17 NOV 1994

A STUDY OF ANTIBODIES SPECIFIC TO ISLET CELLS AND GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE IN THAI DIABETIC PATIENTS

PARICHAT PHUMKHACHORN

อภินันทนาการ
จาก
ราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. ๒๕๑๖

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1994

Copyright by Mahidol University

29006

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาแอนติบอดีจำเพาะต่อเซลล์ไอเลท และกลูตามิค แอซิดดีคาร์บอกซิเลสในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นเบาหวาน

ผู้วิจัย ปาริชาติ พุ่มขจร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นภาธร บานชื่น, พ.บ., Ph.D.

สาธิต วรรณแสง, พ.บ.

ทวี เลาหพันธ์, พ.บ.

วันที่สำเร็จการศึกษา 25 สิงหาคม พ.ศ.2537

บทคัดย่อ

การตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อเซลล์ไอเลท (Islet cell autoantibodies, ICA) ของตับอ่อนด้วยวิธีอิมมูโนเพอรอกซิเดส โดยใช้เนื้อเยื่อตับอ่อนที่ทำให้คงสภาพ (fix) ด้วยฟอร์มาลินและฝังชิ้นเนื้อในพาราฟิน ในผู้ป่วยเบาหวานประเภทต่าง ๆ 3 ประเภทคือ ผู้ป่วยเบาหวานประเภทพึ่งอินซูลิน (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM), ผู้ป่วยเบาหวานประเภทไม่พึ่งอินซูลิน (noninsulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) และผู้ป่วยเบาหวานประเภท fibrocalculous pancreatic diabetes (FCPD) รวมทั้งคนปกติ สามารถตรวจพบ ICA ที่ไตเตอร์ (titer) ≥ 1:20 ได้ในผู้ป่วยเบาหวานประเภท IDDM ที่เพิ่งตรวจพบว่าเป็นโรค 11.11% (2/18), ผู้ป่วยเบาหวานประเภท NIDDM 1.72% (1/58) แต่ไม่พบในผู้ป่วยเบาหวานประเภท FCPD (0/13) สำหรับในคนปกติตรวจพบ ICA ที่ระดับนี้ได้ 3.57% (3/84) ผู้ป่วยเบาหวานประเภท IDDM ที่เพิ่งตรวจพบว่าเป็นโรค ที่มี ICA ไตเตอร์ ≥ 1:20 มีจำนวนไม่แตกต่างจากที่พบในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อถือว่าการตรวจพบ ICA ไตเตอร์ ≥ 1:20 คือผลบวกของการทดสอบ การตรวจหา ICA โดยวิธีนี้มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เป็น 11.11% (2/18) และ 97.42% (151/155) ตามลำดับ

Copyright by Mahidol University

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้สร้างวิธี slot-blot ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อกลูตามิคแอซิดดีคาร์บอกซิเลส (anti-GAD) เพื่อศึกษาระดับแอนติบอดีนี้ในผู้ป่วยเบาหวานประเภทต่าง ๆ ดังกล่าวและในคนปกติ ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของกลูตามิคแอซิดดีคาร์บอกซิเลส (GAD) ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบที่ทำขึ้นเพื่อการตรวจหา anti-GAD เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเจือจางของ anti-immunoglobunlin ที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับการทดสอบคือ 1:1,000 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการอบเซรุ่ม และการอบ anti-immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนซัยม์ คือ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

การตรวจพบ anti-GAD โดยใช้วิธี slot-bolt ELISA นี้ สามารถตรวจพบ anti-GAD ที่ไตเตอร์ $\geq$ 1:16,000 ได้ใน 19.23% (15/78) ของผู้ป่วยเบาหวานทุกกลุ่มรวมกัน (IDDM, NIDDM, และ FCPD) ซึ่งเป็นสัดส่วนที่สูงกว่าที่พบในคนปกติ (1.59%; 1/63) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในระหว่างกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 3 กลุ่ม (20% (6/30) ในผู้ป่วย IDDM, 20% (7/35) ในผู้ป่วย NIDDM, และ 15.38% (2/13) ในผู้ป่วย FCPD) เมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบ anti-GAD ในผู้ป่วยเบาหวานแต่ละกลุ่มกับคนปกติ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน IDDM และ NIDDM มีสัดส่วนของการตรวจพบ anti-GAD ที่ ไตเตอร์ $\geq$ 1:16,000 สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน FCPD กับคนปกติ ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจพบ anti-GAD ได้ในผู้ป่วยเบาหวานที่เพิ่งตรวจพบว่าเป็นโรคและยังสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยเบาหวานประเภทพึ่งอินซูลินรายหนึ่ง ซึ่งมีระยะเวลาการเป็นโรคนานถึง 6 ปี

เมื่อถือว่าผลบวกของการใช้ slot-blot ELISA สำหรับตรวจหา anti-GAD คือ การตรวจพบ anti-GAD ไตเตอร์ $\geq$ 1:16,000 พบว่า ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจหา anti-GAD ด้วยวิธี slot-blot ELISA เท่ากับ 20% (6/30) และ 90.99% (101/111) ตามลำดับ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title A Study of Antibodies Specific to Islet Cells and Glutamic Acid Decarboxylase in Thai Diabetic Patients

Name Parichat Phumkhachorn

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

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

Sathit Vannasaeng, M.D.

Tawee Laohapand, M.D.

Date of Graduation 25 August B.E.2537 (1994)

ABSTRACT

Islet cell autoantibodies (ICA) were determined by immunoperoxidase technique on formalin-fixed, paraffin-embedded human pancreatic tissue, in patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), noninsulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), fibrocalculous pancreatic diabetes (FCPD) and normal healthy individuals. ICA titer $\geq$ 1:20 was found in 11.11% (2/18) of newly diagnosed IDDM patients, 1.72% (1/58) of patients with NIDDM, and none of 13 patients with FCPD. Approximately 3 percentages (3/84) of normal controls also had ICA titer $\geq$ 1:20. The proportion of newly diagnosed IDDM patients who had ICA at this level was not significantly higher than those of normal controls ($p>0.05$). By using the cut-off level for positive result

Copyright by Mahidol University

of ICA detection at titer $\geq$ 1:20, the sensitivity and the specificity of ICA detection by this method were 11.11% (2/18) and 97.42% (151/155), respectively.

In this study, the slot-blot ELISA for the detection of anti-GAD antibodies was also developed. The optimal concentration of GAD for determining anti-GAD antibodies was 50 ug/ml and the optimal dilution of the anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate was 1:1,000. The optimal time for incubation of sera and the conjugate was 1 hour, at room temperature.

By using the slot-blot ELISA developed, anti-GAD antibodies titer $\geq$ 1:16,000 were found in 20% (6/30) of patients with IDDM, 20% (7/35) of those with NIDDM, 15.38% (2/13) of FCPD patients and 1.59% (1/63) of normal controls. The proportion of IDDM patients and NIDDM patients who had anti-GAD antibodies at this level was significantly higher ($p<0.05$) than that of normal controls, while there was no significant difference ($p>0.05$) between the group of FCPD patients and the latter. By using the cut-off level for positive result of anti-GAD antibodies detection at titer $\geq$ 1:16,000, the sensitivity and specificity of anti-GAD antibodies detection by using slot-blot ELISA were 20% (6/30) and 90.99% (101/111), respectively.

Copyright by Mahidol University