

การตรวจวิเคราะห์แอนติบอดี ต่อ นิวเคลียส โดยเทคนิค indirect immunofluorescent assay

(IFA) และ indirect immunoperoxidase assay (IPA)

Determination of Antinuclear Antibody Using Indirect Immunofluorescent Assay

(IFA) and Indirect Immunoperoxidase Assay (IPA)

ธีรกุล อารณสุวรรณ์, สมศักดิ์ พองสุภา,
จารุวรรณ ศิริเทพทวี, พันเอกถวัลย์ ฤกษ์งาม,เทียนชัย ไชยเศรษฐ์
Teerakul Arpornsuwan, Somsak Pongsupa,
Jaruwan Siritapetawee, Col. Thaval Rerksngarm, Tianchai Chaiyasest

บทคัดย่อ

แอนติบอดีต่อนิวเคลียสเป็นคำที่ใช้อธิบายถึงลักษณะของ ออโตแอนติบอดี ต่อส่วนประกอบของเซลล์ ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อสารประกอบในนิวเคลียส เช่น DNA RNA และโปรตีนต่าง ๆ ของนิวเคลียส แอนติบอดีต่อนิวเคลียส สามารถตรวจพบบ่อยในผู้ป่วยโรค connective tissue หรือ rheumatic โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรค SLE สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ แอนติบอดีต่อนิวเคลียส ได้มีการพัฒนามากมาย วิธีที่ได้รับการยอมรับและนิยมใช้มากที่สุดคือ วิธี indirect immunofluorescent assay (IFA) ถึงแม้ว่าวิธี IFA จะเป็นที่ยอมรับในการตรวจ คัดกรองโรคแต่ห้องปฏิบัติการที่ไม่มีกล้องฟลูออเรสเซนซ์จะสามารถตรวจวิเคราะห์ ANA ได้โดยวิธี indirect immunoperoxidase (IPA).

ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจ ANA ในคนปกติจำนวน 30 ราย และผู้ป่วยจำนวน 30 ราย โดยวิธี indirect immunofluorescent assay (IFA) กับวิธี indirect immunoperoxidase assay (IPA) พบว่าคนปกติทั้งหมดให้ผลลบทั้งสองวิธี สำหรับผู้ป่วย 30 ราย ให้ผลบวกจำนวน 26 ราย และผลลบ 4 ราย ผลการตรวจ ANA ของทั้งสองวิธี ในคนไข้ที่ให้ผลบวกมีรูปแบบของ ANA เหมือนกันและไตเตอร์ที่เท่ากัน ยกเว้นคนไข้หนึ่งราย อันผลเป็น homogeneous และ speckled (วิธี IFA) ส่วนวิธี IPA อันผลเป็น homogeneous แต่ทั้งสองวิธีให้ผลไตเตอร์เท่ากัน (1:160) เมื่อเปรียบเทียบ ผลของความจำเพาะ (รูปแบบ ANA) และความไว (ไตเตอร์สุดท้าย) ของทั้งสองวิธีนั้น วิธี IPA สามารถที่จะใช้ในการตรวจวินิจฉัย และติดตามการรักษาโรคอโตอิมมูน โดยเฉพาะในโรค systemic lupus erythematosus (SLE).

* คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ห้องปฏิบัติการชันสูตรโรค โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

* Faculty of Allied Health Science, Thammasat University

** Laboratory Thammasat Chaleirmprikat Hospital, Thammasat University

Abstract

Antinuclear antibody (ANA) is a term which describes a variety of autoantibodies against constituents of cell nuclei including DNA , RNA and various nuclear proteins. These ANA's are found with high frequency in patients with connective tissue or rheumatic diseases, in particular , SLE. Many techniques have been developed to detect antinuclear antibody (ANA) , but indirect immunofluorescent assay (IFA) continues to be the most widely used and accepted. Although IFA is the method of choice for screening ANA , laboratories without access to a fluorescence microscope may perform ANA testing using indirect immunoperoxidase (IPA).

Studies with 30 normal healthy serum samples and 30 patient serum samples by comparison of the ANA results using indirect immunofluorescent assay (IFA) to indirect immunoperoxidase assay (IPA) , the results showed that healthy samples were ANA negative by two methods. Twenty six patient samples were ANA positive and 4 patient samples were ANA negative. These patients showed the ANA positivity at the same titer and pattern , except one patient had homogeneous / speckled pattern (IFA) , and homogeneous pattern (IPA) but had the same titer (1:160). Consideration in the specificity (ANA pattern) and sensitivity (end point titer) of two methods , IPA was also suitable as an aid for the diagnosis and monitoring of autoimmune diseases in particular systemic lupus erythematosus (SLE).

1. คำนำ

ในสภาพปกติ ร่างกายของคนเราจะไม่มีภูมิต้านทานต่อเนื้อเยื่อตัวเอง เนื่องจากร่างกายมีกลไกควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immuno regulation) แต่ด้วยสาเหตุอะไรก็ตามที่ทำให้กลไกการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเสียสมดุลย์ หรือมีความผิดปกติของขบวนการ idiotype เป็นต้น ร่างกายจะมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง โดยการสร้างแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อตนเอง หรือส่วนประกอบของตัวเอง (autoantibody) ภาวะการตอบสนองของร่างกายดังกล่าวเรียกว่า autoimmunity [1]

ผู้ป่วยโรคอโตอิมมูน สามารถพบอโตแอนติบอดีได้หลายชนิด ขึ้นกับลักษณะของโรคที่เกิดขึ้นว่าจำเพาะต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง เช่น โรคอโตอิมมูนของต่อมธัยรอยด์ มีแอนติบอดีจำเพาะต่อ thyroglobulin และ microsomal antigen หรือ โรคอโตอิมมูนที่เกิดพยาธิสภาพได้กับหลาย ๆ อวัยวะ เช่น โรค systemic lupus erythematosus (SLE) มีอโตแอนติบอดี หลายชนิด

เช่น anti ds DNA, anti ss DNA , anti Sm, anti red blood cell, anti lymphocyte, antinuclear antibody เป็นต้น

นอกจากจะตรวจพบอโตแอนติบอดี ในผู้ป่วยโรคอโตอิมมูนแล้ว ยังสามารถตรวจพบอโตแอนติบอดีได้ในคนปกติด้วย ซึ่งพบได้มากตามอายุ ส่วนใหญ่พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย [2] การตรวจพบอโตแอนติบอดีไม่ได้หมายความว่าจำเป็นต้องเป็นโรคอโตอิมมูน จะจัดว่าเป็นโรค ออโตอิมมูน ก็ต่อเมื่อมีพยาธิสภาพของโรคเกิดขึ้น คนที่เป็นโรคในกลุ่มนี้จะมีลักษณะพิเศษของ ความผิดปกติในซีรัมคือมีการตรวจพบ ออโตแอนติบอดีต่อ cell components ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อสารประกอบในนิวเคลียส หรือเรียกว่า antinuclear antibody (ANA) ดังนั้นการตรวจหา ANA จะมีส่วนช่วยให้การวินิจฉัยโรคในกลุ่มนี้ถูกต้องมากขึ้น

ปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์หา ANA ที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากมีความไวสูงและความจำเพาะดีพอสมควร คือ วิธี indirect immunofluorescent assay (IFA) [3] สามารถรายงาน nuclear pattern เพื่อเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ว่าแอนติบอดีที่ให้ผลบวกในการตรวจ ANA เป็นแอนติบอดีต่อ

ส่วนไหนของ nuclear components เพื่อจะได้เป็นแนวทางในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะ ตัวอื่น ๆ สำหรับแต่ละโรคได้ด้วย แต่ข้อจำกัดของวิธี IFA คือ กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ที่มีราคาค่อนข้างสูงมากไม่เหมาะสำหรับงานบริการทั่วไป รวมทั้งผู้ที่ใช้ต้องมีความชำนาญในการใช้และการดูแลกล้องเป็นอย่างดี การศึกษานี้จึงมุ่งที่จะศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ ANA โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดธรรมดา (microscope) ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase (IPA) เพื่อสามารถนำไปใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอน

2. วัตถุประสงค์ในการวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ ANA โดยวิธี IFA และ IPA ในกลุ่มคนปกติ และผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนที่ใช้ผลบวกต่อ ANA

3. วิธีและวิธีการ

3.1 ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย

ตัวอย่างซีรัมคนปกติได้จากสภากาชาดไทย จำนวน 30 ตัวอย่าง ซีรัมผู้ป่วยโรค SLE 20 ราย ผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis 5 ราย และ ผู้ป่วยโรค scleroderma 5 ราย ได้จากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์-เฉลิมพระเกียรติ และหน่วยโรคภูมิแพ้ภูมิโนวิทยาและโรคข้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ตัวอย่างทั้งหมดจะทำการตรวจวิเคราะห์ ANA ด้วยวิธี positive control sera และ ANA negative control sera ทำการตรวจควบคุมไปด้วย

3.2 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี indirect immunofluorescent assay (IFA)

3.2.1 นำสไลด์ Hep 2 cells จำนวน เท่าที่ต้องการใช้ วางที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 เจือจางซีรัมที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วย PBS ให้เป็น 1:40

3.2.3 นำซีรัมที่เจือจางแล้ว (จากข้อ 3.2.2) หยดลงบนแผ่นสไลด์ในส่วนที่มี antigen substrate

3.2.4 ตั้งทิ้งไว้ในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3.2.5 ล้างซีรัมออกด้วย PBS แล้วจุ่ม สไลด์นั้นใน couplin jar ที่มี PBS นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านาน 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง

3.2.6 นำแผ่นสไลด์มาซับ PBS รอบ ๆ บริเวณส่วนนอกของ antigen substrate

3.2.7 หยด antihuman IgG FITC conjugate ให้ท่วมบริเวณที่มี antigen substrate คลุมกล่องขึ้นด้วยกระดาษทึบแสง

3.2.8 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3.2.9 ทำการล้างเช่นเดียวกับข้อ 3.2.5

3.2.10 mount สไลด์ด้วย glycerine buffer

3.2.11 นำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง

3.3 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี indirect immunoperoxidase assay (IPA)

3.3.1 นำสไลด์ Hep 2 cells จำนวน เท่าที่ต้องการใช้ มาวางที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 เจือจางซีรัมที่ต้องการตรวจหา DNA ด้วย PBS ให้เป็น 1:40

3.3.3 นำ Hep 2 cell slides ออกจากช่อง แล้ววางเรียงลงในกล่องขึ้น

3.3.4 นำซีรัมที่เจือจางแล้ว (จากข้อ 3.3.2) หยดลงให้ท่วมส่วนที่มี antigen substrate

3.3.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3.3.6 ล้างซีรัมออกด้วย PBS แล้วจุ่ม สไลด์นั้นใน couplin jar ที่มี PBS อยู่แล้ว นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านาน 5 นาที ทำการล้างซ้ำอีกครั้ง

3.3.7 นำแผ่นสไลด์มาซับ PBS รอบ ๆ บริเวณส่วนนอกของ antigen substrate แล้ววางเรียงสไลด์ลงในกล่องขึ้น

3.3.8 หยด peroxidase conjugate ที่เจือจางด้วย PBS ให้ท่วมบริเวณที่มี antigen substrate คลุมกล่องขึ้นด้วยกระดาษทึบแสง

3.3.9 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3.3.10 ล้างเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6

3.3.11 เตรียม substrate chromogen โดยใช้ AEC - DMF 0.2 ml เติมลงใน acetate buffer 1.8 ml แล้วเติม 30% H_2O_2 1 ul ทันทันที ที่จะใช้

3.3.12 หยด substrate chromogen ให้ทั่วบริเวณที่มี antigen substrate ของแผ่น สไลด์ในกล่องขึ้นคลุมกล่องขึ้นด้วยกระดาษทึบแสง

3.3.13 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

3.3.14 ล้างเช่นเดียวกับข้อ 2.6 ซ้ำบริเวณรอบ ๆ ให้แห้ง

3.3.15 mount แกลสไลด์ด้วย glycerin jelly

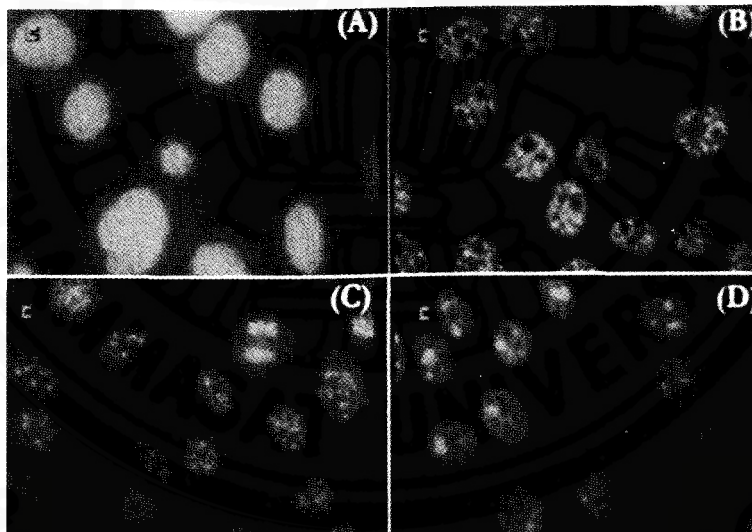
3.3.16 นำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบแสงธรรมดา

4. ผลการทดลอง

4.1 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี indirect immunofluorescent assay (IFA)

การอ่านผล

ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์จะถูกอ่านผลผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400x โดยการอ่านผลเป็นผลลบเมื่อไม่มีการเรืองแสง สีเขียวในตำแหน่งของนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ โดย เปรียบเทียบกับผลลบของตัวอย่างควบคุมที่เป็น negative control serum รวมทั้งเทียบกับ ผลลบในคนปกติด้วย ในกรณีการอ่านผลเป็นบวก มีการเรืองแสงสีเขียวในตำแหน่งของนิวเคลียสในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง หรือหลายรูปแบบปนกัน โดยให้ระดับความเข้มของการเรืองแสงจากน้อยถึงมากเป็น 1^+ ถึง 4^+ ตามลำดับ สำหรับซีรั่มที่ให้ผลเป็นบวกมากกว่า 1^+ ให้นำมาเจือจางต่อเป็น 1:80, 1:160 และ 1:320 แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อ เพื่อหาระดับของ ANA ที่ให้การเรืองแสงของนิวเคลียสที่ระดับความเข้มสุดท้ายเท่ากับ 1^+



รูปที่ 1 รูปแบบของการเรืองแสงในตำแหน่งนิวเคลียสโดยวิธี IFA

A = homogeneous type B = speckled type C = centromere type

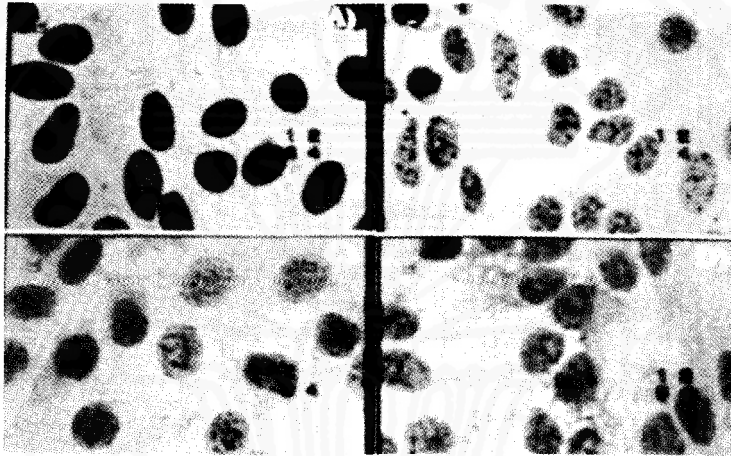
D = nucleolar type

4.2 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี indirect immunoperoxidase assay (IPA)

การอ่านผล

ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์จะถูกอ่านผลผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400x โดยการอ่านผลเป็นผลลบ เมื่อไม่มีการติดสีแดงตรงตำแหน่งของนิวเคลียสในแต่ละเซลล์

โดยเปรียบเทียบกับผลลบของตัวอย่างควบคุมชนิด negative control serum พร้อมทั้งเทียบกับ ผลลบในคนปกติด้วย ในกรณีการอ่านผลเป็น ผลบวก เช่นเดียวกับการอ่านผลโดยวิธี IFA ยกเว้นการติดสีจะมองเห็นเป็นสีแดงในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ ลักษณะรูปแบบการติดสีแดงของนิวเคลียส และการรายงานผลเช่นเดียวกับ วิธี IFA



รูปที่ 2 รูปแบบของการติดสีในตำแหน่งนิวเคลียส โดยวิธี IPA

A = homogeneous type B = coarse speckled type C = centromere type
D = fine speckled type

4.3 ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจ ANA ในกลุ่มคนปกติ และผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อ ANA ด้วยวิธี IFA และ IPA

การตรวจ ANA ในกลุ่มคนปกติจำนวน 30 ราย ให้ผลลบ (negative) ทั้งวิธี IFA และ IPA ส่วนผู้ป่วยโรค SLE, Rheumatoid

arthritis และ scleroderma จำนวนทั้งหมด 30 ราย ให้ผลลบ (negative) 4 ราย และผลบวก 26 ราย ในรูปแบบและไตเตอร์ต่าง ๆ กันดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นวิธี IFA และวิธี IPA มีความไว (sensitivity) ในการตรวจ ANA เท่ากับ 86% และมีความจำเพาะถึง 100%

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบไตเตอร์และรูปแบบของการติดสีของนิวเคลียสในการตรวจ ANA โดยวิธี IFA และ IPA ในตัวอย่างซีรัม 30 ตัวอย่าง แบ่งผลการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 กลุ่มซีรัมที่ได้รูปแบบการเรืองแสงและการติดสีเหมือนกันทั้งวิธี IFA และ IPA จำนวน 29 ตัวอย่าง

รูปแบบ (pattern)	ลำดับที่ซีรัม	Titer (1 :) ของการทดสอบ	
		IFA	IPA
Homogeneous	1	1:320	1:320
	2	>1:320	>1:320
	3	1:320	1:320
	4	1:320	1:320
	5	1:320	1:320
	6	1:320	1:320
	7	>1:320	>1:320
	8	1:80	1:160
	9	1:320	1:320
Homogeneous-Speckled	10	1:320	1:160
	11	>1:320	1:320
	12	>1:320	1:320
	13	>1:320	1:320
	14	1:80	1:80
	15	1:320	1:320
Fine Speckled	16	>1:320	1:320
	17	1:320	1:320
	18	1:80	1:80
	19	1:40	1:40
	20	1:80	1:80
Coarse Speckled	21	1:320	1:320
	22	>1:320	>1:320
	23	>1:320	>1:320
Centromere	24	1:320	1:320
Nucleolar	25	1:320	1:320
Negative (-)	26-29		

1.2 กลุ่มซีรัมที่ได้รูปแบบการเรืองแสงและการติดสีแตกต่างกันระหว่างวิธี IFA และ IPA จำนวน 1 ตัวอย่าง

ซีรัมลำดับที่	IFA		IPA	
	รูปแบบ	ไคเตอร์ (1:)	รูปแบบ	ไคเตอร์ (1:)
30	Homogeneous-Speckled	1:160	Homogeneous	1:160

5. วิจารณ์ผลการทดลองและข้อสรุป

การตรวจหา ANA ในซีรัมผู้ป่วยกลุ่มโรค autoimmune ชนิดต่างๆ เช่น โรค systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis และ scleroderma นับว่ามีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรค และติดตามการรักษา โดยเฉพาะ ANA ที่ตรวจหาโดยวิธี indirect immunofluorescent staining (IFA) เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด [4 และ 5] เนื่องจากวิธีนี้ทำให้ทราบทั้งรูปแบบ และความเข้มข้นของการเรืองแสงซึ่งจะบ่งถึงระดับของ ANA เพื่อช่วยทั้งในแง่ของการวินิจฉัยและการติดตามโรคได้อย่างดียิ่งขึ้น

วิธีการตรวจหา ANA ทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดและเป็นที่ยอมรับคือ indirect immunofluorescent staining (IFA) เนื่องจากมีความไวสูง สามารถตรวจหา ANA ได้เกือบทุกตัว และให้ความจำเพาะดีพอสมควร ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับ substrate ที่ใช้ด้วย จากการศึกษาของ Kozin et al [6] พบว่า substrate ที่เตรียมจาก tissue culture จะมี nucleus ใหญ่ ทำให้แยก pattern ได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีเซลล์ที่กำลัง แบ่งตัว ทำให้สามารถตรวจหา antientromere และ anti spindle fiber ได้ด้วย มีความเหมาะสมและง่ายในการอ่านผล pattern ต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ substrate ที่เตรียมจาก tissue section สำหรับปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการตรวจ ANA ที่สำคัญลำดับต่อมาคือ ความเข้มข้นของ conjugated antiserum และคุณภาพกล้อง ที่ใช้เนื่องจาก fluorescein conjugated antiserum ที่ใช้ในวิธี IFA ต้องอ่านผลโดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (fluorescence microscope) ที่มีราคาค่อนข้างสูง ไม่เหมาะกับงานบริการทั่วไป รวมทั้งผู้ที่ใช้ต้องมีความชำนาญและการดูแลกล้องเป็นอย่างดี ในกรณีที่ต้องทำงานเป็นประจำในระยะเวลาสั้นๆ ต้องระมัดระวัง

ในการที่จะสัมผัส (expose) กับแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีอันตรายต่อสุขภาพได้

การศึกษานี้จึงมุ่งที่จะเปรียบเทียบวิธีตรวจ ANA โดยวิธี indirect immunoperoxidase staining (IPA) กับวิธี IFA โดยเปรียบเทียบ ผลการตรวจ ANA ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนต่างๆ และกลุ่มคนปกติ

จากการศึกษาเปรียบเทียบในส่วนของคนไข้กลุ่มโรคออโตอิมมูนที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ ANA ทั้ง 2 วิธี รูปแบบ (pattern) ของการติด สีนิวเคลียส และ titer จะแตกต่างกันบ้างจากจำนวนคนไข้ทั้งหมด 30 ราย พบว่าคนไข้ 4 ราย (ซีรัมลำดับที่ 11, 12, 13, 16) มีรูปแบบ (pattern) ของการติดสีนิวเคลียสที่เหมือนกันทั้ง 2 วิธี แต่ titer จะแตกต่างกัน (ตารางที่ 1.1) ถ้าอ่านโดยวิธี IFA titer > 1:320 ในขณะที่วิธี IPA titer 1:320 เนื่องจาก การอ่านผลระดับความเข้มของการติดสีนิวเคลียสที่ titer สุดท้ายคือ 1:320 ยังคงให้ผลมากกว่า 1* จะรายงานผลเป็น titer > 1:320 ทำการศึกษาคนไข้ 4 รายนี้ให้ผล IFA ที่ titer > 1:320 โดยการเจือจางซีรัมต่อไป ผลปรากฏว่า คนไข้ทั้ง 4 รายให้ผลบวกสุดท้ายที่ titer 1:640 (IFA) แสดงว่าความแตกต่างของระดับ titer ซึ่งถือว่าเป็นความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นได้ และเป็นที่ยอมรับกัน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผล (human error) สำหรับคนไข้ลำดับที่ 8 ให้ผลรูปแบบของการติดสีนิวเคลียสเหมือนกัน (homogeneous) แต่ต่างกันที่ titer ของ IFA = 1:80 ส่วน IPA = 1:160 (ตารางที่ 1.1) ส่วนคนไข้ลำดับที่ 30 ให้ผล IFA และ IPA ที่ titer เท่ากันต่างกันที่รูปแบบของการติดสีนิวเคลียส (ตารางที่ 1.2) โดยวิธี IFA อ่านผลเป็น homogeneous และ speckled ส่วนวิธี IPA อ่านผลเป็น homogeneous อย่างเดียว ดังนั้น วิธีการตรวจ ANA ทั้ง 2 วิธีให้ผล pattern เหมือนกับในคนไข้ 29 ราย จากทั้งหมด 30 ราย (97%) และมี

ผล titer สุดท้ายที่เหมือนกัน 25 ราย (83%) แสดงว่าคุณสมบัติของ conjugate antibody ของทั้ง 2 วิธี ใกล้เคียงกันมากในด้าน ความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของน้ำยาทั้ง 2 วิธี ในส่วนที่ต่างกันเป็นเรื่องของความคงทน (Stability) ของ conjugate antibody เนื่องจากวิธี IPA ใช้ peroxidase enzyme กับ substrate ของ enzyme ถ้าน้ำยาใกล้หมดอายุ จะทำให้ background หรือการติดสีที่ไม่จำเพาะเกิดเพิ่มมากขึ้น มีผลทำให้แยกผลระหว่างผลบวกต่ำๆ และผลลบได้ยาก จึงควรระมัดระวังในเรื่องอายุของน้ำยาที่ใช้ด้วย แต่ข้อดีของวิธี IPA คือกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้อ่านผลมีราคาถูกเหมาะที่ใช้กับงานบริการทั่วไป วิธีการใช้กล้องและความสะดวกในการอ่านผลง่ายกว่า ไม่ต้องระมัดระวังในเรื่องอันตรายจากแสงฟลูออเรสเซนซ์

สำหรับวิธี IFA มีข้อดีในเรื่องของการติดสีเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้เห็นผลได้ชัดเจนกว่าการติดสีแดงของวิธี IPA รวมทั้งการติดสีที่ไม่จำเพาะ (background) มีความแตกต่างจากการติดสีเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้แยกผลลบออกจากผลบวกต่ำๆ ได้ง่าย และขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าวิธี IPA ที่จะต้องเตรียม substrate ของ peroxidase enzyme ทุกครั้ง ก่อนทำการตรวจ ส่วนข้อเสียของวิธี IFA คือ กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ที่มีราคาค่อนข้างสูงไม่เหมาะสำหรับงานบริการทั่วไป รวมทั้งผู้ที่ใช้ต้องมีความชำนาญและการดูแลกล้องเป็นอย่างดี

6. สรุปผลการทดลอง

วิธีการตรวจ ANA ทั้ง 2 วิธี มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ที่ใกล้เคียงกันมากในการเลือกวิธีให้ขึ้นกับความเหมาะสมของค่าใช้จ่าย และความสะดวกของผู้ใช้ รวมทั้งต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ความคงทน (stability) ของน้ำยาที่ใช้แต่ละบริษัท คุณภาพและชนิดของกล้องที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์ ANA ที่เหมาะสม และมีคุณภาพได้มาตรฐานที่ดี ย่อมเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ ในการช่วยวินิจฉัย และ ติดตามการรักษาให้ได้ผลดียิ่งขึ้น

7. คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัยเสริมหลักสูตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วย รวมทั้งคำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ ANA จาก คุณมนต์จันทร์ วณิชพันธ์ุ หน่วยโรคภูมิแพ้ภูมิไวยาและโรคข้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

8. เอกสารอ้างอิง

- [1] Ollier W. and Symmons DPM., Clinical consequences of autoimmunity, In: Read AP. And Brown T. Eds., **Autoimmunity : General considerations and multisystem disease**, Oxford: Information Press, 1992; p73-85.
- [2] ฤทัย สุกุลแรมรุ่ง. **วิทยานิพนธ์**. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2537.
- [3] มนต์จันทร์ วณิชพันธ์ุ. **Antinuclear antibody**. วารสาร TMTL:8: 2-8.
- [4] Panicheewa S., Verasert N., Chitrabamrung S., Vanichapuntu M. and Vatanasuk M., **Antinuclear antibodies in Thai patients with connective tissue disease**, Asian Pac. J. all Immunol. 1987; 5: 47-52.
- [5] Cruse JM. And Lewis RE Jr., Autoimmunity in the age of Molecular Biology, In: Cruse JM. And Lewis RE Jr Eds., **Clinical and Molecular aspects of Autoimmune Disease: Concepts in Immunopathology**, Basal: Karger Press, 1992; p1-17.
- [6] Kozin F., Fowler M. and Koc the SM., **A comparison of the sensitivities and specificities of different bstrates for the fluorescent antinuclear antibody test**, Am. J. Clin. Pathol. 1980; 74: 785-790