบว่า การตรวจหา RF โดยวิธี ELISA ให้ผลดีกว่าโดยมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี latex agglutination นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหา RF class ต่าง ๆ ได้ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคได้ และอาจใช้ช่วยอธิบายพยาธิกำเนิดของโรค RA ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจหา RF class ต่าง ๆ โดยวิธี Microplate ELISA และได้คิดทำ Dot Blot ELISA เพื่อการตรวจหา RF class ต่าง ๆ ขึ้นด้วย รวมทั้งได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธี ELISA กับวิธี latex agglutination ในด้านความไวและความจำเพาะ และความสัมพันธ์ระหว่าง RF ซึ่งตรวจพบโดย latex agglutination กับ RF class ต่าง ๆ ที่ตรวจหาโดยวิธี ELISA ด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผู้ป่วย RA 77 ราย, คนปกติ 200 ราย, ผู้ป่วย systemic lupus erythematosus (SLE) 14 ราย

Copyright by Mahidol University

ผู้ป่วย juvenile RA (JRA) 9 ราย, ผู้ป่วยโรค rheumatic disease อื่น ๆ 24 ราย, ผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ 56 ราย, และผู้ป่วยโรคมะเร็ง 30 ราย

โดยการใช้ Microplate ELISA ผลการศึกษาพบว่า สารมารถตรวจพบ IgM RF, IgG RF และ IgA RF ในคนปกติและผู้ป่วยกลุ่มอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ RA ได้ แต่ก็พบว่า ระดับของ RF ทั้ง 3 class ในผู้ป่วย RA สูงกว่าที่ตรวจพบในคนปกติ และผู้ป่วยกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับของ IgM RF มีความสัมพันธ์กับระดับของ IgA RF ($r = 0.62$, $p < 0.001$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ IgM RF กับระดับของ IgG RF หรือระหว่างระดับของ IgA RF กับ IgG RF

เมื่อวิเคราะห์ถึงประโยชน์ของ ELISA ในการใช้วินิจฉัยโรค RA พบว่า การตรวจหา RF โดยวิธี ELISA ในการศึกษานี้มีความไวในการวินิจฉัยโรค RA เท่ากับ 46.75%, 59.74%, 46.75%, 27.67% และ 9.1% สำหรับการตรวจหา IgM RF, IgG RF, IgA RF, IgD RF, และ IgE RF ตามลำดับ และมีความจำเพาะสำหรับการวินิจฉัยโรคนี้เท่ากับ 97.60% 90.99%, 92.49%, 97.60% และ 100% ตามลำดับ

วิธี Dot Blot ELISA· สำหรับการตรวจหา IgM RF, IgG RF และ IgA RF ซึ่งทำขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ มีความสัมพันธ์อย่างดีกับวิธี Microplate ELISA ($r \geq 0.85$, $p < 0.001$) และให้ค่า agreement index สูง (Kappa ≥ 0.9, $p < 0.001$) ซึ่งแสดงถึงความไม่แตกต่างกันระหว่างผลการตรวจหา RF โดย ELISA ทั้งสองวิธี

แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า วิธี Dot Blot ELISA เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วกว่าวิธี Microplate ELISA นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษา Dot Blot membrane ที่มีแอนติเจนติดอยู่แล้ว ไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ โดยไม่ทำให้ rabbit IgG ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนนี้ เสื่อมคุณภาพสำหรับใช้ในการทดสอบด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า วิธี latex agglutination มีความไว และความจำเพาะสำหรับการวินิจฉัยโรค RA เท่ากับ 83.1% และ 92.5% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการศึกษาที่ผ่านมา นอกจากนี้ พบว่า ระดับของ RF ที่ตรวจพบโดยวิธีนี้ มีความสัมพันธ์กับระดับของ IgM RF ($r= 0.6$, $p < 0.001$) และ IgA RF ($r = 0.7$, $p < 0.001$) ซึ่งตรวจโดยวิธี Microplate ELISA แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของ IgG RF

ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า วิธี latex agglutination เป็นวิธีการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับตรวจหา RF ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป เนื่องจากมีความไวและ

Copyright by Mahidol University

ความจำเพาะสูง สำหรับการวินิจฉัยโรค RA แต่ทั้งนี้จะต้องใช้ reagent ที่มีคุณภาพดีเท่าเทียมกับ reagent ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ด้วย การตรวจหา RF โดยวิธี ELISA ไม่ปรากฏว่าให้ผลดีกว่า latex agglutination ในการที่จะช่วยวินิจฉัยโรค RA แต่อย่างไรก็ตาม จากการพบว่าวิธี Dot Blot ELISA ให้ผลการทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับวิธี Microplate ELISA เป็นอย่างดี และยังสามารถให้ผลการทดสอบที่เท่าเทียมกันในเวลาที่รวดเร็วกว่า และการอ่านผลก็ทำได้ง่าย แสดงให้เห็นว่าวิธี Dot Blot ELISA น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมซึ่งสมควรจะนำไปใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีย์อื่น ๆ ซึ่งการใช้ ELISA สามารถจะให้ประโยชน์ได้มาก

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Detection of Rheumatoid Factors By Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Name Kritsana Janyapoon

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

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

Lek Parivisutt, M.D.

Suphannee Sarntivijai, M.Sc.

Date of Graduation

17 October B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

The detection of rheumatoid factors (RF) is used as one point of criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA), by American Rheumatism Association (ARA). A conventional method used in routine laboratory for RF detection is latex agglutination test, which mainly measure IgM RF and has been found to be positive in only 60-70% of RA patients, as reported from many countries including Thailand .

A recent plubication reported that ELISA for RF detection had higher sensitivity and specificity than the latex agglutination test. In addition, this technique was able to detect RF classes which may be useful for the differential diagnosis and the explanation of pathogenesis of RA .

In this study, 2 methods of ELISA, Microplate and Dot Blot ELISA, were established for the determination of RF classes in RA

Copyright by Mahidol University

and other diseases and the results were compared. Microplate ELISA and latex agglutination for RF detection were also compared for their sensitivities and specificities. The studied sera were obtained from 77 patients with RA, 200 normal individuals, 14 SLE patients, 9 patients with juvenile rheumatoid arthritis, 24 patients with other rheumatic diseases, 56 patients with viral infection and 30 cancer patients.

It was found that, some sera of subjects other than RA had detectable amounts of IgM RF, IgG RF and IgA RF by ELISA, the levels of these RF classes were significantly lower than those in RA sera. The levels of IgM RF was found to correlate with IgA RF ($r=0.62$, $p<0.001$) but such a correlation was not found either between IgG RF and IgA RF or IgM RF and IgG RF. In this study, the sensitivity of IgM RF, IgG RF, IgA RF, IgD RF and IgE RF determined by ELISA were 46.75%, 59.74%, 46.75%, 27.67% and 9.1% with 97.60% 90.99%, 92.49%, 97.60% and 100% specificity respectively.

Dot Blot ELISA for RF detection developed in this study showed good correlation with the Microplate ELISA for all three classes of RF (IgM, IgG, IgA) determination ($r\geq0.85$, $p<0.001$) and also with the high agreement index (Kappa$\geq$0.9, $p<0.001$). Furthermore, it could be performed more rapidly than Microplate ELISA. The dot blotted membrane could be stored for 6 weeks at 4^{o}C before used in the test, without causing any deterioration of the rabbit IgG which was adsorbed on this membrane, acting as the antigen in this method.

Copyright by Mahidol University

In this study, latex agglutination test for RF detection

was found to have 83.1% sensitivity and 92.5% specificity which were higher than those reported previously.

Both IgM RF and IgA RF detected by ELISA were found to correlate with RF detected by latex agglutination test ($r=0.6$, 0.7, $p<0.001$).

The results indicated that, the latex agglutination should still be used as the routine laboratory test for diagnosis of RA, according to its high sensitivity and specificity provided that the reagents used had the same quality as the ones used in this atudy. The determination of RF by ELISA did not show any advantage over the latex agglutination for the diagnosis of RA. However, results of Dot Blot ELISA in this study showed good correlation with the ELISA performed in microplate but it could be performed more rapidly and easily. This suggested the usefulness of Dot Blot method of ELISA for other systems of antigen or antibody detection inwhich ELISA would be useful.

Copyright by Mahidol University