# การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอเบนท์ ในการวินิจฉัยน้ำเหลือง ในโรคซิสเตมิคลูบัสอิริธิมาโตซัส

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวมยุนา ศรีสุภนันต์

002329

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2522

i 16990912

# DEVELOPING TECHNIC OF THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN THE SERODIAGNOSIS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

MISS MAYUNA SRISUPHANUNT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN PHARMACY

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1979

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Developing technic of the enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of systemic lupus erythematosus |
| By | Miss Mayuna Srisuphanunt |
| Department | Microbiology |
| Thesis Advisors | Thada Piamphongsant, M.D.<br>Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D. |

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

S. Bunnag .....Dean of Graduate School
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Pisawat Dutiyabodhi .....Chairman
(Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi, M.S.)

Thada Piamphongsant .....Member
(Thada Piamphongsant, M.D., Diplomate, American board of Dermatology)

Santi Thoongsuwan .....Member
(Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Sumana Vardhanabhuti .....Member
(Assistant Professor Sumana Vardhanabhuti, M.Sc. in Pharm.)

(Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University)

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอเบนท์ ในการวินิจฉัยน้ำเหลืองในโรคซิสเตมิคลูบัสอิริธิมาโตซัส |
| ชื่อ | นางสาวมยุนา ศรีสุภนันต์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | นายแพทย์ธาดา เปี่ยมพงศ์สานต์ |
| | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ |
| ภาควิชา | จุลชีววิทยา |
| ปีการศึกษา | 2522 |

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


## บทคัดย่อ

เนื่องจาก Systemic lupus erythematosus (SLE) เป็นโรคเกี่ยวกับ immune complex ที่ร้ายแรงโรคหนึ่ง ซึ่งพบค่อนข้างบ่อยในคนไทย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ antibody ต่อ native DNA (nDNA) ในผู้ป่วย เพราะ antibody ต่อ nDNA จะมีระดับสูง และมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับความรุนแรงของโรคนี้ การตรวจหา antibody ต่อ nDNA นั้น มีหลายวิธี อย่างไรก็ดี วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่ทำได้สะดวก ให้ผลน่าเชื่อถือดีเท่าเทียมกับวิธีทาง Radio immuno assay (RIA หรือ Farr technic) ซึ่งไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก และไม่เสี่ยงต่อสารรังสี

หลักการโดยทั่วไปของวิธี ELISA คือ coated DNA antigen ลงบน polystyrene microtiter plate โดยใช้ dilute normal rabbit serum เป็นตัวกั้น non-specific binding sites จากนั้นเติม dilution ต่างๆของ unknown serum ตามด้วย anti-immunoglobulin-peroxidase conjugate และ peroxidase substrate ตามลำดับ เมื่อ substrate นี้ถูกย่อย จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ระดับ titer ที่เกิดขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสีจะเป็นสัดส่วนกับระดับของ Anti-DNA antibody ใน unknown serum

จากการศึกษาผู้ป่วยด้วยโรค active และ inactive SLE ตาม American Rheumatism Association criteria (ARA) 40 ราย ผู้ป่วยด้วยโรค SLE ไม่ตาม ARA criteria 20 ราย และกลุ่ม control อีก 40 ราย พบว่ามีผู้ป่วย 42 ราย ในผู้ป่วยโรค SLE ทั้งหมด 60 ราย ที่มีระดับ Anti-DNA antibody สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และโดยการศึกษาเจาะเลือดผู้ป่วยโรค active SLE ตาม ARA criteria 8 รายเป็นระยะ ๆ พบว่าระดับของ Anti-DNA antibody มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน นอกจากนี้ระดับของ Anti-DNA antibody ยังมีความสัมพันธ์เป็นปฏิภาคกลับกับระดับของ Complement อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาเปรียบเทียบถึงวิธีต่าง ๆ ระหว่างวิธี ELISA, Farr technic และ Fluorescence antinuclear antibodies (FANA) พบว่าวิธี ELISA ให้ผลน่าเชื่อถือเท่าเทียมกับวิธีของ Farr technic และให้ผลดีกว่าวิธี FANA

จากการศึกษาการพัฒนาวิธี ELISA ปรากฏว่าเป็นวิธีที่อาจนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเป็น Rautine laboratory work สำหรับตรวจหา Anti-DNA antibody ได้ แต่อย่างไรก็ดี เปอร์เซนต์ความแตกต่างระหว่างวิธี ELISA และ Farr technic พบว่ามีประมาณ 14%

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Developing technic of the Enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of Systemic lupus erythematosus |
| Name | Miss Mayuna Srisuphanunt |
| Thesis Advisors | Thada Piamphongsant, M.D. |
| | Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D. |
| Department | Microbiology |
| Academic year | 1979 |

## ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) provides one of the severe immune complex disease and is often found in Thai people. This is to emphasize the study for Anti-nDNA antibody in patients because Anti-DNA antibody appear to be high level and close correlate to the severity of the disease. Many methods for determination of Anti-DNA antibody were used. However, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a simplified technic and the results are found to correlate with Radio immuno assay (RIA or Farr technic) with less expensive and not hazadous to radiation.

The general principle of ELISA, DNA was coated to polystyrene microtiter plate, followed by dilute normal rabbit serum to inhibit the non-specific binding sites. Unknown serum at various dilutions were allowed to react with DNA coated plate,

and the presence of attached antibody was detected by a combination of anti-immunoglobulin-peroxidase conjugate and peroxidase substrate was digested and changed to brown color. The titer appeared to be correlate to the level of Anti-DNA antibodies in the unknown serum.

The Test was applied to active and inactive 40 SLE patients followed American Rheumatism Association criteria (ARA), 20 SLE patients not followed ARA criteria and 40 controls. The significantly increased Anti-DNA level was found in 42 out of 60 test sera of SLE patients. Studied serially from 8 SLE (active, followed ARA criteria), it was found that Anti-DNA levels were significantly related to clinical activity. There was a reciprocal correlation between Anti-DNA antibody and complement levels. From comparison studies between ELISA, Farr technic and Fluorescence antinuclear antibodies (FANA), it was found that ELISA is paralled to the Farr technic and to be more sensitive than FANA technic.

The results of this study were clearly indicated that the ELISA technic could be used in Routine Laboratory work for determination of Anti-DNA antibodies. However, there was about 14% discrepancy between the ELISA and Farr technic.

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ACKNOWLEDGEMENT

The author is heartfully grateful to Assistant Professor Miss Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for her kindness and for her valuable suggestions for this thesis.

Her sincere gratitude and thanks are expressed to her advisors, Dr. Thada Piamphongsant, Head of the Medical Research and the Immunology department, the Institute of Dermatology of Thailand and Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for providing her with clinical data and sera of the patients, for their helpful guidances, suggestions and encouragements throughout the course of this study.

Particular thanks are due to Dr. Mongkol Vatanasuk, Rheumatologist and Miss Monchand Vanichapuntu, Med. tecnologist, from the Division of Allergy-Immunology and Rheumatology, Department of Medicine, Ramathibodi Hospital for permitting her to use the Liquid Scintillation Counter for determination of Anti-DNA antibodies by the Farr technic.

The author wishes to express her grateful thanks to Chulalongkorn University Graduate School for granting her

partial financial support of seven thousand and eight hundred baht to conduct this study.

Finally, the author would like to express her thanks to all of those whose names have not been mentioned and to those who in one way or another helped her to make this work a reality.

CONTENT


| | Page |
|---|---|
| THAI ABSTRACT | iv |
| ENGLISH ABSTRACT | vi |
| ACKNOWLEDGEMENT | viii |
| CONTENT | x |
| LIST OF TABLES | xii |
| LIST OF FIGURES | xiv |
| ABBREVIATION | xv |
| CHAPTER | |
| I INTRODUCTION | 1 |
| Background of the problem | 1 |
| Objective | 2 |
| Literature review | |
| Preliminary criteria for the classification of SLE | 2 |
| Immunology of SLE | 6 |
| Anti-DNA antibody | 13 |
| Enzyme-linked immunosorbent assay | 22 |
| II MATERIALS AND METHOD | 35 |
| Reagents | 35 |
| Unknown sera | 37 |
| Equipments | 38 |
| Anti-immunoglobulin-peroxidase conjugate | 38 |

Page

CHAPTER

III PRINCIPLE OF THE PROPOSED METHOD..... 39

IV STUDIES OF OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PROPOSED METHOD AND RESULTS..... 41

1. Conjugate..... 41

2. Substrate..... 43

3. DNA..... 43

4. Normal rabbit serum..... 44

5. Tested serum..... 45

6. Buffer..... 45

7. Stability of coated plate..... 47

8. Stability of the Conjugate..... 47

9. Specificity of the Method..... 47

V METHOD USED IN THE TEST..... 48

VI STUDY ON HUMAN CONTROL SERA AND SLE SERA..... 57

VII RESULTS OF STUDIES ON CONTROL AND PATIENT SERA 59

VIII ANTI-DNA IN SLE PATIENTS SERIALLY STUDIES AFTER TREATMENT..... 63

IX DISCUSSION..... 70

X CONCLUSION..... 74

REFERENCES..... 75

VITA..... 88

# LIST OF TABLES


| TABLE | | Page |
|---|---|---|
| 1 | TEST FOR OPTIMAL CONDITION FOR INCUBATING DILUTED CONJUGATE..... | 50 |
| 2 | TEST FOR OPTIMAL TIME FOR INCUBATING SUBSTRATE... | 51 |
| 3 | OPTIMAL CONDITION FOR INCUBATING DILUTED UNKNOWN SERA..... | 52 |
| 4 | pH OF BUFFER USED FOR WASHING PLATE..... | 53 |
| 5 | EFFECT OF PROTEIN USED IN THE WASHING BUFFER..... | 54 |
| 6 | EFFECT OF WASHING PROCESS WITH BUFFER, DISTILLED WATER, TAP WATER..... | 55 |
| 7 | THE STABILITY OF DNA COATED PLATE..... | 56 |
| 8 | PRINCIPLE OF THE PROPOSED METHOD USED AND A COMPARISON WITH THE PRINCIPLES IN OTHER METHODS.. | 58 |
| 9 | DISTRIBUTION OF ANTI-DNA TITERS IN SLE AND CONTROL SERA..... | 61 |
| 10 | COMPARISON OF ANTI-DNA BY ELISA TECHNIC WITH ANTI-DNA BY FARR TECHNIC AND BY FANA..... | 62 |
| 11 | RECIPROCAL ANTI-DNA TITERS IN SLE PATIENTS SERIALLY STUDIED AFTER TREATMENT..... | 65 |

TABLE Page

12 COMPLEMENT LEVELS (MG%) IN SLE PATIENTS SERIALLY STUDIED AFTER TREATMENT..... 66

13 SUMMARY OF STATISTICAL ANALYSIS FOR CHANGES OF ANTI-DNA TITERS IN SLE PATIENTS IN VARIOUS TIMES AFTER TREATMENT..... 67

14 THE PERCENTAGE OF POSITIVE ANTI-DNA ANTIBODIES FOUND IN PATIENTS WITH SLE BY VARIOUS METHODS.... 73

# LIST OF FIGURES


| FIGURE | | Page |
|---|---|---|
| 1 | The indirect method of ELISA for assay of antibody..... | 30 |
| 2. | Double antibody sandwitch method of ELISA for assay of antigen..... | 31 |
| 3 | Competitive ELISA for assay of antigen..... | 32 |
| 4 | The double antibody sandwich-antiglobulin ELISA for assay of antigen..... | 33 |
| 5 | Competitive antigen modification of the indirect ELISA for assay of antigen..... | 34 |
| 6 | Principle of the proposed method..... | 40 |
| 7 | Mean and 95% confidence limits of Anti-DNA titers at various times in SLE patients..... | 68 |
| 8 | Reciprocal correlation between levels of Anti-DNA antibodies and complement in SLE patients..... | 69 |

# ABBREVIATIONS

| | | |
|---|---|---|
| ARA | = | American Rheumatism Association |
| ANF | = | Antinuclear factor |
| BUN | = | Blood Urea Nitrogen |
| cumm | = | Cubic millimetre |
| $C_3'$ | = | Complement component 3 |
| CMI | = | Cell-Mediated Immunity |
| C | = | Celeius |
| DLE | = | Discoid Lupus Erythematosus |
| dl | = | decilitre |
| ELISA | = | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| ESR | = | Erythrocyte sedimentation rate |
| FANA | = | Fluorescence antinuclear antibodies |
| FITC | = | Fluorescence isothiocyanate |
| g | = | gram |
| HLA | = | Human Lymphocyte Antigen |
| HCG | = | Human chorionic gonadotropin |
| HBsAg | = | Hepatitis B surface antigen |
| IgA | = | Immunoglobulin A |
| IgM | = | Immunoglobulin M |
| IgG | = | Immunoglobulin G |
| ml | = | millitre (1 millitre = $10^{-3}$ litre) |

| | | |
|---|---|---|
| mm | = | millimetre |
| mg | = | milligram (1 milligram = $10^{-3}$ gram) |
| min | = | minute |
| nDNA | = | native Deoxyribo Nucleic Acid |
| ng | = | Nanogram (1 nanogram = $10^{-9}$ gram) |
| PMN | = | Polymorphor nuclear |
| PBS | = | Phosphate Buffer Saline |
| PSS | = | Progressive systemic sclerosis |
| RIA | = | Radio immuno assay |
| rpm | = | round per minute |
| RA | = | Rheumatoid Arthritis |
| SLE | = | Systemic Lupus Erythematosus |